



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITO NEUROPROTETOR DA CREATINA E AVALIAÇÃO
DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA CAPTAÇÃO DE
GLUTAMATO INDUZIDOS PELO ÁCIDO GLUTÁRICO NO
ESTRIADO DE RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Danieli Valnes Magni

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**EFEITO NEUROPROTETOR DA CREATINA E AVALIAÇÃO
DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA CAPTAÇÃO DE
GLUTAMATO INDUZIDOS PELO ÁCIDO GLUTÁRICO NO
ESTRIADO DE RATOS**

por

Danieli Valnes Magni

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes
Co-Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Rechia Fighera

Santa Maria, RS, Brasil

2008

*“É preciso escolher um caminho que não tenha fim, mas ainda assim,
caminhar sempre na expectativa de encontrá-lo.”
(Autor desconhecido)*

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica toxicológica

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

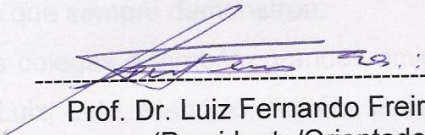
**EFEITO NEUROPROTETOR DA CREATINA E AVALIAÇÃO DOS
PARÂMETROS CINÉTICOS DA CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO
INDUZIDOS PELO ÁCIDO GLUTÁRICO NO ESTRIADO DE RATOS**

elaborada por

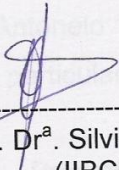
Danieli Valnes Magni

como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes
(Presidente/Orientador)
(UFSM)



Prof.ª Dr.ª Silvia Olivera Bravo
(IIBCE-UY)



Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha
(UFSM)

Santa Maria, 14 de outubro de 2008.

Agradecimentos

Primeiramente eu gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes pela orientação e pelos ensinamentos transmitidos, além da confiança na realização desse trabalho. Também pela amizade e companheirismo nos momentos fora do laboratório.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Juliano Ferreira pelos seus sábios conhecimentos e pela constante disponibilidade em ajudar-me. Além é claro, de seu grande companheirismo.

À minha co-orientadora Prof. Dr^a. Michele Rechia Fighera pelo seu grande conhecimento e pela ajuda indescritível que deu a este trabalho. Obrigada Mi!

Orientadores, admiro-os por seu caráter e por sua sabedoria.

Ao Prof. Dr. Carlos Fernando Mello por ter disponibilizado seu laboratório permitindo assim que este trabalho se realizasse.

Ao meu pai Valmir e ao meu irmão Anderson, quem amo muito, pelo apoio e incentivo que sempre me deram para seguir em frente.

Ao meu noivo Luciano, pelo amor, carinho, apoio, paciência e companheirismo que sempre demonstrou.

Aos meus colegas e também grandes amigos do laboratório 21, Leo, Mauro, Samurai, Fred, Luiz, Lele, Maurício, Aninha, Juliana, André, Vanessa, Lívia, Mirian, Velcir, Ariane, Ana Paula, pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados, e em especial a Ana Flávia e a Mauren.

À Prof. Dra. Maribel Antonelo Rubin pela orientação na docência, e aos colegas do laboratório 18, em particular a Gabi, a Pati e ao Guilherme pela amizade e pelos auxílios.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, que também contribuíram para a minha formação científica.

Às funcionárias do PPGBT, Angélica e Márcia, por toda ajuda prestada.

À Universidade Federal de Santa Maria por tornar possível o sonho da graduação e pós-graduação em uma universidade pública e de qualidade.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

E por fim, porém de maneira alguma menos importante, agradeço a Deus por ter colocado todas essas pessoas maravilhosas no meu caminho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITO NEUROPROTETOR DA CREATINA E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO INDUZIDOS PELO ÁCIDO GLUTÁRICO NO ESTRIADO DE RATOS

Autora: Danieli Valnes Magni
Orientadora: Luiz Fernando Freire Royes
Co-Orientador: Juliano Ferreira
Co-Orientadora: Michele Rechia Fighera
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 14 de outubro de 2008.

A acidemia glutárica tipo I (GA-I) é um erro inato do metabolismo (EIM) caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo principal de ácido glutárico (GA) e ácido 3-hidroxi-glutárico (3-OH-GA), e patologicamente por uma característica degeneração estriatal. Devido à escassez de medidas terapêuticas efetivas para essa acidemia, vários estudos têm investigado novas terapias, já que uma em cada três crianças submetidas aos atuais tratamentos sofre degeneração estriatal. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo em sua primeira parte, investigar os efeitos do tratamento agudo com creatina (Cr), um composto guanidínico endógeno que tem mostrado efeitos neuroprotetores em uma variedade de modelos experimentais de doenças neurodegenerativas e também em acidemias orgânicas, sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pelo GA *in vivo*. Nossos resultados demonstraram que a administração aguda de Cr preveniu as convulsões comportamentais e eletrográficas, o aumento do conteúdo de proteína carbonil e a redução da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase induzidos pelo GA em ratos. Além disso, a Cr também protegeu da redução da captação de L-[^3H]glutamato sinaptossomal induzida pelo GA *in vitro*. Como foi observado nesta primeira parte, que o GA em uma baixa concentração (10 nM) foi capaz de reduzir a captação de L-[^3H]glutamato em sinaptossomas estriatais de ratos, e desde que os mecanismos responsáveis pela degeneração estriatal observada nos pacientes glutaricoacidêmicos ainda não estão bem esclarecidos, decidimos avaliar em uma segunda etapa, um provável mecanismo de ação primário para os efeitos neurotóxicos desta baixa concentração de GA, que possivelmente pode estar presente no início da GA-I. Verificamos que o GA reduziu a captação de L-[^3H]glutamato e aumentou a formação de espécies reativas (ER) em sinaptossomas de estriado de ratos em todos os tempos testados. Além disso, observamos pela primeira vez que o GA reduziu a eficácia (V_{Max}), mas não a afinidade (K_D) da captação de L-[^3H]glutamato em sinaptossomas estriatais, sugerindo uma inibição do tipo não competitiva. A adição simultânea do L-*trans*-pirrolidina-2,4-dicarboxilato (PDC), um inibidor dos transportadores de glutamato, com o GA não alterou o efeito inibitório sobre a captação de L-[^3H]glutamato induzido pelo ácido orgânico, indicando a participação dos transportadores de glutamato na redução da captação desse neurotransmissor induzida pelo GA.

Desde que a atividade dos transportadores de glutamato pode ser inibida por oxidação, evidenciamos que embora o antioxidante trolox proteja do aumento da formação de ER induzidas pelo GA, ele não protege da redução da captação de L-[³H]glutamato induzida por este ácido orgânico em sinaptossomas de estriado. Estes achados sugerem que a formação de ER pode ser um evento tardio na neurotoxicidade observada na GA-I. Além disso, não podemos excluir a possibilidade de que o GA também possa estimular diretamente os receptores de glutamato, desde que a formação de ER induzidas pelo GA foi atenuada pelo antagonista de receptor de glutamato não-NMDA, o CNQX, mas não pelo MK-801 e o GA, nessa baixa concentração, não apresentou atividade oxidante *per se*. Portanto, os resultados apresentados no presente estudo demonstram que a administração previa de creatina protege das ações deletérias ocasionadas pelo GA. Além disso, evidenciamos, pela primeira vez, que uma baixa concentração de GA causa ações excitotóxicas primárias, bem como, estresse oxidativo na estrutura cerebral predominantemente afetada nesta doença. Assim, acreditamos que este trabalho possa auxiliar na elucidação da gênese da GA-I, bem como no desenvolvimento de estratégias terapêuticas adjuvantes eficazes no tratamento desta acidemia.

Palavras-chaves: ácido glutárico; creatina; convulsões; glutamato; estriado; sinaptossomas; excitotoxicidade; espécies reativas.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduating Program in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF CREATINE AND EVALUATION OF KINETIC PARAMETERS OF GLUTAMATE UPTAKE INDUCED BY GLUTARIC ACID FROM STRIATUM THE RATS

Author: Danieli Valnes Magni
Advisor: Luiz Fernando Freire Royes
Co-Advisor: Juliano Ferreira
Co-Advisor: Michele Rechia Figuera
Date and place of the defense: Santa Maria, October, 14th, 2008.

Glutaric acidemia type I (GA-I) is an inborn error of metabolism (EIM) biochemically characterized by the main accumulation of glutaric acid (GA) and 3- hydroxyglutaric acid (3-OH-GA), and pathologically by a characteristic striatal degeneration. Due the absence of effective therapeutic strategies for this acidemia, several studies have investigated new therapies, since that one in three children subject to current treatments show striatal degeneration. In this context, the present work aimed in the first part, to investigate the effects of acute treatment with creatine (Cr), an endogenous compound guanidine which has shown neuroprotective effects in a variety of experimental models of neurodegenerative diseases and also in organic acidemias, on the GA-induced behavioral and neurochemical changes *in vivo*. Our results demonstrated that acute administration of Cr prevented the GA-induced behavioral and electrographic seizures, the carbonyl protein content increased and the Na⁺,K⁺-ATPase enzyme activity reduction in rats. Moreover, the Cr also protected the GA-induced sinaptossomal L-[³H]glutamate uptake reduction *in vitro*. As was observed in this first part, that the GA in a low concentration (10 nM) was able to reduce the L-[³H]glutamate uptake in striatal sinaptossomas of rats, and since that responsible mechanisms for striatal degeneration observed in patients are still poorly understood, we decided to evaluate in a second step, a primary action mechanism for the neurotoxic effects this low concentration of GA, which possibly may be present at the beginning of GA-I. We find that the GA reduced the L-[³H]glutamate uptake and increased the reactive species (ER) formation in sinaptossomas the striatum of rats in all times tested. Furthermore, we observed for the first time that the GA reduced the efficacy (V_{Max}), but not the affinity (K_D) of L-[³H]glutamate uptake in striatal sinaptossomas, suggesting a non-competitive inhibition. The addition of both the L-*trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC), a glutamate transporters inhibitor, with the GA did not alter the inhibitory effect on the of L-[³H]glutamate uptake induced by organic acid, indicating the involvement of glutamate transporters in the GA-induced uptake reduction. Since the glutamate transporters activity can be inhibited by oxidation, we show that although the antioxidant trolox protects against GA-induced ER formation increase, it did not protect against GA-induced glutamate uptake reduction in the synaptosomes of cerebral structure studied, suggesting that ER formation may be a late event in the neurotoxicity observed in GA-I. Moreover, we can not exclude the possibility that

the GA may also directly stimulate the glutamate receptors, since the GA-induced ER formation was reduced by the non-NMDA glutamate receptor antagonist, the CNQX, but not by MK-801, suggesting that these receptors contributed, at least partly, to the GA-induced oxidative stress. Also determined GA, in this low concentration, did not show oxidant activity *per se*. Therefore, from results in this study it was observed the protective effect of Cr administration in the deleterious actions caused by the GA. Furthermore, we show for the first time that a GA low concentration cause primary excitotoxicity, and oxidative stress in brain structure predominantly affected in this disease. Therefore, we believe that this work may help explain the genesis of GA-I, as well as the development of effective adjuvant therapeutic strategies in the treatment this acidemia.

Keywords: glutaric acid; creatine; seizures; glutamate; striatum; synaptosomes; excitotoxicity; reactive species.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Frequência estimada de alguns EIMs.....	12
Figura 1. Deficiência da enzima glutaril-CoA desidrogenase.....	13
Figura 2. Ressonância magnética nuclear de crânio de criança com GA-I.....	15
Figura 3. Manifestações clínicas de crianças com GA-I.....	16
Figura 4. Similaridade estrutural entre glutamato, ácido glutárico e 3-hidroxi glutárico.....	21
Figura 5. Configuração eletrônica das Espécies Reativas de Oxigênio.....	26
Figura 6. Dismutação do radical superóxido pela ação da superóxido dismutase.....	27
Figura 7. Reação de Fenton.....	27
Figura 8. Reação de Haber-Weiss.....	28
Figura 9. Reação da enzima creatina quinase.....	31
Figura 10. Síntese de creatina.....	31

4. CAPÍTULOS

4.1. Capítulo I

Figure 1. Creatine pretreatment (300mg/kg, p.o.) increases the latency for the first convulsive episode (A) and decreases the duration (B) of convulsive episodes induced by GA (4 μ mol/striatum).....	39
Figure 2. Representative electroencephalographic recordings before (A) and after intrastriatal GA administration (4 μ mol/striatum; B).....	40
Figure 3. Quantitative analysis of EEG recording demonstrated that creatine pretreatment (300 mg/kg, p.o.) attenuated GA-induced delta increase and beta depression power density (4 μ mol/2 μ l) in the striatum(A) and ipsilateral córtex (B).....	41
Figure 4. Creatine pretreatment (50 to 300mg/kg, p.o.) prevents the striatal GA-induced protein carbonylation increase.....	41
Figure 5. Effect of creatine pretreatment (50 to 300 mg/kg, p.o.) on the GA-induced Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase activity inhibition.....	41

Figure 6. Effect of creatine on synaptosomal [³H] glutamate uptake.....42

4.2. Capítulo II

Figure 1. Effect of glutaric acid (10 nM) on L-[³H]glutamate uptake by synaptosome from striatum of rats.....65

Figure 2. Effect of PDC (in the absence and presence glutaric acid) on L-[³H]glutamate uptake by synaptosome from striatum of rats.....66

Figure 3. Effect of glutaric acid (10 nM) on kinetic analysis of high affinity, Na⁺-dependent transport L-[³H]glutamate uptake by synaptosome from striatum of rats.....67

Figure 4. Effect of glutaric acid on DCFH oxidation by synaptosome from striatum of rats.....68

Figure 5. Effect of trolox (in the absence and presence glutaric acid) on DCFH oxidation by synaptosome from striatum of rats.....69

Figure 6. Effect of trolox (in the absence and presence glutaric acid) on L-[³H]glutamate uptake by synaptosome from striatum of rats.....70

Figure 7. Effect of NMDA (5 μM) and CNQX (100 μM) (in the absence and presence glutaric acid) on DCFH oxidation by synaptosome from striatum of rats.....71

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – difosfato de adenosina
AMP – monofosfato de adenosina
AMPA – α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
ATP – trifosfato de adenosina
CK – creatina quinase
CNQX – 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CO₂ – dióxido de carbono
Cr – creatina
DCFH – diclorofluoresceína
DNA – ácido desoxirribonucléico
DNQX – 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
EAAC – carreador de aminoácidos excitatórios
EAAT – transportador de aminoácidos excitatórios
EIM – erro inato do metabolismo
ER – espécies reativas
ERN – espécies reativas de nitrogênio
ERO – espécies reativas de oxigênio
GA – ácido glutárico
GA-I – acidemia glutárica tipo I
3-OH-GA – ácido 3-hidroxiglutárico
GABA – ácido γ -aminobutírico
GCDH – glutaril-CoA desidrogenase
GDP – difosfato de guanosina
GLAST – transportador de glutamato/aspartato de ratos
GLT1 – transportador de glutamato de ratos 1
GTP – trifosfato de guanosina
H₂O – água
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
LDH – lactato desidrogenase
MK-801 – dizocilpina
MMA – ácido metilmalônico
NaC – transportador dicarboxílico de sódio
NAD⁺ – nicotinamina adenina dinucleotídeo
NMDA – *N*-metil-D-aspartato
NO – óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase
3-NP – ácido 3-nitropropionico
O₂^{•-} – radical superóxido

OH[•] – radical hidroxil

ONOO⁻ – peroxinitrito

PCr – fosfocreatina

PDC – L-*trans*-pirrolidina-2,4-dicarboxilato

SNC – sistema nervoso central

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
APRESENTAÇÃO	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo geral	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1. Erros Inatos do Metabolismo	10
3.2. Acidemias Orgânicas	11
3.3. Acidemia Glutárica tipo I	12
3.3.1. Diagnóstico.....	14
3.3.2. Achados Neuropatológicos.....	14
3.3.3. Manifestações clínicas.....	16
3.3.4. Incidência.....	17
3.3.5. Tratamento.....	17
3.3.6. Fisiopatologia.....	18
3.4. Sistema Glutamatérgico	22
3.5. Excitotoxicidade glutamatérgica	23
3.6. Efeito dos Radicais Livres no Sistema Nervoso Central	25
3.7. Creatina	30
3.7.1. Neuroproteção da Creatina em Modelos de Doenças Neurodegenerativas.....	32
3.7.2. Neuroproteção da Creatina em Modelos de Erro Inato do Metabolismo.....	33

4. CAPÍTULOS.....	35
4.1. Capítulo I: Artigo publicado.....	37
4.2. Capítulo II: Manuscrito aceito.....	48
5. DISCUSSÃO.....	84
6. CONCLUSÕES.....	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigos, os quais se encontram no item CAPÍTULOS. Esse item, por sua vez, está subdividido em Capítulo I e Capítulo II. No capítulo I encontra-se o artigo científico publicado. No capítulo II está o manuscrito do segundo artigo, já aceito para a publicação. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos capítulos e representam a íntegra deste estudo. Os itens, DISCUSSÃO E CONCLUSÕES, encontram-se no final desta dissertação e apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico e o manuscrito contido neste trabalho. As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A deficiência de glutaril-CoA desidrogenase (GCDH) ou GA-I é uma doença metabólica autossômica recessiva devido a um bloqueio na via de catabolismo dos aminoácidos L-lisina, L-hidroxilisina e L-triptofano, levando a um acúmulo predominante de GA, em menor extensão de 3-OH-GA e ocasionalmente de ácido glutacônico (GOODMAN & FRERMAN, 2001). Aproximadamente 500 pacientes foram identificados, mundialmente distribuídos, desde o primeiro relato desta acidemia (GOODMAN et al., 1975; KÖLKER et al., 2006), e mais de 150 mutações patogênicas já foram descritas para o gene da GCDH (ZSCHOCKE et al., 2000; CHRISTENSEN et al., 2004).

Patologicamente, a GA-I é caracterizada por atrofia frontotemporal, degeneração estriatal, atraso na maturação cerebral, formação esponjiforme e redução da substância branca cerebral (AMIR et al., 1987; CHOW et al., 1988; BRISMAR & OZAND, 1995; HOFFMANN & ZSCHOCKE, 1999; KÖLKER et al., 2006). Nos primeiros meses de vida, os sinais da doença são inespecíficos e incluem hipotonia, irritabilidade e macrocefalia. As crianças não tratadas desenvolvem graves sintomas clínicos caracterizados por uma progressiva distonia/discinesia, algumas associadas à extrema hipotonia, rigidez, convulsões e espasticidade (HOFFMANN & ZSCHOCKE, 1999).

Embora as alterações neurológicas sejam predominantes na GA-I, pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual o GA é neurotóxico. Além disso, a causa primária da degeneração estriatal na GA-I ainda não está bem esclarecida e encontra-se sob intensas investigações. Nesse contexto, vários estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar a neuropatogênese desta acidemia, utilizando diferentes sistemas *in vitro* e *in vivo*, através da exposição dos tecidos cerebrais aos metabólitos acumulados nesta acidemia (KÖLKER et al., 1999; 2000; 2001a,b; 2002a,b; DE MELLO et al., 2001; KOELLER et al., 2002; LATINI et al., 2002; 2005a,b; DE OLIVEIRA MARQUES et al., 2003; FERREIRA et al., 2005, FIGHERA et al., 2006). De acordo com esses estudos, sugere-se que o GA e o 3-OH-GA podem induzir dano cerebral através de mecanismos de excitotoxicidade primária ou secundária (KÖLKER et al., 1999; 2000; 2002a,b; DE MELLO et al., 2001; FRIZZO et al., 2004; PORCIÚNCULA et al., 2004; ROSA et al., 2004; 2007), de estresse

oxidativo (LATINI et al., 2002; 2005b; DE OLIVEIRA MARQUES et al., 2003; FIGHERA et al., 2006) ou de bioenergética (ULLRICH et al., 1999; SILVA et al., 2000; DAS et al., 2003; FERREIRA et al., 2005; LATINI et al., 2005a). Além disso, esses mecanismos também podem cooperar em uma via sinérgica para causar as alterações neuropatológicas encontradas nos pacientes glutaricoacidêmicos (KÖLKER et al., 2004; WAJNER et al., 2004).

Em relação à terapia, o tratamento desses pacientes consiste na restrição dietética dos aminoácidos hidroxilisina, triptofano e principalmente lisina (GOODMAN & FRERMAN, 2001; KÖLKER et al., 2006), além de uma suplementação com dieta hipercalórica, L-carnitina e riboflavina, as quais têm apresentado bons resultados na prevenção das crises encefalopáticas agudas e ao subsequente dano estriatal (HOFFMANN et al., 1996; STRAUSS et al., 2003; KYLLERMAN et al., 2004).

Entretanto, devido à escassez de medidas terapêuticas efetivas para essa acidemia, vários estudos têm investigado novas terapias adjuvantes com o objetivo de auxiliar no tratamento desta patologia (DAS et al., 2003; FIGHERA et al., 2006; COMAN et al., 2008). Nesse contexto, podemos citar a creatina (Cr), um composto guanidínico endógeno que tem mostrado efeitos neuroprotetores em uma variedade de modelos experimentais de doenças neurodegenerativas (MATTHEWS et al., 1999; KLIVENYI et al., 1999; KLEIN & FERRANTE, 2007), eventos isquêmicos (PRASS et al., 2007; ANDRES et al., 2008) e também em danos oxidativos e excitotóxicos (MALCON et al., 2000). Além destes, outros estudos mostraram que a administração de Cr previne as convulsões e as alterações motoras induzidas pelo ácido metilmalônico (MMA; ROYES et al., 2003; VASQUES et al., 2006), além de proteger da redução dos níveis de fosfocreatina induzida pela administração de 3-OH-GA em culturas corticais de ratos (DAS et al., 2003), sugerindo uma ação neuroprotetora da Cr na ação de metabólitos que acumulam nas acidemias orgânicas, como a GA-I. Contudo até o presente momento, pouco se sabe sobre o efeito da administração aguda de Cr sobre os parâmetros comportamentais e neuroquímicos induzidos pela injeção intraestriatal de GA em ratos e se, uma baixa concentração deste ácido orgânico poderia ser responsável pelo início da degeneração estriatal apresentada dos pacientes glutaricoacidêmicos. Portanto, a compreensão da gênese das ações neurotóxicas do GA é importante não somente para um entendimento mais preciso do desenvolvimento da GA-I, mas também para

o planejamento de uma terapia adjuvante que possa contribuir efetivamente com o tratamento desta acidemia.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da Cr sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pelo GA, um metabólito acumulado na GA-I, em ratos. Além disso, evidenciar um provável mecanismo de ação primário para esse ácido orgânico, visando dessa forma uma melhor compreensão dos mecanismos neurotóxicos desse metabólito.

2.2. Objetivos específicos

Para um melhor entendimento dos experimentos realizados convém dividi-los:

Capítulo I

1. Verificar o efeito da administração de Cr (50, 150 e 300 mg/kg; v.o.) sobre a latência para a primeira convulsão e a duração dos episódios convulsivos induzidos pela injeção intraestriatal de GA (4 μmol /estriado) em ratos.
2. Avaliar o efeito da administração prévia de Cr (300 mg/kg, v.o.) nas alterações eletrográficas induzidas injeção intraestriatal de GA (4 μmol /estriado).
3. Investigar o efeito da administração prévia de Cr (50, 150 e 300 mg/kg; v.o.) no conteúdo de proteína carbonil induzida pela injeção intraestriatal de GA (4 μmol /estriado) em ratos *ex vivo*.
4. Avaliar o efeito da administração prévia de Cr (50, 150 e 300 mg/kg; v.o.) na redução da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase induzida pela injeção intraestriatal de GA (4 μmol /estriado) em ratos *ex vivo*.
5. Verificar o efeito do GA (10 nM) e da Cr (10 μM), sobre a ligação do L-[^3H]glutamato aos seus transportadores (meio dependente de Na^+), através

da captação de L-[³H]glutamato em sinaptossomas de estriado de ratos *in vitro*.

Capítulo II

6. Avaliar o efeito *in vitro* do GA (10 nM) na captação de L-[³H]glutamato (meio dependente de Na⁺) ao longo do tempo (1, 3, 5, 10, 15 e 30 minutos) em sinaptossomas de estriado de ratos.
7. Investigar a participação dos transportadores de glutamato na redução da captação de L-[³H]glutamato induzida pelo GA (10 nM) em sinaptossomas de estriado de ratos através do uso do PDC (50 μM), um inibidor não específico dos transportadores de glutamato.
8. Avaliar os parâmetros cinéticos, velocidade máxima (V_{Max}) e constante de dissociação (K_D), da captação de L-[³H]glutamato na presença do GA (10 nM) em sinaptossomas de estriado de ratos.
9. Verificar o efeito *in vitro* do GA (10 nM) ao longo do tempo (1, 3, 5, 10, 15 e 30 minutos) sobre a formação de ER, através da determinação da oxidação da diclorofluoresceína (DCFH), em sinaptossomas de estriado de ratos.
10. Investigar o efeito de um composto antioxidante, o trolox (0.6, 3 e 6 μM), na formação de ER (oxidação da DCFH) induzidas pelo GA (10 nM) em sinaptossomas de estriado de ratos *in vitro*.
11. Investigar o efeito do trolox (0.6, 3 e 6 μM) na redução da captação de L-[³H]glutamato induzida pelo GA (10 nM) em sinaptossomas de estriado de ratos *in vitro*.
12. Verificar o envolvimento dos antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA (MK-801) e AMPA/cainato (CNQX) na formação de ER (oxidação da DCFH) induzidas pelo GA (10 nM) em sinaptossomas de estriado de ratos *in vitro*.

13. Avaliar se o GA (10 nM) possui atividade oxidante *per se*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Erros Inatos do Metabolismo

EIMs são distúrbios hereditários, resultado de deficiências em atividades enzimáticas, o que ocasiona um bloqueio de diversas rotas metabólicas. Em consequência deste bloqueio metabólico, pode ocorrer o acúmulo de precursores da reação catalisada pela enzima envolvida, com a formação de rotas metabólicas alternativas e a consequente deficiência de produtos essenciais ao organismo (BICKEL, 1987), provocando assim, distúrbios no desenvolvimento físico e mental (OBERHOLZER et al., 1967).

ARCHIBALD E. GARROD, em 1908, foi o primeiro a empregar o termo EIM para designar doenças como a alcaptonúria, que se caracteriza bioquimicamente pelo aumento da excreção de ácido homogentísico na urina dos indivíduos afetados. GARROD observou uma maior frequência desta doença em indivíduos de uma mesma família e com maior incidência de consangüinidade entre os pais dos pacientes. Baseando-se nas leis de Mendel e no fato de que os pais dos indivíduos afetados não apresentavam a doença, GARROD propôs um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio.

Atualmente, o termo EIM se aplica a um grupo de doenças geneticamente determinadas que resultam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, enzimática ou não, pertencente ao metabolismo (SCRIVER et al., 2001). Até o momento, foram descritos mais de 500 EIMs, a maioria deles envolvendo processos de síntese (anabolismo), degradação (catabolismo), transporte e armazenamento de moléculas no organismo (SCRIVER et al., 2001).

Os EIMs afetam aproximadamente 1 a cada 500/2000 recém nascidos vivos (BARIC et al., 2001) e apesar de serem eventos raros, esse grupo de doenças representa um importante problema de saúde e seu diagnóstico, freqüentemente, se constitui em desafio para o clínico.

3.2. Acidemias Orgânicas

As acidemias ou acidurias orgânicas são um grupo de EIM caracterizadas pelo acúmulo de um ou mais ácidos orgânicos nos líquidos biológicos e tecidos dos pacientes afetados devido à deficiência da atividade de enzimas do metabolismo de aminoácidos, lipídeos ou carboidratos (CHALMERS & LAWSON, 1982). Um subgrupo de acidemias orgânicas tem sido classificado como doenças de ácidos orgânicos “cerebrais” (HOFFMANN et al., 1994) devido às manifestações neurológicas serem predominantes ou mesmo exclusivas, sendo que neste grupo encontra-se a GA-I.

Os sintomas neurológicos nas acidemias orgânicas são freqüentemente manifestados durante crises agudas precipitadas por estresse catabólico. Durante esses episódios existe um déficit de energia, com a mobilização dos estoques de carboidratos, ácidos graxos e proteínas. Estes são catabolisados, mas devido ao bloqueio metabólico, os ácidos orgânicos e outros compostos são acumulados. Neste contexto, tem sido sugerido que alguns desses metabólitos podem agir como toxinas endógenas e podem tornar-se neurotóxicos (MCLAUGHLIN et al., 1998; KÖLKER et al., 2002a; 2004).

Clinicamente, os pacientes afetados apresentam predominantemente disfunções neurológicas em suas mais diversas formas de expressão: regressão neurológica, convulsões, coma, ataxia, hipotonia, hipertonia, irritabilidade, tremores, movimentos coreatetóticos, tetraparesia espástica, atraso no desenvolvimento psicomotor, retardo mental, entre outros (SCRIVER et al., 2001).

Bioquimicamente, eles apresentam cetose, cetonúria, neutropenia, trombocitopenia, acidose metabólica, baixos níveis de bicarbonato, hiperglicemia, hiperamonemia, hipo/hiperglicemia, acidose láctica, aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres e outros (SCRIVER et al., 2001).

Além disso, radiologicamente tem sido encontradas na maioria dos pacientes afetados por essas acidemias, alterações na substância branca (hipomielização e/ou desmielização), atrofia cerebral generalizada ou dos gânglios da base (necrose ou calcificação), atrofia frontotemporal e cerebelar, e megaencefalia (MAYATEPEK et al., 1996).

A incidência dos EIMs é pouco conhecida devido à dificuldade de diagnóstico clínico e a deficiência de métodos laboratoriais para sua identificação. Entretanto, na

Holanda, país referência para o diagnóstico de EIMs, a incidência destes é estimada em 1: 2.200 recém-nascidos, enquanto que, na Alemanha, Israel e Inglaterra é de aproximadamente 1: 6.000/9.000 nascimentos (HOFFMANN et al., 2004). Em países onde a taxa de consangüinidade é elevada, como na Arábia Saudita, a frequência é de 1: 740 nascidos vivos (RASHED et al., 1994).

Frequência estimada de alguns EIMs	
Fenilcetonúria (caucasianos)	1/15.000
Acidemia glutárica tipo I	1/30.000
Homocistinúria	1/100.000
Acidemia metilmalônica	1/100.000

Tabela 1. Frequência estimada de alguns EIMs

Em 1980, CHALMERS e colaboradores demonstraram que as acidemias orgânicas eram os EIMs mais freqüentes em crianças hospitalizadas, incentivando assim, diversos estudos clínicos a respeito dessas doenças. De fato, em função dos progressos feitos no campo do diagnóstico dos EIMs, evidenciou-se que as acidemias orgânicas são, realmente, os erros inatos mais freqüentes na população (SCRIVER et al., 2001; WAJNER et al., 2001).

3.3. Acidemia Glutárica tipo I

A GA-I (OMIM # 231670) é um EIM que foi descrito pela primeira vez por Goodman e colaboradores em 1975. É caracterizada por uma deficiência parcial ou total na atividade da enzima da matriz mitocondrial GCDH (E.C. 1.3.99.7). A GCDH está envolvida no catabolismo dos aminoácidos L-lisina, L-hidroxilisina e L-triptofano (GOODMAN & FRERMAN, 2001), catalisando a descarboxilação oxidativa do glutaril-CoA a crotonil-CoA e CO₂, e transferindo os elétrons para a cadeia respiratória via flavoproteína transferidora de elétrons (LENICH e GOODMAN, 1986). Essa reação possui duas diferentes etapas: a desidrogenação de glutaril-CoA a

glutaconil-CoA e a descarboxilação de glutaconil-CoA a crotonil-CoA (HÄRTEL et al., 1993).

Com o bloqueio da atividade da enzima GCDH, formam-se rotas metabólicas alternativas que culminam na presença de concentrações elevadas de GA, 3-OH-GA e, algumas vezes, ácido glutacônico nos fluidos biológicos (plasma, urina e líquor) e tecidos corporais dos indivíduos afetados (GOODMAN et al., 1975; GOODMAN & FRERMAN, 2001; Figura 1).

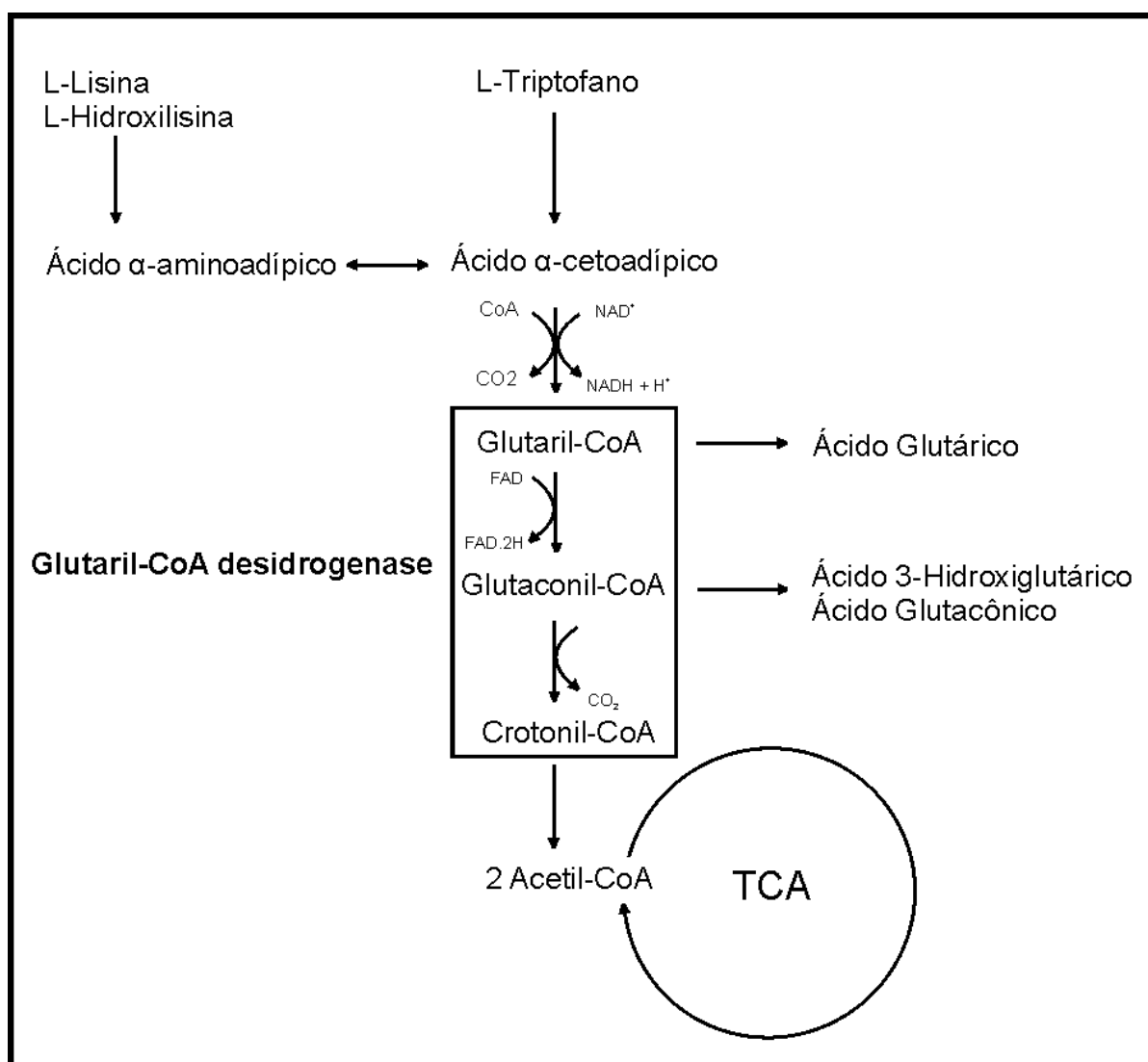


Figura 1. Deficiência da enzima glutaril-CoA desidrogenase (Adaptado de GOODMAN & FRERMAN, 2001).

Tem sido proposto que o acúmulo desses ácidos orgânicos pode apresentar um efeito neurotóxico que seria o responsável pelas mudanças neuropatológicas na doença. As concentrações plasmáticas destes ácidos variam entre 5 e 400 μmol/L

(HOFFMANN et al., 1991, 1996; MERINERO et al., 1995), entretanto, as concentrações cerebrais podem atingir 500–5000 $\mu\text{mol/L}$ para o GA e 40–200 $\mu\text{mol/L}$ para o 3-OH-GA (SAUER et al., 2006).

3.3.1. Diagnóstico

O diagnóstico precoce continua sendo determinante para um melhor prognóstico para os pacientes afetados com GA-I. No entanto, a identificação desta acidemia apresenta grandes dificuldades, pois o grau de deficiência da enzima não está correlacionado com a intensidade dos sintomas apresentados pelos pacientes, e a excreção de GA pode ser normal em pacientes que apresentam sintomas graves (GOODMAN & FRERMAN, 2001).

Entretanto, a presença de quantidades elevadas de GA e 3-OH-GA nos líquidos biológicos (especialmente urina) dos pacientes (GOODMAN et al., 1977; FUNK et al., 2005; KÖLKER et al., 2006) constitui o marcador bioquímico da GA-I, sendo realizada através da detecção desses compostos e seus ésteres de glicina e carnitina na urina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (HOFFMANN, 1994; KÖLKER et al., 2006).

Nos pacientes que apresentam excreção pouco elevada, ausente ou normal de GA (MERINERO et al., 1995; HOFFMANN et al., 1996; BARIC et al., 1998), a determinação da atividade da GCDH em fibroblastos ou leucócitos deve ser realizada sempre que houver fortes suspeitas clínicas e neuro-radiológicas da doença (GOODMAN & FRERMAN, 2001).

Atualmente, mais de 150 mutações já foram descritas para o gene da GCDH (ZSCHOCKE et al., 2000; CHRISTENSEN et al., 2004), não existindo correlação entre o genótipo e fenótipo clínico (PINEDA et al., 1998; CHRISTENSEN et al., 2004). Portanto, devido a esse grande número de mutações conhecidas, a análise mutacional não é muito utilizada para fins de diagnóstico.

3.3.2. Achados Neuropatológicos

Patologicamente, a GA-I é caracterizada principalmente por atrofia frontotemporal cortical ao nascimento, formação espongiforme, diminuição de substância branca (leucoencefalopatia) e uma característica degeneração estriatal

(caudado e putâmen) bilateral (KYLLEMAN et al., 1994), a qual ocorre durante crises encefalopáticas precipitadas por doenças febris ou mesmo vacinações rotineiras nos primeiros anos de vida (AMIR et al., 1987; CHOW et al., 1988; BRISMAR & OZAND, 1995; HOFFMANN & ZSCHOCKE, 1999). Frequentemente, os pacientes apresentam um alargamento dos espaços subaracnóides que, devido à alta irrigação sanguínea, os tornam suscetíveis a hemorragias agudas (DRIGO et al., 1996; HOFFMANN & ZSCHOCKE, 1999).

De acordo, exames neuroradiológicos em pacientes afetados demonstraram atrofia frontotemporal cortical, degeneração estriatal, dilatação dos ventrículos laterais e atraso na mielinização (HOFFMANN et al., 1991; TWOMEY et al., 2003; NEUMAIER-PROBST et al., 2004; Figura 2).

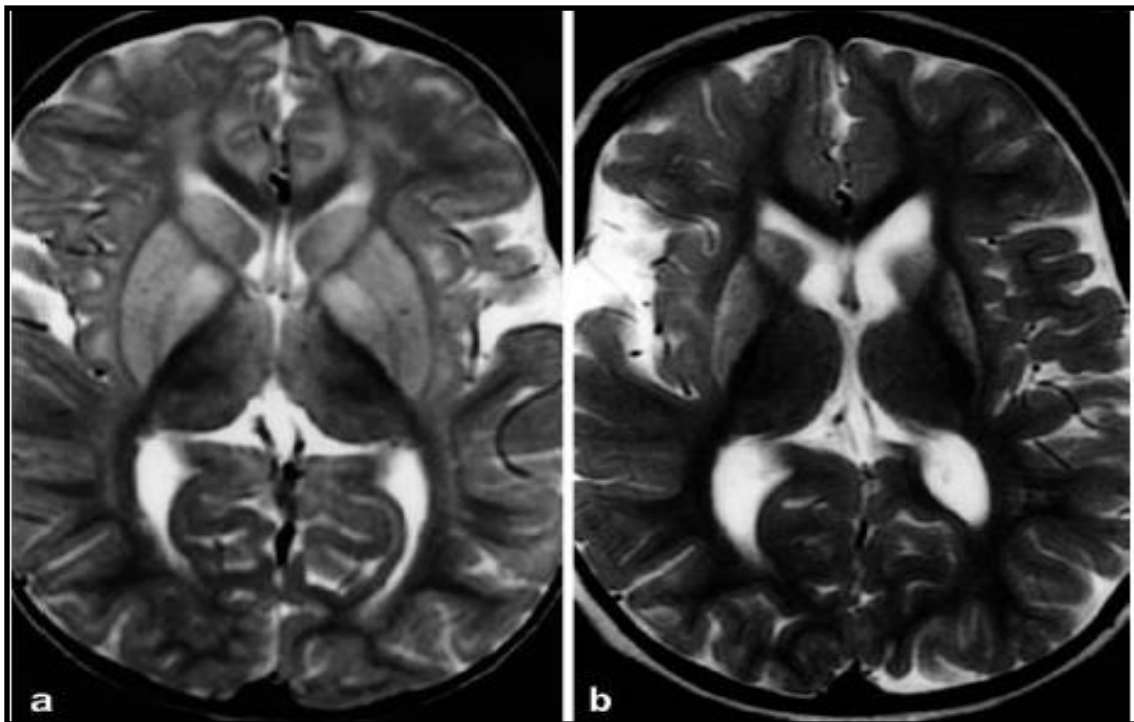


Figura 2. Ressonância magnética nuclear de crânio de criança com GA-I. a) Aumento anormal da intensidade do sinal nos núcleos caudado e putâmen; b) Dois anos mais tarde, o estriado ainda apresenta uma intensidade de sinal anormal, além de uma acentuada redução. Também observa-se uma dilatação dos ventrículos cerebrais neste intervalo (extraído de TWOMEY et al., 2003).

3.3.3. Manifestações clínicas

A macrocefalia, um dos achados clínicos mais frequentes, geralmente já está presente ao nascimento (GOODMAN & FRERMAN, 2001).

Aproximadamente 90% das crianças afetadas apresentam severos sintomas clínicos antes dos 24 meses de idade, e nenhuma crise encefalopática aguda tem sido descrita após os 5 anos de vida, sugerindo que a vulnerabilidade é restrita a um período limitado de desenvolvimento do cérebro (HOFFMANN et al., 1996; BJUGSTAD et al., 2000).

Após as crises encefalopáticas, surgem sintomas relacionados à destruição estriatal, como hipotonia, convulsões, rigidez muscular, espasticidade, distonia e discinesia (HOFFMANN & ZSCHOCKE, 1999; STRAUSS et al., 2003; KÖLKER et al., 2004; Figura 3). Ataxia, irritabilidade, retardo mental e demência também estão entre os achados clínicos da GA-I (KÜLKENS et al., 2005).

Além dessas manifestações clínicas, os pacientes apresentam um quadro laboratorial que caracteriza-se, principalmente, por acidose metabólica, hipercetonemia, hiperamonemia, hipoglicemia, neutropenia e trombocitopenia (GOODMAN & FRERMAN, 2001).



Figura 3. Manifestações clínicas de crianças com GA-I. a) Movimentos distônicos dos membros inferiores; b) Discinesia Facial (ambos extraído de BARREIRO et al., 2004).

3.3.4. Incidência

Em caucasianos, esta doença tem uma prevalência estimada em 1:30.000 (GOODMAN & FRERMAN, 2001) ou 1:100.000 nascimentos (LINDNER et al., 2004). Porém, pode ter uma prevalência aumentada em até 1:300 nascidos vivos (KÖLKER et al., 2004; 2006) em comunidades geneticamente homogêneas, como por exemplo, na Ordem Amish da Pensilvânia (BIERY et al., 1996) e nos índios Salteaux/Ojibway do Canadá (GREENBERG et al., 1995).

3.3.5. Tratamento

Uma ampla variedade de medicamentos tem sido usada na terapêutica da GA-I com alguns resultados satisfatórios, entre eles podemos citar os anticonvulsivantes (YAMAGUCHI et al., 1987; HOFFMANN et al., 1996), os anticolinérgicos e a toxina botulínica (BURLINA et al., 2004). Além disso, ZINNANTI e colaboradores (2007) propuseram a utilização da suplementação com glicose e homoarginina como terapia adjuvante para reduzir o acúmulo cerebral dos metabólitos tóxicos gerados pela deficiência da GCDH, baseado em estudo de um modelo animal de GA-I (ZINNANTI et al., 2006).

Entretanto, o diagnóstico precoce continua sendo determinante para um bom prognóstico dos pacientes glutaricoacidêmicos. A restrição dietética dos aminoácidos hidroxilisina, triptofano e principalmente lisina é essencial para um adequado desenvolvimento destes pacientes (GOODMAN & FRERMAN, 2001; KÖLKER et al., 2006). Nesse contexto, a suplementação com dieta hipercalórica, L-carnitina e riboflavina têm demonstrado bons resultados na prevenção das crises encefalopáticas agudas e subsequente dano estriatal na maioria das crianças afetadas (HOFFMANN et al., 1996; STRAUSS et al., 2003; KYLLERMAN et al., 2004). Além disso, a avaliação e intervenção neurocirúrgica podem ser necessárias em pacientes com lesões estruturais associadas com esta doença (HOU et al., 2007).

3.3.6. Fisiopatologia

A atividade da enzima GCDH varia de 0 a 10% da atividade normal nos tecidos dos pacientes afetados, sendo detectada em culturas de fibroblastos, amniócitos, leucócitos periféricos, fígado, rim e cérebro.

Após a determinação clínica da deficiência de GCDH, foi proposto que o acúmulo dos ácidos orgânicos poderia ser a causa das alterações neuropatológicas encontradas nos pacientes com GA-I (FLOTT-RAHMEL et al., 1997; LIMA et al., 1998; HOFFMANN & ZSCHOCKE, 1999; GOODMAN, 2004; WAJNER et al., 2004). Entretanto, apesar dos sintomas neurológicos serem predominantes, pouco se sabe sobre a causa da degeneração dos gânglios da base e o mecanismo pelo qual o GA e 3-OH-GA são neurotóxicos (GOODMAN & FRERMAN, 2001).

Um dos primeiros mecanismos propostos para a fisiopatologia da GA-I foi relacionado à neurotransmissão GABAérgica, baseado na inibição competitiva da glutamato descarboxilase (EC 4.1.1.15), enzima que catalisa a conversão do glutamato a ácido γ -aminobutírico (GABA), pelo GA (K_i : 1.3×10^{-3} M), 3-OH-GA e ácido glutacônico (STOKKE et al., 1976), sugerindo assim que o desequilíbrio na produção de GABA poderia estar envolvido com a fisiopatogenia da GA-I (WAJNER et al., 2004). Nesse contexto, estudos mostraram que as convulsões e o estresse oxidativo induzidos pela injeção intraestriatal de GA são prevenidos por muscimol, um agonista de receptores GABA_A, sugerindo a participação dos receptores GABAérgicos na neurotoxicidade induzida por este ácido orgânico em ratos (LIMA et al., 1998; FIGHERA et al., 2006). Contudo, concentrações reduzidas de GABA no estriado (caudato e putâmen) foram encontradas somente em um paciente (LEIBEL et al., 1980). Além disso, ULLRICH e colaboradores (1999) não encontraram efeitos do 3-OH-GA sobre receptores GABA em oócitos de *Xenopus laevis*.

Na última década, distintos mecanismos têm sido propostos para explicar a fisiopatogenia do dano cerebral na GA-I. Entre esses mecanismos podemos citar as alterações no metabolismo energético (ULLRICH et al., 1999; SILVA et al., 2000; DAS et al., 2003; FERREIRA et al., 2005; LATINI et al., 2005a), a produção de ER (LATINI et al., 2002; 2005b; DE OLIVEIRA MARQUES et al., 2003; FIGHERA et al., 2006) e a excitotoxicidade primária ou secundária (KÖLKER et al., 1999; 2000; 2002a,b; DE MELLO et al., 2001; FRIZZO et al., 2004; PORCIÚNCULA et al., 2004; ROSA et al., 2004; 2007).

Em relação ao metabolismo energético, estudos mostraram que o 3-OH-GA provoca uma moderada inibição dos complexos II e V da cadeia respiratória e reduz significativamente os níveis de fosfocreatina (PCr) em culturas de neurônios de ratos (ULLRICH et al., 1999; DAS et al., 2003). Da mesma forma, LATINI e colaboradores (2005a) evidenciaram uma inibição do complexo II da cadeia respiratória pelo 3-OH-GA em homogeneizados de córtex cerebral e células C6 de glioma de ratos. Além disso, o mesmo estudo demonstrou que o 3-OHGA pode interferir com o consumo de oxigênio em preparações mitocondriais, funcionando talvez, como um desacoplador da fosforilação oxidativa em situações onde a mitocôndria esteja sob condições de estresse. Entretanto, um estudo realizado em partículas submitocondriais de coração bovino não mostrou nenhum efeito do 3-OH-GA sobre os complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons (SAUER et al., 2005). Em relação ao GA, foi mostrado que este metabólito inibe os complexos I-III e II-III da cadeia respiratória, diminui a produção de CO₂ e os níveis de ATP em córtex cerebral de ratos (SILVA et al., 2000). FERREIRA e colaboradores (2005; 2007) também mostraram uma inibição dos complexos I-III, II, II-III e da enzima creatina quinase (CK) em músculo esquelético e cérebro de ratos tratados cronicamente com GA. A partir destes achados, tem sido postulado que o GA pode causar interferência no metabolismo aeróbico celular, levando provavelmente a uma redução na produção de ATP.

A depleção energética tem sido associada à excitotoxicidade e ao dano celular oxidativo pela formação de radicais livres (GREENE et al., 1993; WÜLLNER et al.; 1994; GREENE & GREENAMYRE, 1995; HASSEL & SONNEWALD, 1995; MCNAUGHT et al., 1995; ROSENOW et al., 1995; ZEEVALK et al., 1995), e parece estar intimamente relacionada à patogênese de diferentes doenças neurodegenerativas (COYLE & PUTTFARCKEN, 1993; JENNER, 1994; SCHULZ & BEAL, 1995), incluindo esclerose lateral amiotrófica (PLAITAKIS & CONSTANTAKAKIS, 1993; ROTHSTEIN et al., 1993), mal de Parkinson (JENNER, 1994; MCNAUGHT et al., 1995), doença de Alzheimer (JENNER, 1994; HARRIS et al., 1995), coréia de Huntington (JENNER, 1994; LIPTON & ROSENBERG, 1994; BURNS et al., 1995) e as acidemias orgânicas (WAJNER et al., 2004).

Neste cenário, vários trabalhos relacionam o aumento na produção de radicais livres e a redução das defesas antioxidantes no cérebro de ratos com a neurotoxicidade induzida pelo GA e 3-OH-GA (KÖLKER et al., 2001b; LATINI et al.,

2002; 2005b; 2007; DE OLIVEIRA MARQUES et al., 2003; FIGHERA et al., 2006). LATINI e colaboradores (2002, 2005b) mostraram que o 3-OH-GA induz aumento na lipoperoxidação, na produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), além de diminuir as defesas antioxidantes no córtex cerebral e no estriado de ratos. Outros estudos mostraram que o 3-OH-GA causa um aumento na geração de ER em culturas de neurônios de telencéfalos de embriões de pinto, e que esse aumento foi reduzido após incubação prévia com Cr (KÖLKER et al., 2001b), sugerindo a participação das ER na fisiopatologia da GA-I. Em relação ao GA, foi evidenciado que este ácido causa um aumento no conteúdo de proteína carbonil e na peroxidação lipídica estriatal (FIGHERA et al., 2006), bem como, reduz as defesas antioxidantes em diferentes estruturas cerebrais, no fígado e nos eritrócitos de ratos (DE OLIVEIRA MARQUES et al., 2003; LATINI et al., 2007). Além disso, foi mostrada uma redução nas concentrações de glutathiona cerebral e hepática em camundongos deficientes da enzima GCDH (SAUER et al., 2005). A partir destes achados, tem sido postulado que o GA pode causar interferência no metabolismo oxidativo celular, levando provavelmente a uma redução nas defesas antioxidantes e um aumento na produção de ER, e conseqüente excitotoxicidade.

Diversos trabalhos têm evidenciado o envolvimento de mecanismos excitotóxicos na patogênese da GA-I (GOODMAN et al., 1977; LEIBEL et al., 1980; CHOW et al., 1988; KÖLKER et al., 2003). O padrão das lesões no sistema nervoso central (SNC) causadas pela administração de glutamato em camundongos é, morfológicamente, semelhante àquelas observadas em pacientes portadores de GA-I, no que diz respeito à perda neuronal com vacuolização pós-sináptica, extensa fibrose gliosa estriatal e degeneração espongiiforme da substância branca cerebral (OLNEY, 1969). Devido a esses achados e também à similaridade estrutural existente entre o glutamato, o GA e o 3-OH-GA (FLOTT-RAHMEL et al., 1997; LIMA et al., 1998; HOFFMANN & ZSCHOCKE, 1999; WAJNER et al., 2004; GOODMAN, 2004; Figura 4), muitos estudos explicam a neurotoxicidade dessa acidemia pela interação desses ácidos orgânicos com receptores e transportadores glutamatérgicos.

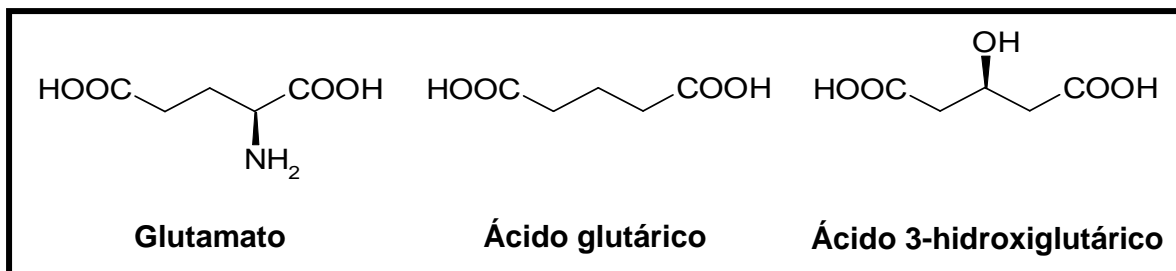


Figura 4. Similaridade estrutural entre glutamato, ácido glutárico e 3-hidroxi glutárico.

Em relação ao 3-OH-GA, KÖLKER e colaboradores (2000, 2002a) evidenciaram que este ativa seletivamente receptores do tipo NMDA compostos pelas subunidades NR1/NR2A e NR1/NR2B em culturas neuronais de telencéfalos de embriões de pinto. De acordo, ROSA e colaboradores (2004) também demonstraram que o 3-OH-GA interage com receptores glutamatérgicos NMDA. Nesse contexto, foi mostrado que a pré-incubação de culturas de neurônios com antagonistas específicos de receptores NMDA, bem como a administração desses antagonistas *in vivo* reduzem o dano celular provocado pelo 3-OH-GA em ratos (KÖLKER et al., 2000; DE MELLO et al., 2001). Colaborando com estes achados, BJUGSTAD e colaboradores (2001) mostraram que culturas de neurônios de ratos não se mostram sensíveis ao 3-OH-GA antes da expressão de receptores do tipo NMDA. No entanto, ULLRICH e colaboradores (1999), por meio de estudos eletrofisiológicos em diferentes sistemas celulares, não encontraram evidências de que o 3-OH-GA liga-se diretamente a receptores NMDA, sugerindo que uma redução no metabolismo energético poderia explicar de modo indireto a ativação desses receptores. Desta maneira, considerando que os receptores NMDA NR1/NR2B são predominantemente expressos no cérebro imaturo (MCDONALD et al., 1988) e que a ocorrência do dano neuronal depende do modelo em estudo, sugere-se a existência de uma dependência da distribuição regional e do período de desenvolvimento na suscetibilidade dos neurônios à toxicidade do 3-OH-GA (ULLRICH et al., 1999; KÖLKER et al., 2004; GOODMAN, 2004).

Quanto ao GA, foi mostrado que este metabólito inibe a captação e a ligação do L-[³H]glutamato a seus transportadores em sinaptossomas de cérebro de ratos (BENNETT et al., 1973; PORCIÚNCULA et al., 2000), aumentando o risco para superexcitação por uma elevação de glutamato na fenda sináptica. Este metabólito também pode reduzir a captação de L-[³H]glutamato em vesículas sinápticas, e

interagir com receptores glutamatérgicos metabotrópicos e ionotrópicos do tipo AMPA (não-NMDA) em cérebro de ratos (PORCIÚNCULA et al., 2004). DALCIN e colaboradores (2007) também demonstraram que o GA interage com receptores ionotrópicos não-NMDA. Neste contexto, as convulsões induzidas por administração intraestriatal de GA foram prevenidas por DNQX, um conhecido antagonista de receptores glutamatérgicos não-NMDA (LIMA et al., 1998).

3.4. Sistema Glutamatérgico

O glutamato é considerado o principal transmissor excitatório do SNC e está envolvido em diversos aspectos do funcionamento normal do cérebro (FONNUM, 1984; ERECINSKA & SILVER, 1990; OZAWA et al., 1998; DANBOLT, 2001), desempenhando um importante papel na cognição, formação e evocação da memória, aprendizado, manutenção da consciência, movimento, sensações (como dor e sabor), plasticidade celular, diferenciação e morte (FONNUM, 1984; LIPTON & ROSENBERG, 1994; OZAWA et al., 1998; DAIKHIN & YUDKOFF, 2000; DANBOLT, 2001). As ações do glutamato no cérebro dos mamíferos são mediadas pela ativação de canais iônicos permeáveis ao Ca^{2+} e Na^{+} chamados receptores ionotrópicos e através de receptores ligados a proteínas G chamados metabotrópicos, que também culminam no aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelulares via cascata de segundos mensageiros (NAKANISHI, 1992; HOLLMANN & HEINEMANN, 1994; OZAWA et al., 1998). Os receptores ionotrópicos podem ser divididos em receptores ligantes de *N*-metil-D-aspartato (NMDA: NR1/NR2A-D) e não-NMDA que incluem os receptores ligantes dos ácidos α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA: GluR1-4) e cainato (GluR5-7 e KA1-2). Os receptores metabotrópicos (mGluRs) são divididos nos grupos I, II e III (CONN & PIN, 1997; OZAWA et al., 1998). Esses receptores apresentam inúmeras diferenças nas suas propriedades farmacológicas apresentando um padrão distinto de afinidade por diferentes ligantes, variáveis de seletividade iônica e cinética (LIPTON & ROSENBERG, 1994; OZAWA et al., 1998; DANBOLT, 2001).

Após sua liberação pelo neurônio pré-sináptico, o glutamato extracelular é removido principalmente por um sistema de transportadores astrocitários de alta afinidade que utilizam o gradiente transmembrana do Na^{+} como força motriz

(DANBOLT, 2001; SCHLÜTER et al., 2002). Até hoje, cinco subtipos de transportadores glutamatérgicos foram descritos: GLAST (EAAT1), GLT1 (EAAT2), EAAC1 (EAAT3), EAAT4 e EAAT5 (DANBOLT, 2001). GLAST e GLT1 são predominantemente localizados em astrócitos e considerados os principais responsáveis pela captação de glutamato, enquanto EAAC1, EAAT4 e EAAT5 parecem ser mais abundantes em neurônios (ROTHSTEIN et al., 1996; BERGER & HEDIGER, 1998; KUGLER & SCHMITT, 1999; DANBOLT, 2001; AMARA & FONTANA, 2002).

O adequado funcionamento dos transportadores de glutamato é extremamente importante para manter os níveis extracelulares desse aminoácido excitatório baixo e assim garantir uma resposta adequada dos receptores às pequenas concentrações liberadas na fenda sináptica, bem como para evitar as ações tóxicas desse neurotransmissor (DANBOLT, 2001; DAIKHIN & YUDKOFF, 2000).

3.5. Excitotoxicidade glutamatérgica

LUCAS & NEWHOUSE (1957) foram os primeiros a descrever a habilidade do aminoácido glutamato em agir como neurotoxina, mas foi OLNEY que conceituou o termo excitotoxicidade demonstrando danos específicos no cérebro de camundongos devido à superestimulação de neurônios afetados após a administração de glutamato (OLNEY, 1969).

Desde a conceitualização de excitotoxicidade, ela tem sido considerada como o principal mecanismo de muitas doenças do SNC (LIPTON & ROSENBERG, 1994; FURUTA et al., 1997; MARAGAKIS & ROTHSTEIN, 2001; DANBOLT, 2001), incluindo acidente vascular cerebral, intoxicação, doenças neurodegenerativas e EIMs que apresentam manifestações neurológicas (OKUN et al., 2002).

A neurotoxicidade induzida pelo glutamato pode ter como causa: i) uma hipersensibilidade dos receptores ao glutamato devido a uma perda na seletividade iônica, aumento na densidade ou anormalidades na modulação; ii) um aumento na concentração de glutamato no meio extracelular (devido a um aumento na liberação ou uma redução da captação) e/ou iii) deficiência no metabolismo energético e nas defesas antioxidantes (GREENE & GREENAMYRE, 1996; OLNEY & DE

GUBAREFF, 1978; OBRENOVITCH et al., 2000; ROTHSTEIN et al., 1992; BATTAGLIOLI et al., 1993; ROBINSON & DOWD, 1997). Além disso, diversos estudos sugerem a participação de inibidores metabólicos e agentes oxidantes na toxicidade induzida pelo glutamato, uma vez que eles facilitam a ativação direta ou indireta de receptores NMDA. Entre eles podemos citar: a rotenona, o cianeto, o oxiaminoacetato, o 3-nitropropionato, o MMA, o GA e o 3-OH-GA (MCDONALD & SCHOEPP, 1993; BROUILLET et al., 1994; ZEEVALK et al., 1995; PAVLAKOVIĆ et al., 1995; DE MELLO et al., 1997, PORCIÚNCULA et al., 200; 2004; ROYES et al., 2003; 2006; FIGHERA et al., 2003; 2006).

Nesse contexto, os ácidos orgânicos que acumulam na GA-I têm sido considerados potenciais neurotoxinas devido à interação com receptores e transportadores glutamatérgicos. A estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos induz a um aumento no influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular e conseqüente ativação descontrolada de enzimas envolvidas no desenvolvimento e nas funções neuronais normais e na geração de radicais livres (LIPTON & ROSENBERG, 1994; SATTLER & TYMIANSKI, 2000). Além disso, o acúmulo de Ca^{2+} intracelular está envolvido na disfunção mitocondrial e conseqüente diminuição na produção de energia (COYLE & PUTTFARCKEN, 1993; GUNTER et al, 1994; DUGAN et al, 1995). A deficiência no metabolismo energético pode comprometer a captação de glutamato pelos astrócitos potencializando o efeito excitotóxico (LIPTON & ROSENBERG, 1994; DANBOLT, 2001).

Há evidências de que a depleção energética induzida por alguns ácidos orgânicos, como o MMA e o GA, desencadeie a despolarização neuronal e o dano celular por falência na atividade de ATPases de membranas (MCLAUGHLIN et al, 1998; SILVA et al., 2000; MALFATTI et al., 2003). De fato, a depleção energética aumenta a liberação de glutamato não só por mecanismos dependentes de Ca^{2+} (através da despolarização da membrana), mas também pela inibição e/ou reversão de mecanismos de recaptção deste aminoácido excitatório na pré-sinapse e nas células gliais, levando a um aumento de glutamato na fenda sináptica (MADL & BURGESSER, 1993). A produção de ER também está relacionada com a ativação de receptores glutamatérgicos e pode culminar no aumento das concentrações extracelulares de glutamato por inibir a função dos transportadores gliais de glutamato (VOLTERRA et al., 1994; TROTTI et al., 1996; 1998; DANBOLT, 2001).

Além disso, a estabilização do potencial de membrana de repouso pela Na^+, K^+ -ATPase é essencial para manutenção do bloqueio de magnésio dependente de voltagem do receptor NMDA, para a função de canais iônicos dependentes de voltagem e também aos transportadores de glutamato dependente de Na^+ . Portanto, a perda da atividade da Na^+, K^+ -ATPase pode diminuir o limiar para a superexcitação (GEGELASHVILI & SCHOUSBOE, 1997). O GA inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em homogenatos de cérebro de ratos (KÖLKER et al., 2002b; FIGHERA et al., 2006), e juntamente com a inibição dos complexos I-III, II e II-III da cadeia respiratória (SILVA et al., 2000; FERREIRA et al., 2005; 2007), podem causar déficit energético e ativação secundária dos receptores glutamatérgicos (KÖLKER et al., 2002b), potencializando as ações excitotóxicas do GA.

Dessa maneira, a despolarização da membrana pós-sináptica causada pela falência na atividade das ATPases leva à saída do íon Mg^{2+} , que bloqueia o canal do receptor NMDA de maneira dependente de voltagem, e permite a entrada de íons Na^+ e Ca^{2+} para o meio intracelular (MCDONALD & SCHOEPP, 1993). O dano excitotóxico primário é desencadeado pela entrada de Na^+ através de receptores ionotrópicos do subtipo AMPA/Kainato (Chan et al, 1979). O aumento de Ca^{2+} , via ativação de receptores do subtipo NMDA, leva à ativação de enzimas dependentes deste íon, e que estão envolvidas na produção de radicais livres como xantina oxidase (SAID et al., 2000), fosfolipase C (UMEMURA et al., 1992), ciclooxigenase (PEPICELLI et al., 2005), calcineurina (ARMSTRONG, 1989; SNYDER & SABATINI, 1995), óxido nítrico sintase (NOS), que produz NO (SNYDER & BREDT, 1992), e a própria disfunção mitocondrial (PATEL, 2002), que estão associadas ao aparecimento de convulsões e morte celular. Nesse contexto, a excitotoxicidade também tem sido relacionada a um aumento na produção de ER (PATEL, 2004).

3.6. Efeito dos Radicais Livres no Sistema Nervoso Central

Do ponto de vista químico, um radical livre é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula capaz de existir sob forma independente, que contém um ou mais elétrons desemparelhados (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; Figura 5). Portanto, os radicais livres podem ser formados pela adição ou pela perda de um elétron de uma

substância não-radical. Entretanto, existem compostos tão reativos quanto os radicais livres que não possuem elétrons não-pareados na última camada e, portanto, não podem ser classificados como radicais livres (DRÖGE, 2002). Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN).

As ERO geralmente têm uma meia-vida curta, e sua recombinação química é quase imediata. Estudos mostram que elas têm uma forte tendência para estabilizar sua órbita externa captando um elétron de outro átomo ou molécula, que por sua vez se torna uma molécula radicalar.

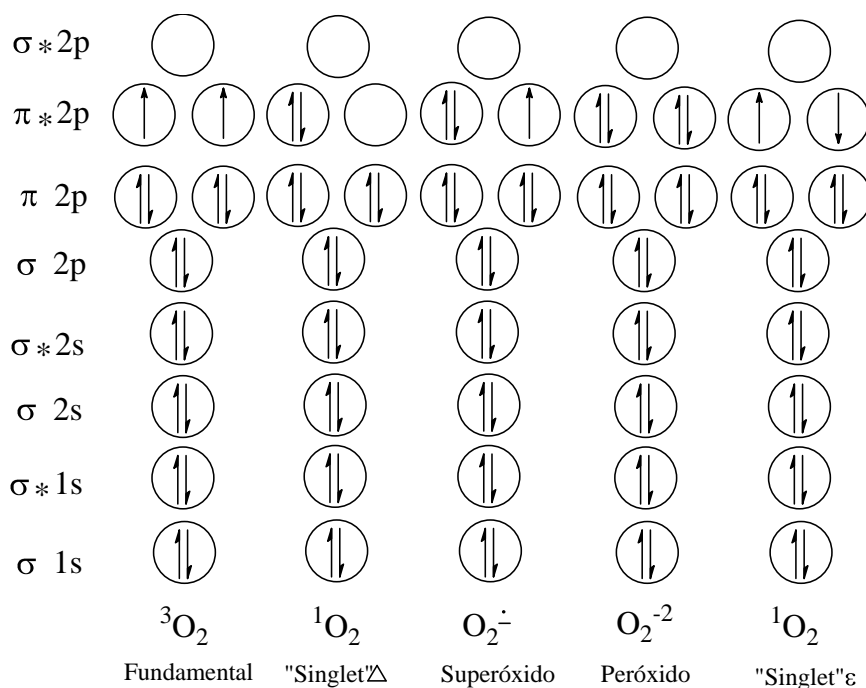
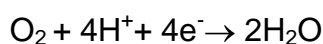


Figura 5. Configuração eletrônica das Espécies Reativas de Oxigênio (Haliwell e Gutteridge, 1999).

Uma fonte importante de radicais livres é o sistema de transporte de elétrons mitocondrial (DEL MAESTRO, 1980; & POWIS & POWIS, 1988), sendo seu principal sítio de formação complexo citocromo b-ubiquinona (TYLER, 1975). Na mitocôndria, a citocromo oxidase promove a redução completa de uma molécula de oxigênio (O_2) em duas moléculas de água (H_2O) e, para isso, são necessários quatro elétrons:



Contudo, nem sempre o O_2 se transforma diretamente em H_2O . Como conseqüência de sua configuração eletrônica, a molécula de O_2 tem forte tendência, durante as reações, em receber um elétron de cada vez, formando uma série de intermediários tóxicos e reativos (MENEHINI, 1987), tais como: o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o H_2O_2 , ambos listados na figura acima, e o radical hidroxil (OH^{\bullet}). O primeiro e o último apresentam elétrons desemparelhados e são classificados como radicais livres. Já o H_2O_2 não possui elétrons desemparelhados na última camada, e é classificado como uma ERO (FISHER, 1987).

O $O_2^{\bullet-}$ é o primeiro intermediário formado a partir da redução incompleta do O_2 molecular na formação da H_2O (HARRIS, 1992), e a partir dele podem se formar outras ERO, como o OH^{\bullet} e o H_2O_2 (ESTERBAUER et al., 1986; PRYOR & CASTLE, 1984). Em condições fisiológicas, o H_2O_2 é formado na mitocôndria em função da atividade metabólica (CHANCE et al., 1979). Tem sido mostrado que, em alguns órgãos, a atividade celular leva à formação de H_2O_2 , tanto pelos peroxissomos quanto por enzimas citosólicas (BOVERIS & CHANCE, 1973; CHANCE et al., 1979). O H_2O_2 é gerado a partir da dismutação do $O_2^{\bullet-}$, sendo esta reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD; Figura 6; FRIDOVICH, 1975; 1978). A isoforma da SOD presente na matriz mitocondrial é dependente de manganês (MnSOD), enquanto isoforma da SOD presente no citosol é a dependente de cobre e zinco (CuZnSOD, FRIDOVICH, 1978). O radical livre mais reativo é o OH^{\bullet} , que pode ser formado pela reação do H_2O_2 com íons Cu^+ ou Fe^{2+} . Esta reação é conhecida como reação de Fenton (Figura 7).

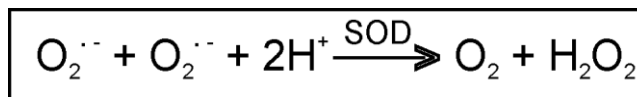


Figura 6. Dismutação do radical superóxido pela ação da superóxido dismutase (SOD).

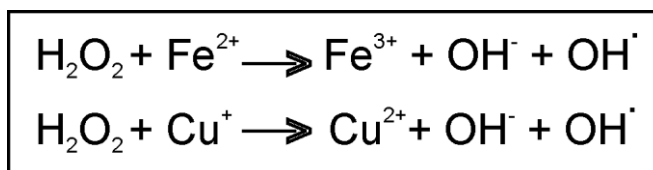


Figura 7. Reação de Fenton.

Os metais de transição podem catalisar a reação entre o H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$, levando à produção de radical hidroxil. Esta reação é conhecida como reação de Haber-Weiss, e catalisada pelo Cu^{2+} ou Fe^{3+} (Figura 8), que pode ser oriundo da ferritina, hemoglobina ou mioglobina (WERNIS & LUCHESI, 1990).

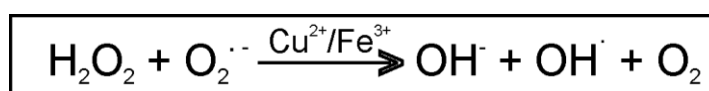


Figura 8. Reação de Haber-Weiss.

As ERN também são formadas tanto no citosol como na mitocôndria, e as mais representativas são o NO e o peroxinitrito (ONOO^-). O NO é gerado a partir da arginina por ação da enzima NOS, presente no citosol e na mitocôndria (RIOBO et al., 2002). O NO é essencial para vasorregulação, agregação plaquetária e neurotransmissão, mas em excesso inibe a citocromo-c oxidase levando à consequente formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (FORFIA et al., 1999). O ONOO^- , entretanto, é formado a partir de uma reação controlada entre NO e $\text{O}_2^{\bullet-}$ (RADI et al., 1994) e ele pode difundir-se para o meio intra ou extracelular, e então promover a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (BECKMAN, 1996). Além disso, o ONOO^- pode inibir a cadeia respiratória, levando a morte neuronal e produzir íons nitrônio, que são capazes de nitrificar resíduos de tirosina (BECKMAN, 1996).

As ERO são necessárias para o funcionamento normal do organismo e são continuamente produzidas e neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante. Entretanto, quando as ER são produzidas em altas concentrações, ou quando as defesas antioxidantes são deficientes, elas podem causar dano celular, representando um mecanismo fundamental para muitas doenças em seres humanos denominado “estresse oxidativo” (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Embora todos os tecidos dos organismos aeróbicos possam sofrer dano oxidativo, o sistema nervoso é o mais suscetível às ERO. Uma das razões é o seu alto consumo de O_2 , já que o sistema nervoso é responsável por aproximadamente 20% do consumo basal de O_2 corporal, apesar de seu peso corresponder a apenas 2% do peso corporal. Portanto, há uma grande quantidade de O_2 para uma massa de tecido relativamente pequena (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Além disso, outros fatores também contribuem para tornar o cérebro vulnerável às reações de

oxidação, tais como as altas concentrações de lipídios poli-insaturados, que servem como substrato para peroxidação lipídica e a deficiência de mecanismos protetores antioxidantes. A baixa atividade de enzimas antioxidantes e sua localização nas células gliais (FLOYD & HENSLEY, 2002) fazem com que os neurônios sejam menos protegidos as ER geradas no cérebro. Além disso, regiões específicas do cérebro, como a substância negra, caudato, putâmen e globo pálido possuem altas concentrações de ferro (FLOOR, 2000), que associadas aos níveis cerebrais elevados de vitamina C (MIELE et al., 1990), possibilitam a reação de Fenton (NOLD & WENNEMERS, 2004). Finalmente, o aumento na concentração extracelular de glutamato por causas metabólicas diversas, leva ao excessivo e contínuo aumento de Ca^{2+} livre intracelular e Na^+ em neurônios adjacentes, ocasionando alta produção de ERO e ERN (CASSARINO & BENNET JR, 1999).

Dentre as diversas reações envolvendo ERO em sistemas biológicos, está a oxidação de proteínas. A quantificação dos grupos carbonil nas proteínas oxidadas tem se tornado um dos métodos bioquímicos mais utilizados na investigação do dano oxidativo protéico (PRATICÒ & DELANTY, 2000). Além disso, as proteínas podem sofrer modificações de grupos tióis e nitrosilação de grupos fenóis acarretando na sua fragmentação. Particularmente, os aminoácidos histidina, arginina e lisina são os principais alvos das ER para a produção de grupos carbonil (UCHIDA, 2003), e a oxidação destes implica na perda da função protéica. A adição de grupos carbonil também pode ocorrer pela formação de aductos com a acroleína e com o 4-hidroxinonenal, dois aldeídos formados na peroxidação lipídica (UCHIDA, 1999), que também acarretam perda da função protéica (LOVELL et al., 2000). O conteúdo de grupos carbonil está aumentado na neurodegeneração relacionada com a idade (STADTMAN, 2001), no neurotrauma (LIMA et al., 2008) e em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas, como nas doenças de Alzheimer (LOVELL et al., 2001), Huntington (TÚNEZ et al., 2004), Parkinson BUTTERFIELD & KANSKI, 2001), e em modelos de convulsões induzidos por pentilenotetrazol (OLIVEIRA et al., 2004), MMA (RIBEIRO et al., 2005; ROYES et al., 2006) e GA (FIGHERA et al., 2006).

De fato, estudos recentes sugerem o envolvimento das ER nas convulsões induzidas pelo GA, na medida em que as convulsões induzidas pela injeção intraestriatal deste ácido são atenuadas pela administração de um composto com propriedades antioxidante, como o gangliosídeo GM1 (FIGHERA et al., 2006). Além

disto, estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o GA inibe a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase (KÖLKER et al., 2002b; FIGHERA et al., 2006), responsável pela manutenção do gradiente de Na^+ e K^+ através das membranas celulares, que é essencial para a manutenção do potencial de membrana (JORGENSEN, 1986).

A inibição da Na^+, K^+ -ATPase induz um aumento na excitabilidade neuronal, e facilita o aparecimento e a propagação de convulsões em diversos modelos de epilepsia (Mori et al., 1986; GRISAR et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2004; RIBEIRO et al., 2005). De fato, em estudos com pacientes epiléticos, observa-se um decréscimo da atividade da Na^+, K^+ -ATPase no tecido cerebral (RAPPORT et al., 1975). De acordo com vários autores, a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase se deve à sua susceptibilidade aos radicais livres, visto que a mesma é uma proteína de membrana e apresenta grupos sulfidríla e resíduos de aminoácidos particularmente sensíveis ao dano oxidativo (JAMME et al., 1995; MOREL et al., 1998). Contudo, é importante enfatizar que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase pode ser regulada por outros agentes ou mecanismos, como os glicosídeos cardíacos ouabaína e digoxina, que a inibem (ROSE & VALDES, 1994), por fosforilação mediada pelas proteínas quinases C e G (BOLDYREV et al., 1997; MURIEL & SANDOVAL, 2000; BARRIVIERA et al., 2001; MURIEL et al., 2003), bem como, por compostos do metabolismo energético, como a Cr (WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000).

3.7. Creatina

A Cr foi primeiramente isolada em 1835 por CHEVREUL em um extrato de carne. Quase cem anos mais tarde, FISK & SUBBAROW (1927) juntamente com EGGLETON & EGGLETON descobriram a PCr, que devido a sua natureza lábil foi chamada “fosfosgen”. Em 1930, LUNDSGAARD demonstrou que a contração muscular é acompanhada por uma maior quebra de PCr que produção de lactato, e propôs que a PCr começa um envolvimento central no suporte energético para a contração muscular. LOHMANN, em 1934, descobriu a reação da enzima CK, na qual o grupo γ -fosfato do ATP é transferido a Cr para formar ADP e PCr (Figura 9). A identificação das isoenzimas mitocondrial e citosólica da CK nas décadas de 1960 e 1970 levou SAKS e colaboradores (1978) e também BESSMAN & GEIGER (1981) a

propor a “lançadeira da PCr”. De acordo com essa hipótese, as isoenzimas mitocondrial e citosólica da CK trabalham em direções opostas. Enquanto a isoenzima mitocondrial da CK catalisa a síntese de PCr a partir do ATP produzido através da fosforilação oxidativa na matriz mitocondrial, a isoenzima citosólica catalisa a regeneração do ATP a partir da PCr nos sítios de consumo de ATP. Dessa maneira o sistema CK/PCr/Cr aumenta consideravelmente a capacidade total para o transporte intracelular do fosfato de alta energia.

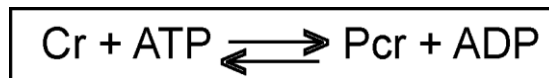


Figura 9. Reação da enzima creatina quinase (CK).

A Cr (*N*-[aminoiminometil]-*N*-metil glicina) é um composto guanidínico endógeno sintetizado a partir da glicina, arginina e *S*-adenosilmetionina nos rins, fígado e pâncreas (WALKER & HANNAN, 1976; WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000; figura 10) e transportada para o músculo e cérebro através de um processo de transporte ativo de alta afinidade transmembrana (WICK et al., 1999). As concentrações de Cr e PCr representam um sistema de reserva energética tecidual na medida em que mantêm constantes os níveis de ATP (WALLIMANN et al, 1992).

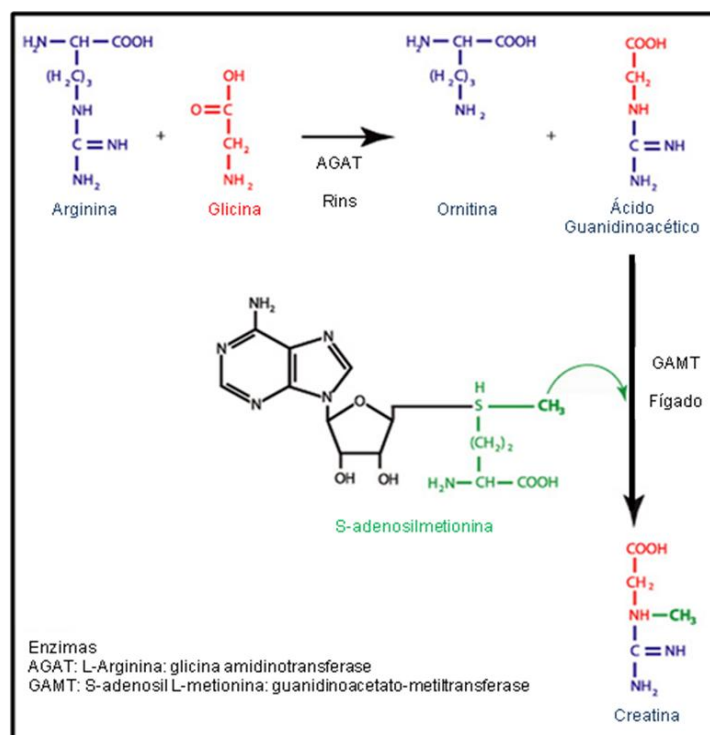


Figura 10. Síntese de creatina.

A Cr tem importância fisiológica como mecanismo de reserva energética (ATP), principalmente no músculo (WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000), transferência de ATP dos sítios de produção (mitocôndria) para os sítios de consumo (citossol; WALLIMANN et al., 1998) e tampão energético (PAN & TAKAHASHI, 2007). Além disso, a Cr apresenta propriedades antioxidantes diretas *per se* (LAWLER et al., 2002; SESTILI et al., 2006) e também neuroprotetoras em uma variedade de doenças neurológicas (KLIVENYI et al., 1999; WENDT et al., 2002; TABRIZI et al., 2003; 2005; BENDER et al., 2006; BÜRKLEN et al., 2006; HERSCH et al., 2006). Além destes achados, têm sido demonstrados efeitos benéficos da Cr em doenças neuromusculares e neurometabólicas (TARNOPOLSKY, 2007).

3.7.1. Neuroproteção da Creatina em Modelos de Doenças Neurodegenerativas

Um significativo número de estudos tem demonstrado que a suplementação com Cr apresenta efeitos neuroprotetores em uma variedade de modelos experimentais de doenças neurológicas como Huntington (DEDEOGLU et al., 2003; TABRIZI et al., 2003; 2005; BENDER et al., 2005; HERSCH et al., 2006), esclerose lateral amiotrófica (KLIVENYI et al., 1999; WENDT et al., 2002; ZHANG et al., 2003), Alzheimer (BREWER & WALLIMANN, 2000; BÜRKLEN et al., 2006), Parkinson (MATTHEWS et al., 1999; ANDRES et al., 2005; BENDER et al., 2006) e também em danos oxidativos e excitotóxicos (MALCON et al., 2000).

Neste contexto, em modelos de doença de Huntington, a suplementação oral com Cr protegeu significativamente da neurotoxicidade induzida pelo MMA e pelo ácido 3-nitropropiónico (3-NP) em cérebro de animais (DESHPANDE et al., 1997; MATTHEWS et al., 1998). Além disso, a suplementação com Cr em ratos reduziu o volume das lesões causadas pela administração subaguda de 3-NP em 80%. Em relação ao mecanismo de ação pelo qual a Cr exerce esses efeitos neuroprotetores, foram elaboradas as seguintes hipóteses: i) restaura as concentrações de Cr, PCr, ATP, GDP, AMP, NAD⁺, ADP e GTP, que estão reduzidas após a administração de 3-NP; ii) protege da redução das concentrações de lactato estriatal induzidas pelo 3-NP *in vivo*; iii) previne da formação de ER induzidas pela administração de MMA; iv)

protege do aumento da concentração de 3-nitrotirosina induzido pelo 3-NP; v) e reduz o aumento de Ca²⁺ intracelular induzido pelo 3-NP, em astrócitos de estriado e córtex cerebral *in vitro*. A partir desses achados, esses estudos sugerem que por restaurar a depleção de ATP, a Cr e a PCr são capazes de prevenir uma cascata de eventos que resultam na geração de ER e conseqüentemente em morte celular. Alternativamente, a Cr e a CK também poderiam proteger da abertura de poros de transição mitocondrial, que estão relacionados com a morte celular (O'GORMAN et al., 1997).

Além desses efeitos neuroprotetores da Cr em modelos de doenças neurodegenerativas, há relatos na literatura sobre a ação desse composto ergogênico na neurotoxicidade induzida por metabólitos que acumulam em alguns erros inatos do metabolismo (KÖLKER et al., 2001b; DAS et al., 2003; ROYES et al., 2003; 2006; VASQUES et al., 2006).

3.7.2. Neuroproteção da Creatina em Modelos de Erro Inato do Metabolismo

Tem sido evidenciado que crianças com EIM na síntese ou no transporte de Cr exibem hipotonia, com poucas patologias relacionadas aos músculos cardíacos ou esqueléticos (STROMBERGER et al., 2003), no entanto, apresentam um conjunto de sintomas neurológicos que incluem retardo mental, atraso motor e convulsões epilépticas. Análises de exames de ressonância magnética nuclear desses pacientes demonstraram uma grave depleção dos níveis de Cr no cérebro (STROMBERGER et al., 2003; SYKUT-CEGIELSKA et al., 2004), sugerindo um envolvimento do metabolismo da Cr à nível de SNC. Estes fatos evidenciam a importância da Cr na função cerebral.

HOLTZMAN e colaboradores (1998) mostraram uma maior susceptibilidade de recém-nascidos e ratos com 10-12 dias de vida às convulsões, e sugeriram que a baixa concentração de Cr e PCr no cérebro imaturo pode influenciar o aparecimento de convulsões após eventos hipóxicos. Nesse contexto, a injeção de Cr em ratos (com 10 dias de vida) três dias antes da exposição à hipóxia, recuperou os níveis de ATP e PCr no cérebro e diminuiu as convulsões induzidas pela hipóxia.

Em modelo de acidemia metilmalônica, a Cr previne o déficit energético cerebral, as convulsões, a produção de lactato e a geração de radicais livres no estriado de ratos injetados com MMA (ROYES et al., 2003; 2006). Nessa mesma

linha, tem sido demonstrado que a suplementação com Cr restaura os níveis de PCr (DAS et al., 2003) e diminui a geração de ER mitocondriais induzidas pelo 3-OH-GA (KÖLKER et al., 2001b), sugerindo uma ação neuroprotetora da Cr na toxicidade do 3-OH-GA. Embora acredita-se que a Cr possa ser usada no controle da toxicidade e no dano relacionado à formação de ER induzidas pelo 3-OH-GA (KÖLKER et al., 2001b), pouco se conhece sobre os efeitos protetores deste composto nas convulsões e o danos induzidos pelo GA (FIGHERA et al., 2006).

Portanto, devido à escassez de medidas terapêuticas efetivas no controle das convulsões e do desenvolvimento da GA-I, evidencia-se a importância da busca de novos compostos para um adequado tratamento (BRUNBECH & SABERS, 2002). Por isso, a investigação do uso da Cr é importante não somente durante os estados convulsivos apresentados pelos pacientes com GA-I, mas também para a identificação de uma terapia adjuvante para tratamento desta acidemia.

4. CAPÍTULOS

4. CAPÍTULOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados neste item, o qual apresenta-se subdividido sob a forma de artigo científico (capítulo I) e manuscrito (capítulo II). Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos mesmos.

4.1. Capítulo I – Avaliação do efeito da Creatina sobre as alterações neuroquímicas e comportamentais induzidas pelo GA em um modelo experimental de acidemia glutárica.

Artigo

CREATINE DECREASES CONVULSIONS AND NEUROCHEMICAL ALTERATIONS INDUCED BY GLUTARIC ACID IN RATS

Magni, D.V., Oliveira, M.S., Furian, A.F., Fiorenza, N.G., Figuera M.R., Ferreira, J., Mello, C.F., Royes L.F.F.

Brain Research, 1185 (2007) 336-345.

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres**BRAIN
RESEARCH**

Research Report

Creatine decreases convulsions and neurochemical alterations induced by glutaric acid in rats

Danieli Valnes Magni^a, Mauro Schneider Oliveira^{a,c}, Ana Flávia Furian^{a,c},
Natália Gindri Fiorenza^a, Michele Rechia Fighera^{a,b}, Juliano Ferreira^d,
Carlos Fernando Mello^a, Luiz Fernando Freire Royes^{a,d,e,*}

^aCentro de Ciências da Saúde, Laboratório de Psicofarmacologia e Neurotoxicidade, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^bCentro de Ciências da Saúde, Departamento de Pediatria, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^cPrograma de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^dCentro de Ciências Naturais e Exatas, Laboratório de Neurotoxicidade, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^eCentro de Educação Física e Desportos, Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 12 September 2007

Available online 20 September 2007

Keywords:

Convulsion

Glutaric acid

Striatum

Oxidative damage

Glutamate

Creatine

ABSTRACT

Glutaric acidemia type I (GA-I) is an inherited metabolic disease characterized by striatal degeneration, seizures, and accumulation of glutaric acid (GA). Considering that GA impairs energy metabolism and induces reactive species generation, we investigated whether the acute administration of creatine, an amino acid with antioxidant and ergogenic properties, protects against the seizures and neurochemical alterations (inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase and increased protein carbonylation) induced by the intrastriatal injection of GA (4 μmol/striatum). We also investigated whether creatine protected against the GA-induced inhibition of glutamate uptake *in vitro*. Creatine administration (300 mg/kg, p.o.) decreased seizures (evidenced by electrographic changes), protein carbonylation and Na⁺,K⁺-ATPase inhibition induced by GA. However, creatine, at a dose capable of fully preventing GA-induced protein carbonylation (50 and 150 mg/kg, p.o.), did not prevent convulsions and Na⁺,K⁺-ATPase inhibition, suggesting that the anticonvulsant activity of creatine in this experimental model is not related to its antioxidant action. Creatine also protected against the GA-induced inhibition of L-[³H]glutamate uptake in synaptosomes, suggesting that creatine may reduce the deleterious effects of GA by maintaining glutamate uptake in the synaptic cleft. Therefore, considering that creatine significantly attenuates the deleterious effects of GA assessed by behavioral and neurochemical measures, it is plausible to propose the use of this amino acid as an adjuvant therapy in the management of glutaric acidemia.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Fax: +55 55 3220 8031.

E-mail address: nandoroyes@yahoo.com.br (L.F.F. Royes).

1. Introduction

Glutaric acidemia type I (GA-I) is an inherited organic acid cerebral disorder caused by the impairment of the mitochondrial enzyme glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH; EC 1.3.99.7), which catalyzes the dehydrogenation and decarboxylation of glutaryl-CoA to crotonyl-CoA in the catabolic pathway of L-lysine, L-hydroxylysine and L-tryptophan (Goodman et al., 1977; Liesert et al., 1999). Deficient GCDH activity gives rise to an accumulation of organic acids and their derivatives in body fluids and brain tissue of affected patients, i.e. glutaric acid (GA), 3-hydroxyglutaric (3-OH-GA) and glutaconic acids (Baric et al., 1998; Goodman et al., 1977). Clinical manifestations of GA I are predominantly neurological, including generalized convulsions, which are accompanied by bilateral destruction of caudate and putamen (Hoffmann and Zschocke, 1999; Morton et al., 1991) and acute loss of motor skills and dystonia (Freundenberg et al., 2004). Furthermore, postmortem examination of the basal ganglia and cerebral cortex of patients with GA I show postsynaptic vacuolization characteristic of glutamate-mediated brain injury (Goodman et al., 1977). Recently, it has been proposed that GA and 3-OH-GA induce striatal degeneration by disrupting mitochondrial energy metabolism (Ullrich et al., 1999; Das et al., 2003; Ferreira et al., 2005), promoting oxidative stress (de Oliveira Marques et al., 2003; Latini et al., 2002, 2005), and increasing glutamatergic neurotransmission (Wajner et al., 2004), which ultimately causes secondary excitotoxicity (Kolker et al., 1999; 2000a,b, 2002a,b; Porciuncula et al., 2004; Rosa et al., 2004). In this context, it has been shown that the intrastriatal injection of GA causes convulsions, increases oxidative damage markers (total protein carbonyl and thiobarbituric acid-reactive substances) and decreases striatal Na^+, K^+ -ATPase activity in rats, mimicking, in various aspects, the neurological alterations of the disease in humans (Lima et al., 1998; Figuera et al., 2006).

Creatine (N-[aminoiminomethyl]-N-methyl glycine) is an endogenous amino acid produced from glycine, methionine and arginine in the liver, kidney and pancreas (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000). Recent experimental findings have demonstrated that creatine affords significant neuroprotection against hypoxia, amyotrophic lateral sclerosis, ischemia, oxidative insults and excitotoxicity (Holtzman et al., 1998; Klivenyi et al., 1999; Wick et al., 1999; Michaels and Rothman, 1990; Malcon et al., 2000). It is interesting that creatine supplementation also restores creatine phosphate levels and decreases mitochondrial generation of reactive oxygen species (ROS) induced by 3-OH-GA (Kolker et al., 2001; Das et al., 2003), one of the metabolites that accumulates in glutaric acidemia.

Although creatine reduces 3-OH-GA-induced production of reactive species, little is known about the protective effects of this amino acid against the convulsions and the deleterious neurochemical alterations induced by GA. In this context, considering that ROS are involved in the convulsive behavior induced by GA, it is feasible to propose that drugs, such as creatine, which prevents phosphocreatine (PCr) depletion (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000) and acts as scavenger of ROS (Lawler et al., 2002), may protect against GA-induced behavioral, electrographic and neurochemical deleterious effects. Therefore, in the present study, we decided to investigate

whether the administration of creatine protects against GA-induced seizures and some known deleterious neurochemical effects of GA, such as protein oxidative damage, Na^+, K^+ -ATPase activity inhibition (Figuera et al., 2006) and synaptosomal L-[^3H] glutamate uptake inhibition (Porciuncula et al., 2000).

2. Results

In the present investigation, we showed that administration of creatine (300 mg/kg, p.o.) increased the latency for the first convulsive episode [$F(3,54)=16.89$; $P<0.05$; Fig. 1A] and decreased the duration of convulsive episodes [$F(3,54)=13.60$; $P<0.05$; Fig. 1B] induced by the unilateral (right) intrastriatal injection of GA (4 μmol /striatum). This result was confirmed by electrographic recordings (Fig. 2). GA-induced seizures were characterized by clonus of the left forelimb and/or hindlimb and head (myoclonic jerks), rotational behavior and full lateralization toward the left side of the body, which were accompanied by the occurrence of multispikes plus slow waves and major seizure activity in the EEG. Generalized convulsions appeared in the electroencephalographic recordings as the major seizure activity (2–3 Hz high-amplitude activity). After the ictal discharge, postictal EEG suppression and slow waves were observed, correlating with behavioral catalepsy. The intrastriatal injection of GA induced the appearance of high-voltage synchronic clusters in the EEG followed by increase of striatal discharges (basal: $161 \pm 26.9 \mu\text{V}$; after GA injection: $537 \pm 41.2 \mu\text{V}$). GA injection increased cortical discharges basal: $124 \pm 24.9 \mu\text{V}$; after GA injection: $461 \pm 45.9 \mu\text{V}$; Fig. 2B). In addition, electrographic recordings of the ipsilateral striatum and cerebral cortex revealed that the intrastriatal injection of GA induced the appearance of an epileptogenic focus in the right striatum, which spread to the ipsilateral cortex.

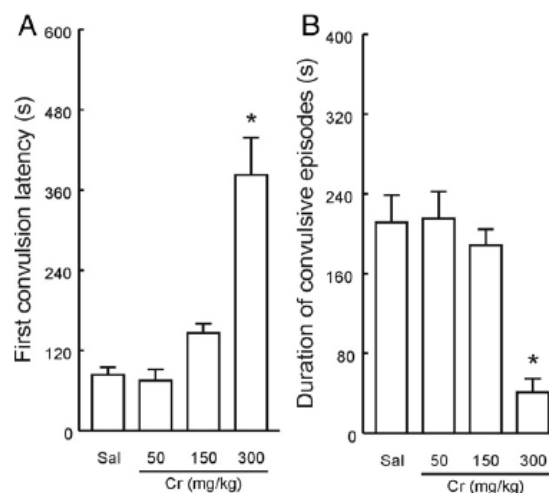


Fig. 1 – Creatine pretreatment (300 mg/kg, p.o.) increases the latency for the first convulsive episode (A) and decreases the duration (B) of convulsive episodes induced by GA (4 μmol /striatum). Data mean \pm S.E.M. for $n=8-10$ in each group. * $P<0.05$ compared with Vehicle-GA group (F test for simple effect).

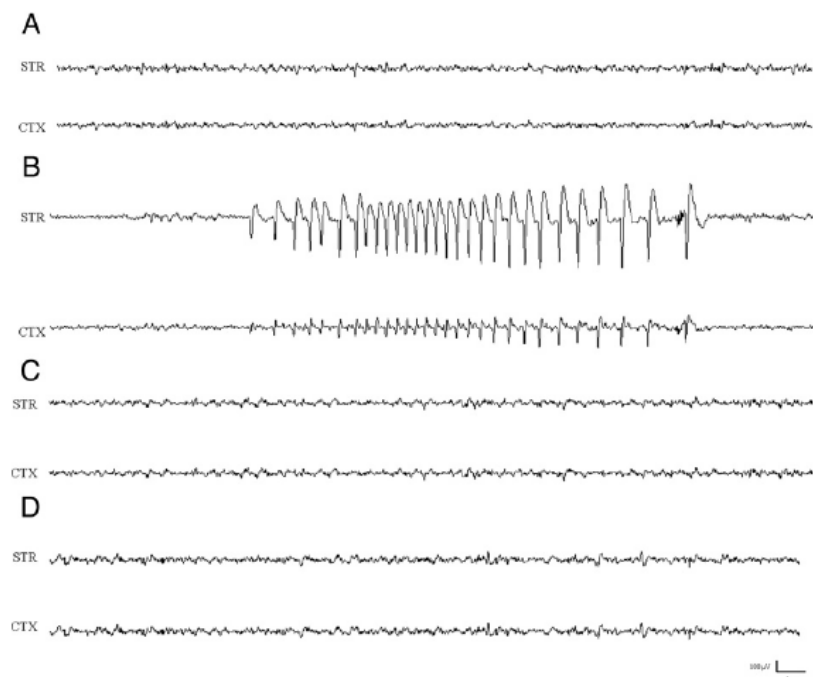


Fig. 2 – Representative electroencephalographic recordings before (A) and after intrastriatal GA administration ($4 \mu\text{mol}$ /striatum; B) which were accompanied by pattern of continuous high-amplitude sharp spikes in low-frequency rhythmic spiking activity in ipsilateral cortex. Typical electroencephalographic recordings after injection of creatine (300 mg/kg , p.o.) (C) and after intrastriatal GA administration (D); STR, ipsilateral striatum; CTX, ipsilateral cortex. Scale bars, $100 \mu\text{V}$ and 1 s .

To quantify the epileptic effect of intrastriatal GA administration, we calculated the power densities of the different EEG frequencies. As shown in Figs. 3A and B, the field activity in control conditions or after creatine was similar and characterized by intermittent delta–beta oscillations. The injection of GA into striatum increased striatal (71%) and ipsilateral cortex (81%) delta frequency, and decreased beta oscillation in the striatum (37%) and ipsilateral cortex (50%), when compared with control conditions.

Electroencephalographic recordings also showed that creatine (300 mg/kg , p.o.) prevented ictal activity induced by intrastriatal injection of GA during all observation period, followed by a decrease of GA-induced spike amplitude between 65 and 70% with a mean of $151 \pm 25 \mu\text{V}$ (Fig. 2D). Quantitative analysis of EEG revealed that creatine pretreatment decreases striatal [$F(1,10)=9.81$; $P<0.03$; Fig. 3A] and ipsilateral cortex delta power density [$F(1,10)=6.42$; $P<0.05$; Fig. 3B]. In addition, creatine administration was effective against GA-induced striatal [$F(1,10)=20.90$; $P<0.05$; Fig. 3A] and ipsilateral cortex [$F(1,10)=24.88$; $P<0.05$; Fig. 3B] beta oscillation decrease.

The effects of GA and creatine injection on the total protein carbonylation in the injected and in the contralateral striatum were also determined. Statistical analysis revealed that intrastriatal injection of GA increased protein carbonyl content in the injected striatum [$F(1,59)=57.48$; $P<0.05$] and that creatine (50 to 300 mg/kg , p.o.) prevented the protein carbonylation increase induced by GA [$F(3,59)=18.69$; $P<0.05$; Fig. 4].

Fig. 5 shows the effect of creatine (50 – 300 mg/kg , p.o.) on GA-induced Na^+, K^+ -ATPase activity decrease. Statistical analyses showed that the decrease in Na^+, K^+ -ATPase activity [$F(1,59)=95.58$; $P<0.05$] induced by GA ($4 \mu\text{mol}$ /striatum) was prevented by creatine at the dose of 300 mg/kg (p.o.). Creatine doses lower than 300 mg/kg did not alter GA-induced decrease in Na^+, K^+ -ATPase activity.

Considering that acute creatine administration protected against GA-induced behavioral, electrographic and neurochemical deleterious effects, we decided to investigate whether creatine protects against GA-induced decrease of glutamate uptake in synaptosomes (Porciuncula et al., 2000). Statistical analysis revealed that creatine ($10 \mu\text{M}$; Fig. 6A) prevented GA-induced decrease of glutamate uptake [$F(3,16)=8.49$; $P<0.05$; Fig. 6B].

3. Discussion

In the present study, we confirm and extend our previous findings that GA elicits behavioral and electrographic seizures and increases reactive species generation *in vivo* (Figuera et al., 2006). In addition, we show, for the first time, that a single administration of creatine affords significant protection against the acute deleterious effects of GA: increase in protein carbonylation, decrease of Na^+, K^+ -ATPase activity and electrographic convulsions *in vivo*. Creatine also protected against GA-induced decrease of L- ^3H glutamate uptake in synaptosomes.

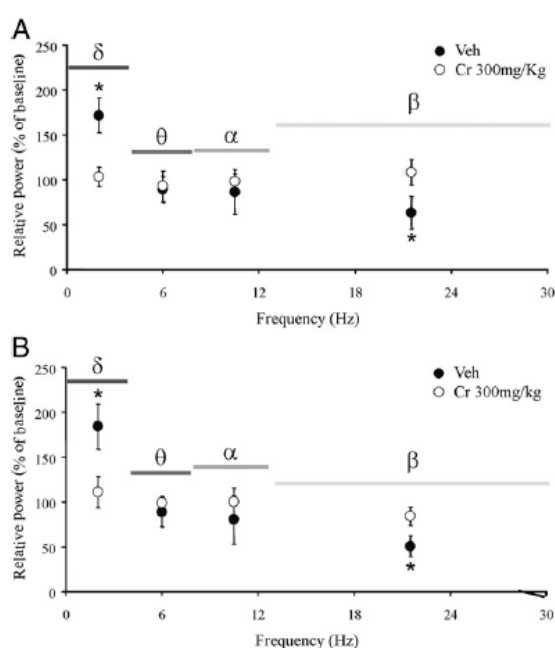


Fig. 3 – Quantitative analysis of EEG recording demonstrated that creatine pretreatment (300 mg/kg, p.o.) attenuated GA-induced delta increase and beta depression power density (4 μmol/2 μl) in the striatum (A) and ipsilateral cortex (B). Data mean ± S.E.M. for n=5–6 in each group. *P<0.05 when compared with basal conditions.

There is a significant body of evidence suggesting that GA accumulation may play a role in the convulsions and neurological impairment seen in patients with glutaric acidemia (Lima et al., 1998; Kolker et al., 1999, 2001, 2002b). Moreover, experimental findings *in vivo* and *in vitro* suggest that energy metabolism impairment and oxidative stress play an important role in the convulsive behavior elicited by GA (Flott-Rahmel et al., 1997; Lima et al., 1998; Frizzo et al., 2004; Porciuncula et al., 2000, 2004; Rosa et al., 2004; Ferreira et al., 2005). It is also worth remarking that a number of GA I patients excrete increased amounts of lactate, 3-hydroxybutyrate, acetoacetate and dicarboxylic acids, further indicating a mitochondrial dysfunction in this organic acidemia (Gregersen and Brandt, 1979; Floret et al., 1979).

In this context, the currently reported increase of striatal and cortical delta frequency induced by GA, to a certain degree, agrees with the study of Fujimoto et al. (2000), who have found periodic synchronic discharges, characterized by intermittent 4–6 Hz positive and 100–200 μV delta waves in cortical structure in a patient with glutaric aciduria type 1 during an episode of acute encephalopathy.

An impairment of glutamate metabolism and homeostasis has been suspected to underlie several brain diseases, including epilepsy (Kelly and Stanley, 2001). In fact, recent studies have demonstrated that inhibition of glutamate transporters leads to recurrent neuronal activity, characterized by periodic cell depolarization and bursts of action potentials (Demarque

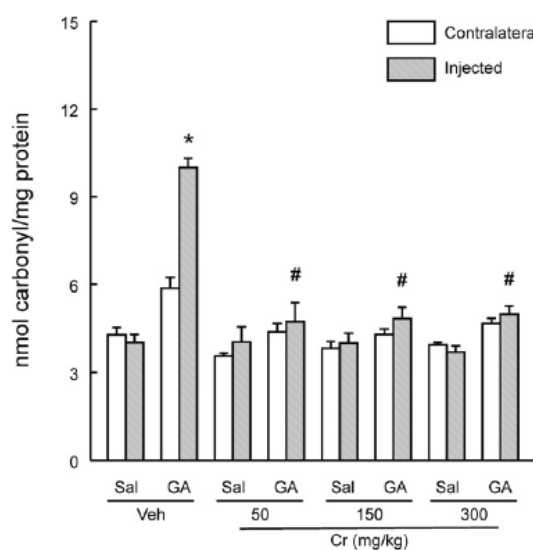


Fig. 4 – Creatine pretreatment (50 to 300 mg/kg, p.o.) prevents the striatal GA-induced protein carbonylation increase. Data are mean ± S.E.M. for n=8–10 in each group. *P<0.05 compared with Vehicle-Sal group. #P<0.05 compared with Vehicle-GA group (Student–Newman–Keuls test).

et al., 2004). This oscillatory effect alters the background pattern of bilateral recurrent paroxysmal bursts followed by cortical beta-gamma oscillations (Milh et al., 2007). In this context, the results presented in this report suggest that cellular glutamate uptake impairment elicited by GA (Porciuncula

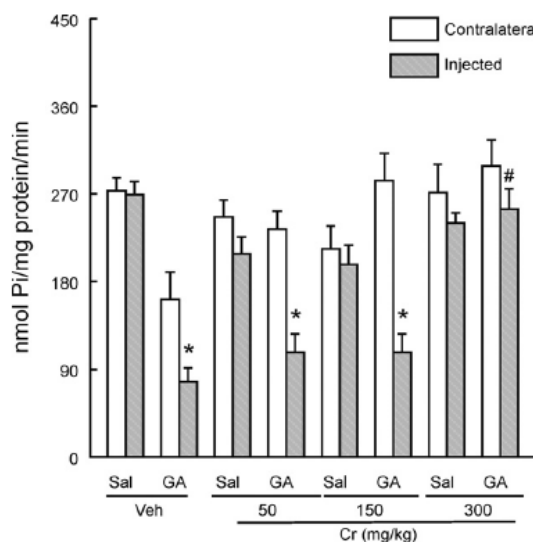


Fig. 5 – Effect of creatine pretreatment (50 to 300 mg/kg, p.o.) on the GA-induced Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition. Data are mean ± S.E.M. for n=8–10 in each group. *P<0.05 compared to contralateral striatum. #P<0.05 compared with Vehicle-GA group.

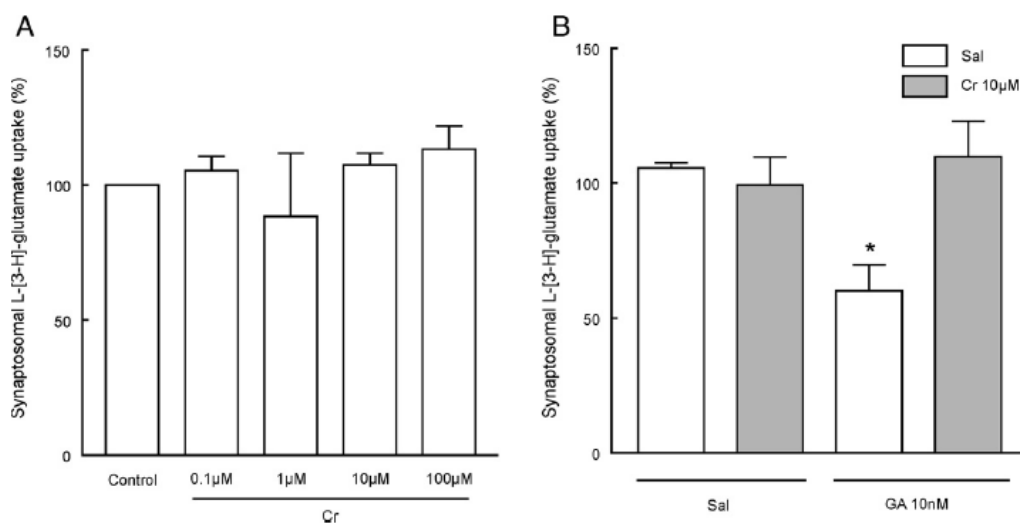


Fig. 6 – Effect of creatine on synaptosomal $[^3\text{H}]$ glutamate uptake. Creatine (0.1 to 100 μM) addition to membrane preparation had not effect on L- $[^3\text{H}]$ glutamate uptake (A). The incubation with creatine (10 μM) into synaptosomal membrane preparation reversed GA-induced L- $[^3\text{H}]$ glutamate uptake inhibition (B). * $P < 0.05$ compared with control. $^{\#}P < 0.05$ compared with GA group. Data are the means \pm SEM of $n = 6$ –8 animals in each group.

et al., 2000, 2004) may lead increased excitatory activity, which ultimately results in electrographic and behavioral seizures (Figuera et al., 2006). Furthermore, since substantial evidence supports that mitochondrial dysfunction and consequent ATP depletion are a major cause of seizures and oxidative stress (Cassarino et al., 1999), it is plausible to propose that a disturbed energy metabolism elicited by this organic acid (Funk et al., 2005; Ferreira et al., 2005) leads to neuronal hyperexcitability, seizures and oxidative stress. In line with this view, and based in the previously reported positive correlation between duration of GA-induced seizures and inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity (Figuera et al., 2006), we also suggest that an inhibition of selected targets to free radicals, such as Na^+, K^+ -ATPase, may play an important role in the hyperexcitability and concomitant oxidative damage elicited by GA. On the other hand, it is critical to emphasize that, in this model of organic acidemia, a primary metabolic inhibition induced by intrastriatal injection of GA may alter ATP availability for several regulatory processes, disrupting normal Na^+, K^+ -ATPase regulation. In this context, previous studies have proposed that nitric oxide, carbon monoxide and NMDA glutamate receptors modulate Na^+, K^+ -ATPase activity through activation of regulatory proteins kinase G and C, in which free radicals play modulatory role (Nathanson et al., 1995; Petrushanko et al., 2006). However, further studies are necessary to clarify this point.

In the present study, we demonstrated that creatine pretreatment (300 mg/kg, p.o.) attenuated-GA induced convulsive behavior and protected against protein carbonylation and Na^+, K^+ -ATPase activity inhibition. On the other hand, this report also revealed that creatine, at doses capable of preventing GA-induced protein carbonylation, does not prevent GA-induced seizures and Na^+, K^+ -ATPase activity decrease, suggesting that protein carbonylation may occur separately from convulsive episodes (Figuera et al., 2006) and that the ability of creatine to

reduce protein carbonylation is not related to its anticonvulsant action. However, one must also consider that selected targets, such Na^+, K^+ -ATPase, which could not contribute significantly to the total protein carbonyl content, could be responsible for the GA-induced convulsions. Thus, if these targets were more sensitive to oxidative damage, they would require additional antioxidant protection, which could be afforded by increasing creatine doses. Therefore, it is not possible to rule out antioxidant mechanisms in the anticonvulsant action of creatine.

In agreement with this view, it has been claimed that the neuroprotective effect exerted by creatine in several neurodegenerative processes involves buffering of intracellular energy, preventing the increase of Ca^{2+} and ROS intramitochondrial levels, which lead to excitotoxic and cell death (O'Gorman et al., 1997; Leist and Nicotera, 1998; Dolder et al., 2003; Klivenyi et al., 2003; Andres et al., 2005). In addition, recent findings have indicated that creatine exerts cytoprotection via direct antioxidant activity (Sestili et al., 2006). Therefore, it is also possible that stabilization of buffering of intracellular energy and antioxidant properties may underlie its recurrent protection evidenced in this model of organic acidemia.

There is evidence that substances that increase GABAergic function and/or inhibit glutamatergic transmission may decrease convulsive episodes and oxidative stress (Karpiak et al., 1981; Amato et al., 1999; Figuera et al., 2003; Royes et al., 2003, 2006). In line of this view, many studies have investigated the role of glutamatergic and GABAergic neurotransmission on 3-OH-GA and glutaric acid-induced neurotoxicity (for a review see: Wajner et al., 2004). In the present study, we showed that GA inhibits glutamate uptake in striatal synaptosomes. Our results are in agreement with previous data from the literature, demonstrating that GA reduces glutamate uptake in forebrain synaptosomes or cultured astrocytes (Porciuncula et al., 2000, 2004).

Although tissue concentration of GA after intrastriatal administration is unknown, we may speculate that reduction of glutamate uptake by GA may facilitate the activation of excitatory amino acids receptors and, consequently, seizures. Of note, it has been demonstrated that glutamate transporters inhibitors do not produce seizures by themselves, but they are capable of facilitating seizures during energetic failure (Sepkuty et al., 2002; Demarque et al., 2004). Since GA induces cellular energy impairment and oxidative stress (Ferreira et al., 2005), creatine may have acted as an antioxidant by maintaining mitochondrial bioenergetics and protect neurons from excitotoxic damage caused by GA by increasing glutamate uptake and therefore, reducing the concentration of this amino acid in the synaptic cleft.

The exact mechanism by which GA reduces glutamate uptake is still unknown. It has been suggested that the inhibition of glutamate uptake could be due to a direct interaction of GA with glutamate transporters (Porciuncula et al., 2004). However, the activity of glutamate transporters can also be reduced by several indirect mechanisms, including reactive species formation and reduction in Na^+, K^+ -ATPase activity (Volterra et al., 1994; Nanitsos et al., 2004). Thus, the reduction of glutamate uptake by GA could be related with its ability to induce oxidative stress and reduce Na^+, K^+ -ATPase activity. Our results are in agreement with this view, since creatine reverted the oxidative stress and Na^+, K^+ -ATPase activity reduction induced by GA.

In summary, the current study reports that striatal GA administration induces convulsive behavior, protein carbonylation and decrease of Na^+, K^+ -ATPase activity, which are prevented by creatine. In addition, creatine protected against GA-induced synaptosomal glutamate uptake inhibition. Although the precise mechanism underlying the striatal degeneration and convulsive behavior of GAI patients is not known, it is plausible to propose that compounds, such as creatine, that decrease GA-induced toxicity assessed by behavioral and neurochemical parameters may be useful as adjuvant therapeutic measures against GA accumulation. However, clinical studies shall be conducted in order to evaluate its clinical efficacy in glutaric acidemic patients.

4. Experimental procedures

4.1. Animal and reagents

Adult male Wistar rats (270–300 g) maintained under controlled light and environment (12:12 h light–dark cycle, 24 ± 1 °C, 55% relative humidity) with free access to food (Guabi, Santa Maria, Brazil) and water were used. Animal utilization protocols followed the Official Government Ethics guidelines and were approved by the University Ethics Committee. All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

4.2. Behavioral evaluation and surgical procedure

Animals were anesthetized with Equitesin (1% phenobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol; 3 ml/kg, i.p.) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, a cannula was

inserted unilaterally into the striatum (coordinates relative to bregma: AP, 0 mm; ML, 3.0 mm; V, 3.0 mm from the dura). Chloramphenicol (200 mg/kg, i.p.) was administered immediately before the surgical procedure. The experiments were performed 7–9 days after surgery when animals did not show any sign of pain, infection or discomfort.

Creatine (50, 150 or 300 mg/kg) or vehicle (0.1% carboxymethylcellulose) was infused by intragastric gavage (single administration) 45 min before the intrastriatal administration of GA (4 $\mu\text{mol}/2 \mu\text{l}$) or saline (5.5 $\mu\text{mol}/2 \mu\text{l}$). The intrastriatal administration (2 μl) was performed over a 2 min period using a 10 μl Hamilton syringe attached to a 30 gauge needle, whose tip protruded 2 mm from the cannula, allowing injection the dorsal striatum. All intrastriatal injections were made in unanesthetized rats and an additional minute was allowed to elapse before removal of needle to avoid backflow of drug through the cannula. Immediately after the intrastriatal injections, the animals were transferred to a round open field (54.7 cm in diameter) with a floor divided into 10 equal areas. During 20 min, the animals were video-monitored for the appearance convulsive episodes, according to (de Mello et al., 1996). Accordingly, clonic convulsions are episodes characterized by typical partial clonic activity affecting the face, head, vibrissae and forelimbs. Such clonic events are short, typically lasting 1–2 s and can occur either individually or in multiple discrete episodes before generalization and over time. Generalized convulsive episodes are characterized by generalized whole-body clonus involving all four limbs and tail, rearing, wild running and jumping, sudden loss of upright posture and autonomic signs, such as hypersalivation and defecation, respectively. Immediately after the behavioral evaluation, the animals were sacrificed for cannula placement or biochemical analysis.

4.3. Placement of cannula and electrodes for EEG recordings

A subset of animals ($n=5-6$) were anesthetized with Equitesin and surgically implanted with a cannula and electrodes under stereotaxic guidance. The guide cannula (27 gauge) was glued to a multipin socket and inserted into the right striatum through a previously opened skull orifice. One screw electrode was placed over the right parietal cortex (coordinates in mm: AP, -4.5; L, 2.5; V, 2) along with a ground lead positioned over the nasal sinus. Bipolar nichrome wire Teflon-insulated depth electrodes (100 μm) were implanted into the right striatum (coordinates in mm: AP, 0; L, 3; V, 4.2). The electrodes were connected to the multipin socket and, together with the injection cannula, were fixed to the skull with dental acrylic cement. Electroencephalographic recordings were performed for at least 7 days after the surgery.

4.4. Intrastriatal injection of drugs and EEG recording

Routinely, the animals were allowed to settle for habituation in a Plexiglas cage (25 \times 25 \times 60 cm) for at least 20 min. Baseline EEG recordings were obtained 10 min prior to drugs administration in order to establish an adequate control brain electrical activity. The drug injection protocol used in this set of experiments was the same used in those experiments that evaluated the effect of creatine on GA-induced behavioral seizures, except

that EEG was concomitantly recorded using digital encephalographic equipment (Neuromap EQSA260, Neuromap LTDA, Brazil). EEG signals were amplified, filtered (0.1 to 70.0 Hz, bandpass), digitalized (sampling rate 250 Hz) and stored in a PC for off-line analysis, as described below.

4.5. EEG analyses

In order to quantify the GA-induced seizure activity, as well as the possible anticonvulsant effect of creatine, we calculated the power densities of the different EEG frequencies obtained from freely moving rats. Digitalized data from basal, preinfusion and seizure periods were divided in 30 s segments and a 4 s sample from each segment was converted into frequency domain by fast Fourier transformation (FFT) method (Dringenberg et al., 2003). The resultant power values displayed for each frequency were grouped into 4 bands represented by delta (0–4 Hz), theta (>4–8 Hz), alpha (>8–13 Hz) and beta (>13–30 Hz). EEG recordings were visually analyzed for the appearance of seizure activity. Seizures were defined by the occurrence of episodes consisting of the following alterations in the recording leads: isolated sharp waves ($\geq 1.5 \times$ baseline); multiple sharp waves ($\geq 2 \times$ baseline) in brief spindle episodes (≥ 1 s ≥ 5 s); multiple sharp waves ($\geq 2 \times$ baseline) in long spindle episodes (≥ 5 s); spikes ($\geq 2 \times$ baseline) plus slow waves; multispikes ($\geq 2 \times$ baseline, ≥ 3 spikes/complex) plus slow waves; major seizure (repetitive spikes plus slow waves obliterating background rhythm, ≥ 5 s). Data from seizure periods were expressed as percent of baseline values. Rhythmic scratching of the electrode headset by the animal rarely caused artifacts. These recordings were easily identified and discarded.

4.6. Protein carbonyl assay

Immediately after the behavioral evaluation, the animals were killed by decapitation and had their brain exposed by the removal of the parietal bone. A punch of the injected and noninjected striata was rapidly obtained. Striatal tissue was homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 using a glass homogenizer and its carbonyl protein content was determined by the method described by Levine et al. (1990) adapted for brain tissue (Schneider Oliveira et al., 2004).

4.7. Na^+, K^+ -ATPase activity measurement

The measurement of Na^+, K^+ -ATPase activity was performed in the same fresh, diluted, noncentrifuged homogenates used for determination of the striatal protein carbonyl content. Assay of enzyme activity was performed according by Wyse et al. (2000). Briefly, the incubation medium consisted of 30 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4; 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM MgCl_2 and 50 μg of protein in the presence or absence of ouabain (2 mM), in a final volume of 350 μl . The reaction was started by the addition of adenosine triphosphate to a final concentration of 5 mM. After 30 min at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of 70 μl of trichloroacetic acid (TCA, 50%). Saturating substrate concentrations were used, and reaction was linear with protein and time. Appropriate controls were included in the assays for nonenzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate released was quan-

tified by the colorimetric method described by Fiske and Subbarow (1925), and Na^+, K^+ -ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-sensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain).

4.8. Synaptosomal preparation

The animals were sacrificed by decapitation and had their brain exposed by the removal of the parietal bone. A punch of the striatum was rapidly removed and synaptosomal preparation was obtained by isotonic Percoll/sucrose discontinuous gradients at 4 °C, as previously described (Dunkley et al., 1986). Briefly, homogenates (10%, w/v) from striatum were made in 5 mM HEPES and 320 mM sucrose (pH 7.4), and centrifuged twice at 1000 $\times g$ for 5 min to produce a pellet (P1) and a supernatant (S1). The S1 was centrifuged twice at 10,000 $\times g$ for 20 min to produce P2 and S2 that were discarded. P2 was resuspended in buffer HEPES/sucrose and was subjected to 16, 10 and 7.5% Percoll solution density gradient centrifugation at 15,000 $\times g$ for 20 min. The synaptosomal fractions were isolated, suspended and homogenized in Krebs' buffer (pH 7.4), containing in mM 145 NaCl, 5 KCl, 1.2 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.3 $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 HEPES, 10 glucose and 1.2 CaCl_2 , and centrifuged twice at 15,000 $\times g$ for 20 min. The supernatant was removed and the pellet resuspended in Krebs' buffer. The synaptosomal fraction used contained approximately 1 mg of protein/ml. This fraction also contained approximately 5% contamination with fragments of the inner and outer mitochondrial membranes, microsomes, myelin as well as neural and glial plasma membranes (Dunkley et al., 1986; Nagy et al., 1986; Miguez et al., 1999). In order to evaluate the integrity of the synaptosomes, lactate dehydrogenase (LDH; EC 1.11.27) release was monitored by incubating the preparation with GA for 15 min. The LDH activity in the incubation medium was assayed spectrophotometrically at a wavelength of 340 nm (Lab-test reagents, Brazil). Under the experimental conditions used, no changes in LDH were observed.

4.9. Synaptosomal [^3H] glutamate uptake

Experiments were performed in a final volume of 500 μl in a standard incubation medium composed of Krebs' buffer, and 5 μM (0.1 μCi) of L-[^3H]-glutamate (49 Ci/mmol, Amersham International, UK). Synaptosomal [^3H] glutamate uptake was measured in the presence of physiological concentrations of creatine (0.1 to 100 μM) (Ipsiroglu et al., 2001).

The effect of creatine (10 μM) (a concentration that had no effect *per se*) on synaptosomal [^3H]glutamate uptake was evaluated in the presence of GA (10 nM). This concentration of GA was previously reported to reduce [^3H] glutamate uptake in forebrain synaptosomes (Porciuncula et al., 2000). Controls did not contain glutaric acid or creatine. The uptake was carried out for 5 min at 37 °C after the addition of synaptosomes (100 μg of protein/tube) and stopped by centrifugation (16,000 $\times g$ for 1 min at 4 °C). Radioactivity in the synaptosomal pellet was measure after the addition of scintillation liquid in a Packard Model 1409 scintillation counter. The specific glutamate uptake was calculated as the difference between total uptake at 37 °C and the uptake at 4 °C (nonspecific uptake). Under our experimental conditions, the specific uptake was 95 ± 13 pmol/min/mg protein.

4.10. Protein determination

Protein content was measured colorimetrically by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (1 mg/ml) as a standard.

4.11. Statistics

The latency for convulsion, total time spent convulsing and electroencephalographic recordings were analyzed by one- or two-way ANOVA, depending on the experimental design, followed by a Student–Newman–Keuls test. Data from *in vivo* total carbonyl and Na⁺K⁺-ATPase activity determinations were analyzed by a 2 (carboxymethylcellulose or creatine) × 2 (saline or GA) × 2 (injected or contralateral hemisphere) factorial ANOVA (analysis of variance), with the hemisphere factor treated as a within-subject factor. *Post hoc* analyses were carried out by the *F* test for simple effect or the Student–Newman–Keuls test, when appropriate. Data from *in vitro* Synaptosomal [³H] glutamate uptake were analyzed by one-way ANOVA. All data are expressed as mean ± S.E.M.. *P* < 0.05 was considered significant.

Acknowledgments

Work supported by CNPq (grant: 500120/2003-0); C.F. Mello and A.F. Furian are the recipients of CNPq fellowships. M. Schneider Oliveira is the recipient of CAPES fellowships.

REFERENCES

- Amato, A., Connolly, C.N., Moss, S.J., Smart, T.G., 1999. Modulation of neuronal and recombinant GABA_A receptors by redox reagents. *J. Physiol.* 517 (Pt1), 35–50.
- Andres, R.H., Ducray, A.D., Perez-Bouza, A., Schlattner, U., Huber, A.W., Krebs, S.H., Seiler, R.W., Wallimann, T., Widmer, H.R., 2005. Creatine supplementation improves dopaminergic cell survival and protects against MPP⁺ toxicity in an organotypic tissue culture system. *Cell Transplant* 14, 537–550.
- Baric, I., Zschocke, J., Christensen, E., Duran, M., Goodman, S.I., Leonard, J.V., Muller, E., Morton, D.H., Superti-Furga, A., Hoffmann, G.F., 1998. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis.* 21, 326–340.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cassarino, D.S., Parks, J.K., Parker Jr., W.D., Bennett Jr., J.P., 1999. The parkinsonian neurotoxin MPP⁺ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome *c* in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1453, 49–62.
- Das, A.M., Lucke, T., Ullrich, K., 2003. Glutaric aciduria I: creatine supplementation restores creatinephosphate levels in mixed cortex cells from rat incubated with 3-hydroxyglutarate. *Mol. Genet. Metab.* 78, 108–111.
- de Mello, C.F., Begnini, J., Jimenez-Bernal, R.E., Rubin, M.A., de Bastiani, J., da Costa Jr., E., Wajner, M., 1996. Intrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. *Brain Res.* 721, 120–125.
- de Oliveira Marques, F., Hagen, M.E., Pederzoli, C.D., Sgaravatti, A.M., Durigon, K., Testa, C.G., Wannmacher, C.M., de Souza Wyse, A.T., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., 2003. Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. *Brain Res.* 964, 153–158.
- Demarque, M., Villeneuve, N., Manent, J.B., Becq, H., Represa, A., Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L., 2004. Glutamate transporters prevent the generation of seizures in the developing rat neocortex. *J. Neurosci.* 24, 3289–3294.
- Dolder, M., Walzel, B., Speer, O., Schlattner, U., Wallimann, T., 2003. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J. Biol. Chem.* 278, 17760–17766.
- Dringenberg, H.C., Vanderwolf, C.H., Noseworthy, P.A., 2003. Superior colliculus stimulation enhances neocortical serotonin release and electrocorticographic activation in the urethane-anesthetized rat. *Brain Res.* 964, 31–41.
- Dunkley, P.R., Jarvie, P.E., Heath, J.W., Kidd, G.J., Rostas, J.A., 1986. A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. *Brain Res.* 372, 115–129.
- Ferreira, L.G., De Toledo Bergamaschi, C., Lazaretti-Castro, M., Heilberg, I.P., 2005. Effects of creatine supplementation on body composition and renal function in rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* 37, 1525–1529.
- Figuera, M.R., Bonini, J.S., de Oliveira, T.G., Frussa-Filho, R., Rocha, J.B., Dutra-Filho, C.S., Rubin, M.A., Mello, C.F., 2003. GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intrastratial injection of methylmalonic acid. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 465–473.
- Figuera, M.R., Royes, L.F., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Fiorenza, N.G., Frussa-Filho, R., Petry, J.C., Coelho, R.C., Mello, C.F., 2006. GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylentetrazole. *Neurobiol. Dis.* 22, 611–623.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375–400.
- Floret, D., Divry, P., Digeon, N., Monnet, P., 1979. Glutaric aciduria. 1 new case. *Arch. Fr. Pediatr.* 36, 462–470.
- Flott-Rahmel, B., Falter, C., Schluff, P., Fingerhut, R., Christensen, E., Jakobs, C., Musshoff, U., Fautek, J.D., Deufel, T., Ludolph, A., Ullrich, K., 1997. Nerve cell lesions caused by 3-hydroxyglutaric acid: a possible mechanism for neurodegeneration in glutaric acidemia I. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20, 387–390.
- Freudenberg, F., Lukacs, Z., Ullrich, K., 2004. 3-Hydroxyglutaric acid fails to affect the viability of primary neuronal rat cells. *Neurobiol. Dis.* 16, 581–584.
- Frizzo, M.E., Schwarzbold, C., Porciuncula, L.O., Dalcin, K.B., Rosa, R.B., Ribeiro, C.A., Souza, D.O., Wajner, M., 2004. 3-hydroxyglutaric acid enhances glutamate uptake into astrocytes from cerebral cortex of young rats. *Neurochem. Int.* 44, 345–353.
- Fujimoto, S., Shibata, I., Sugiyama, N., Ohba, S., Togari, H., Wada, Y., 2000. Unique electroencephalographic change of acute encephalopathy in glutaric aciduria type 1. *Tohoku J. Exp. Med.* 191, 31–38.
- Funk, C.B., Prasad, A.N., Frosk, P., Sauer, S., Kolker, S., Greenberg, C.R., Del Bigio, M.R., 2005. Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort. *Brain* 128, 711–722.
- Goodman, S.I., Norenberg, M.D., Shikes, R.H., Breslich, D.J., Moe, P.G., 1977. Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. *J. Pediatr.* 90, 746–750.
- Gregersen, N., Brandt, N.J., 1979. Ketotic episodes in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency (glutaric aciduria). *Pediatr. Res.* 13, 977–981.
- Hoffmann, G.F., Zschocke, J., 1999. Glutaric aciduria type I: from clinical, biochemical and molecular diversity to successful therapy. *J. Inherit. Metab. Dis.* 22, 381–391.

- Holtzman, D., Togliatti, A., Khait, I., Jensen, F., 1998. Creatine increases survival and suppresses seizures in the hypoxic immature rat. *Pediatr. Res.* 44, 410–414.
- Karpiak, S.E., Mahadik, S.P., Graf, L., Rapport, M.M., 1981. An immunological model of epilepsy: seizures induced by antibodies to GM1 ganglioside. *Epilepsia* 22, 189–196.
- Kelly, A., Stanley, C.A., 2001. Disorders of glutamate metabolism. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 7, 287–295.
- Klivenyi, P., Ferrante, R.J., Matthews, R.T., Bogdanov, M.B., Klein, A.M., Andreassen, O.A., Mueller, G., Wermer, M., Kaddurah-Daouk, R., Beal, M.F., 1999. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Med.* 5, 347–350.
- Klivenyi, P., Gardian, G., Calingasan, N.Y., Yang, L., Beal, M.F., 2003. Additive neuroprotective effects of creatine and a cyclooxygenase 2 inhibitor against dopamine depletion in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.* 21, 191–198.
- Kolker, S., Ahlemeyer, B., Kriegstein, J., Hoffmann, G.F., 1999. 3-Hydroxyglutaric and glutaric acids are neurotoxic through NMDA receptors in vitro. *J. Inher. Metab. Dis.* 22, 259–262.
- Kolker, S., Ahlemeyer, B., Kriegstein, J., Hoffmann, G.F., 2000a. Cerebral organic acid disorders induce neuronal damage via excitotoxic organic acids in vitro. *Amino Acids* 18, 31–40.
- Kolker, S., Ahlemeyer, B., Kriegstein, J., Hoffmann, G.F., 2000b. Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids in vitro: a new pathophysiological approach to glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr. Res.* 47, 495–503.
- Kolker, S., Ahlemeyer, B., Kriegstein, J., Hoffmann, G.F., 2001. Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr. Res.* 50, 76–82.
- Kolker, S., Kohr, G., Ahlemeyer, B., Okun, J.G., Pawlak, V., Horster, F., Mayatepek, E., Kriegstein, J., Hoffmann, G.F., 2002a. Ca²⁺ and Na⁺ dependence of 3-hydroxyglutarate-induced excitotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr. Res.* 52, 199–206.
- Kolker, S., Okun, J.G., Ahlemeyer, B., Wyse, A.T., Horster, F., Wajner, M., Kohlmüller, D., Mayatepek, E., Kriegstein, J., Hoffmann, G.F., 2002b. Chronic treatment with glutaric acid induces partial tolerance to excitotoxicity in neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *J. Neurosci. Res.* 68, 424–431.
- Ipsiroglu, O.S., Stromberger, C., Ilas, J., Höger, H., Mühl, A., Stöckler-Ipsiroglu, S., 2001. Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine monohydrate in various animal species. *Life Sci.* 69, 1805–1815.
- Latini, A., Borba Rosa, R., Scussiato, K., Llesuy, S., Bello-Klein, A., Wajner, M., 2002. 3-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. *Brain Res.* 956, 367–373.
- Latini, A., Scussiato, K., Leipnitz, G., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., 2005. Promotion of oxidative stress by 3-hydroxyglutaric acid in rat striatum. *J. Inher. Metab. Dis.* 28, 57–67.
- Lawler, J.M., Barnes, W.S., Wu, G., Song, W., Demaree, S., 2002. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 47–52.
- Leist, M., Nicotera, P., 1998. Calcium and neuronal death. *Rev. Physiol., Biochem. Pharmacol.* 132, 79–125.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464–478.
- Liesert, M., Zschocke, J., Hoffmann, G.F., Muhlhauser, N., Buckel, W., 1999. Biochemistry of glutaric aciduria type I: activities of in vitro expressed wild-type and mutant cDNA encoding human glutaryl-CoA dehydrogenase. *J. Inher. Metab. Dis.* 22, 256–258.
- Lima, T.T., Beghini, J., de Bastiani, J., Fialho, D.B., Jurach, A., Ribeiro, M.C., Wajner, M., de Mello, C.F., 1998. Pharmacological evidence for GABAergic and glutamatergic involvement in the convulsant and behavioral effects of glutaric acid. *Brain Res.* 802, 55–60.
- Malcon, C., Kaddurah-Daouk, R., Beal, M.F., 2000. Neuroprotective effects of creatine administration against NMDA and malonate toxicity. *Brain Res.* 860, 195–198.
- Michaels, R.L., Rothman, S.M., 1990. Glutamate neurotoxicity in vitro: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J. Neurosci.* 10, 283–292.
- Migues, P.V., Leal, R.B., Mantovani, M., Nicolau, M., Gabilan, N.H., 1999. Synaptosomal glutamate release induced by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *NeuroReport* 10, 67–70.
- Milh, M., Becq, H., Villeneuve, N., Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L., 2007. Inhibition of glutamate transporters results in a "suppression-burst" pattern and partial seizures in the newborn rat. *Epilepsia* 48, 169–174.
- Morton, D.H., Bennett, M.J., Seargeant, L.E., Nichter, C.A., Kelley, R.I., 1991. Glutaric aciduria type I: a common cause of episodic encephalopathy and spastic paralysis in the Amish of Lancaster County, Pennsylvania. *Am. J. Med. Genet.* 41, 89–95.
- Nagy, A.K., Shuster, T.A., Delgado-Escueta, A.V., 1986. Ecto-ATPase of mammalian synaptosomes: identification and enzymic characterization. *J. Neurochem.* 47, 976–986.
- Nanitsos, E.K., Acosta, G.B., Saihara, Y., Stanton, D., Liao, L.P., Shin, J.W., Rae, C., Balcar, V.J., 2004. Effects of glutamate transport substrates and glutamate receptor ligands on the activity of Na⁺/K⁺-ATPase in brain tissue in vitro. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31, 762–769.
- Nathanson, J.A., Scavone, C., Scanlon, C., McKee, M., 1995. The cellular Na⁺ pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. *Neuron* 14, 781–794.
- O'Gorman, E., Beutner, G., Dolder, M., Koretsky, A.P., Brdiczka, D., Wallimann, T., 1997. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 414, 253–257.
- Petrushanko, I., Bogdanov, N., Bulygina, E., Grenacher, B., Leinsoo, T., Boldyrev, A., Gassmann, M., Bogdanova, A., 2006. Na⁺-K⁺-ATPase in rat cerebellar granule cells is redox sensitive. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R916–R925.
- Porciuncula, L.O., Dal-Pizzol Jr., A., Coitinho, A.S., Emanuelli, T., Souza, D.O., Wajner, M., 2000. Inhibition of synaptosomal [3H] glutamate uptake and [3H]glutamate binding to plasma membranes from brain of young rats by glutaric acid in vitro. *J. Neurol. Sci.* 173, 93–96.
- Porciuncula, L.O., Emanuelli, T., Tavares, R.G., Schwarzbald, C., Frizzo, M.E., Souza, D.O., Wajner, M., 2004. Glutaric acid stimulates glutamate binding and astrocytic uptake and inhibits vesicular glutamate uptake in forebrain from young rats. *Neurochem. Int.* 45, 1075–1086.
- Rosa, R.B., Schwarzbald, C., Dalcin, K.B., Ghisleni, G.C., Ribeiro, C.A., Moretto, M.B., Frizzo, M.E., Hoffmann, G.F., Souza, D.O., Wajner, M., 2004. Evidence that 3-hydroxyglutaric acid interacts with NMDA receptors in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of young rats. *Neurochem. Int.* 45, 1087–1094.
- Royes, L.F., Figuera, M.R., Furian, A.F., Oliveira, M.S., da Silva, L.G., Malfatti, C.R., Schneider, P.H., Braga, A.L., Wajner, M., Mello, C.F., 2003. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neuroscience* 118, 1079–1090.
- Royes, L.F., Figuera, M.R., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Myskiw Jde, C., Fiorenza, N.G., Petry, J.C., Coelho, R.C., Mello, C.F., 2006. Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83, 136–144.
- Schneider Oliveira, M., Flavia Furian, A., Freire Royes, L.F., Rechia Figuera, M., de Carvalho Myskiw, J., Gindri Fiorenza, N., Mello,

- C.F., 2004. Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128, 721–728.
- Sepkuty, J.P., Cohen, A.S., Eccles, C., Rafiq, A., Behar, K., Ganel, R., Coulter, D.A., Rothstein, J.D., 2002. A neuronal glutamate transporter contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy. *J. Neurosci.* 22, 6372–6379.
- Sestili, P., Martinelli, C., Bravi, G., Piccoli, G., Curci, R., Battistelli, M., Falcieri, E., Agostini, D., Gioacchini, A.M., Stocchi, V., 2006. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 837–849.
- Ullrich, K., Flott-Rahmel, B., Schluff, P., Musshoff, U., Das, A., Lucke, T., Steinfeld, R., Christensen, E., Jakobs, C., Ludolph, A., Neu, A., Roper, R., 1999. Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration. *J. Inherit. Metab. Dis.* 22, 392–403.
- Volterra, A., Trotti, D., Tromba, C., Floridi, S., Racagni, G., 1994. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 14, 2924–2932.
- Wajner, M., Kolker, S., Souza, D.O., Hoffmann, G.F., de Mello, C.F., 2004. Modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27, 825–828.
- Wick, M., Fujimori, H., Michaelis, T., Frahm, J., 1999. Brain water diffusion in normal and creatine-supplemented rats during transient global ischemia. *Magn. Reson. Med.* 42, 798–802.
- Wyse, A.T., Streck, E.L., Barros, S.V., Brusque, A.M., Zugno, A.L., Wajner, M., 2000. Methylmalonate administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *NeuroReport* 11, 2331–2334.
- Wyss, M., Kaddurah-Daouk, R., 2000. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.* 80, 1107–1213.

4.2. Capítulo II – Determinação dos efeitos de uma baixa concentração de GA na captação de L-[³H]glutamato e formação de ER em sinaptossomas de estriado de ratos *in vitro*.

**Manuscrito aceito para publicação na revista International Journal of
Developmental Neuroscience**

**KINETIC CHARACTERIZATION OF L-[³H]GLUTAMATE UPTAKE
INHIBITION AND INCREASE OXIDATIVE DAMAGE INDUCED BY
GLUTARIC ACID IN STRIATAL SYNAPTOSOMES OF RATS**

Magni, D.V., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Souza, M.A., Lunardi, F., Ferreira, J., Mello, C.F., Royes L.F.F., Figuera M.R.

Kinetic characterization of L-[³H]glutamate uptake inhibition and increase
oxidative damage induced by glutaric acid in striatal synaptosomes of
rats

Danieli Valnes Magni^a, Ana Flávia Furian^{a,c}, Mauro Schneider Oliveira^{a,c}, Mauren
Assis Souza^{a,e}, Fabiane Lunardi^d, Juliano Ferreira^d, Carlos Fernando Mello^a, Luiz
Fernando Freire Royes^{a,d,e}, Michele Rechia Fighera^{a,b, f*}

^a Centro de Ciências da Saúde
Laboratório de Psicofarmacologia e Neurotoxicidade
Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900
Santa Maria, RS, Brasil.

^b Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Pediatria
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900
Santa Maria, RS, Brasil.

^c Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003.
Porto Alegre, RS, Brasil

^d Centro de Ciências Naturais e Exatas
Laboratório de Neurotoxicidade
Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900
Santa Maria, RS, Brasil.

^e Centro de Educação Física e Desportos.
Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Universidade Federal de Santa Maria,
97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

^f Universidade Luterana do Brasil.
Campus de Santa Maria,
Santa Maria, RS, Brasil.

Work supported by CNPq, CAPES

*Corresponding author: Dr^a. Michele Rechia Fighera
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Pediatria
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900
Santa Maria, RS, Brasil
FAX: +55 55 3220 9378
e-mail: mrfighera@yahoo.com.br

ABSTRACT

Glutaric acidemia type I (GA-I) is an inherited metabolic disease characterized by accumulation of glutaric acid (GA) and striatal degeneration. Although growing evidence suggests that excitotoxicity and oxidative stress play central role in the neuropathogenesis of this disease, mechanism underlying striatal damage in this disorder is not well established. Thus, we decided to investigate the *in vitro* effects of GA 10 nM (a low concentration that can be present initial development this disorder) on L-[³H]glutamate uptake and reactive oxygen species (ROS) generation in synaptosomes from striatum of rats. GA reduced L-[³H]glutamate uptake in synaptosomes from 1 up to 30 min after its addition. Furthermore, we also provided some evidence that GA competes with the glutamate transporter inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC), suggesting a possible interaction of GA with glutamate transporters on synaptosomes. Moreover, GA produced a significant decrease in the V_{MAX} of L-[³H]glutamate uptake, but did not affect the K_D value. Although the GA did not show oxidant activity *per se*, it increased the ROS generation in striatal synaptosomes. To evaluate the involvement of reactive species generation in the GA-induced L-[³H]glutamate uptake inhibition, trolox (0.6, 3 and 6 μ M) was added on the incubation medium. Statistical analysis showed that trolox did not decrease inhibition of GA-induced L-[³H]glutamate uptake, but decreased GA-induced reactive species formation in striatal synaptosomes (1, 3, 5, 10, 15 and 30 min), suggesting that ROS generation appears to occur secondarily to glutamatergic overstimulation in this model of organic acidemia. Since GA induced DCFH oxidation increase, we evaluate the involvement of glutamate receptor antagonists in oxidative stress, showing that CNQX, but not MK-801, decreased the DCFH oxidation increase in striatal synaptosomes. Furthermore, the results presented in this report suggest that excitotoxicity elicited by low concentration of GA, could be in part by maintaining this excitatory neurotransmitter in the synaptic cleft by non-competitive inhibition of glutamate uptake. Thus the present data may explain, at least partly, initial striatal damage at birth, as evidenced by acute bilateral destruction of caudate and putamen observed in children with GA-I.

Key words: glutaric acid; striatum; excitotoxicity; glutamate; synaptosomes; reactive oxygen species; kinetic.

1. Introduction

Glutaric acidemia type I (GA-I) is an autosomal recessive inherited neurometabolic disease caused by deficiency of the activity of the mitochondrial enzyme glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH; EC 1.3.99.7), characterized biochemically by an accumulation of glutaric acid (GA), and 3-hydroxyglutaric acid (3-OH-GA) in the body fluids and brain tissue (GA, 500–5000 μM ; 3-OH-GA, 40–200 μM) of affected patients (Goodman et al., 1977; Liesert et al., 1999; Goodman and Freman, 2001; Strauss and Morton, 2003; Strauss et al., 2003). Clinical manifestations of GA-I are predominantly neurological, including generalized convulsions, progressive dystonia and dyskinesia, especially after encephalopathic crises, which are accompanied by bilateral and irreversible destruction of vulnerable brain regions, *i.e.* striatum and cortex (Morton et al., 1991; Hoffmann and Zschocke, 1999).

In this scenario, a considerable body of evidence have indicated that GA and 3-GA can induce brain damage by energy depletion (Ullrich et al., 1999; Silva et al., 2000; Das et al., 2003; Ferreira et al., 2005; Latini et al., 2005a), oxidative stress (Latini et al., 2002, 2005b; de Oliveira Marques et al., 2003, Figuera et al., 2006) and primary or secondary excitotoxicity (Kölker et al., 1999, 2000a, 2002a,b; de Mello et al., 2001; Porciúncula et al., 2004; Rosa et al., 2004). Furthermore, it has been suggested that these mechanisms might cooperate in a synergistic way to cause the neuropathological alterations found in GA-I patients (Kölker et al., 2004a; Wajner et al., 2004).

With regard to excitotoxicity, postmortem examination of the basal ganglia and cerebral cortex of patients with GA-I revealed postsynaptic vacuolization characteristic of glutamate-mediated brain damage indicating that this process may represent an important mechanism underlying the pathophysiology of this disorder. (Goodman et al., 1977; Forstner et al., 1999; Hoffmann and Zschocke, 1999). Nevertheless, although there is convincing evidence of the participation of glutamate in the toxicity of GA, the primary cause of striatum degeneration in GA-I is still not well defined (Kölker et al., 2001, 2002a,b, Koeller et al., 2002; Latini et al., 2005a; de Oliveira Marques et al., 2003; Ferreira et al., 2005). While some experimental findings demonstrate that GA and 3-OHGA are excitotoxic to cultured neurons and may interact with glutamate receptors or transporters (Flott-Rahmel et al., 1997; Kölker et al., 1999; 2002a,b;

2004b; Rosa et al., 2004 ; Wajner et al., 2004), recent works did not show excitotoxic actions by 3-OHGA (Lund et al., 2004; Freudenberg et al., 2004). Thus, the role of excitotoxicity in GA-I neuropathophysiology is still under intense debate.

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the brain, and its interaction with specific membrane receptors is responsible for many functions such as cognition, memory and movement (Ozawa et al., 1998). The role of glutamate in mammalian brain is mediated by activation of ionotropic receptors and metabotropic receptors (Nakanishi, 1992; Hollmann and Heinemann, 1994; Ozawa et al., 1998). Ionotropic receptors can be divided into N-methyl-D-aspartate (NMDA: NR1 and NR2A-D) and non-NMDA, the latter including the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA: GluR1-4) and kainate (GluR5-9 and KA1-2) receptors. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) have been divided into groups I, II and III (Conn and Pin, 1997; Ozawa et al., 1998). Glutamate receptors are involved in a variety of physiological processes during brain development, including synaptogenesis and synaptic plasticity, and present a unique profile of susceptibility to toxicity mediated by differential activation of the receptor subtypes (McDonald and Johnston, 1990). Ionotropic receptor ontogeny is characterized by rapid maturational changes in various forebrain structures in the rat. NMDA receptor expression reaches the highest level in hippocampus and neocortex in the first postnatal week, whereas AMPA receptors density peaks occur in the second postnatal week (Insel et al., 1990; Petralia et al., 1999). This variable receptor expression profile generates a regional- and age-specific window of susceptibility to many neurotoxins and diseases (Kölker et al., 2000a; Haberny et al., 2002; Jensen, 2002).

The synaptic actions of glutamate are terminated by its removal from the synaptic cleft by a high-affinity sodium-dependent excitatory amino acid transporter (EAAT) system, mainly located in the astrocytic membranes (Danbolt, 2001; Amara and Fontana, 2002). The astroglial glutamate transporters GLAST (EAAT1) and GLT1 (EAAT2) are mainly responsible for the clearance of extracellular glutamate (Rothstein et al., 1996; Danbolt, 2001).

Besides its physiological effects, glutamate is also a potent neurotoxin and the presence of high amounts of this neurotransmitter in the synaptic cleft may lead to excitotoxicity by over-stimulation of glutamate receptors, a process related to neuropathology of acute (brain hypoxia, ischemia and trauma) and chronic

(Parkinson's disease, Alzheimer's disease and organic acidemias) brain disorders (Lipton and Rosenberg, 1994; Maragakis and Rothstein, 2001; Wajner et al., 2004; Kölker et al., 2008).

In models of glutaric acidemia, a considerable body of evidence suggest that neurotoxic actions elicited by GA and 3-OHGA are due the similar chemical structure of this organic acids with glutamate (Flott-Rahmel et al., 1997; Lima et al., 1998; Kölker et al., 1999; 2000a,b; 2002a,b; Ullrich et al., 1999; Porciúncula et al., 2000; 2004; de Mello et al., 2001; Rosa et al., 2004). In this context, it has been demonstrated that 3-OH-GA decreases cell viability by *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors stimulation (Kölker et al., 2000a,b) and ROS generation (Kölker et al., 2001). Furthermore, recent studies have suggested the GA-induced neurotoxicity can be due inhibition of glutamate uptake related with an interaction of GA with glutamate transporters, leading to an increase of the glutamate levels in synaptic cleft and overstimulation glutamate receptors (Porciúncula et al., 2000; 2004; Magni et al., 2007). On the other hand, the activity of glutamate transporters can also be reduced by indirect mechanisms, including reactive species formation (Volterra et al., 1994; Nanitsos et al., 2004).

Thus, considering that mechanism involved the primary striatal damage in the GA-I is not well established, we decided investigate whether low concentration of GA (that can be present in the initial development of this disorder -10 nM) alter L-[³H]glutamate uptake. In this context, we evaluated the kinetic parameters dissociation constant (K_D) and maximum velocity (V_{MAX}) of glutamate transport to evaluate whether GA-induced reduction on L-[³H]glutamate uptake could be due to competitive or non-competitive mechanism. Furthermore, we investigated the involvement of striatal ROS generation induced by GA on the L-[³H]glutamate uptake. In addition, we also evaluated the effects of the glutamate receptor antagonists and transporters inhibitor on the oxidative stress and L-[³H]glutamate uptake, respectively.

2. Experimental Procedures

2.1. Animal and reagents

Adult male Wistar rats (270-300g) maintained under controlled light and environment (12:12 h light-dark cycle, $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 55% relative humidity) with free access to food (Guabi, Santa Maria, Brazil) and water were used. Animal utilization

protocols followed the Official Government Ethics guidelines and were approved by the University Ethics Committee. L-[³H]glutamate (49 Ci/mmol) was purchased from Amersham International, UK. All other reagents, including glutaric acid free acid (GA, 99% pure), were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.2. Synaptosomal preparation

The animals were sacrificed by decapitation and had their brain exposed by the removal of the parietal bone. A punch of the striatum was rapidly removed and synaptosomal preparation was obtained by isotonic Percoll/sucrose discontinuous gradients at 4 °C, as previously described (Dunkley et al., 1988). Briefly, homogenates (10%, w/v) from striatum were made in 5 mM HEPES and 320 mM sucrose (pH 7.4), and centrifuged twice at 800 × *g* for 10 min to produce a pellet (P1) and a supernatant (S1). P1 was discarded and S1 was subjected to 16, 10, 7.5 % Percoll solution density gradient centrifugation at 24,000 × *g* for 10 min. The synaptosomal fractions were isolated, suspended and homogenized in Krebs' buffer (pH 7.4), containing in mM: 145 NaCl, 5 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 20 HEPES, 10 glucose and 1.2 CaCl₂ and centrifuged at 15,000 × *g* for 10 min. The supernatant was removed and the pellet resuspended in Krebs' buffer. The synaptosomal fraction used contained approximately 1 mg of protein/ml. This fraction also contained approximately 5% contamination with fragments of the inner and outer mitochondrial membranes, microsomes, myelin, as well as neural and glial plasma membranes (Dunkley et al., 1988; Nagy et al., 1986; Miguez et al., 1999).

2.3. Synaptosomal L-[³H]glutamate uptake

Assays were performed in a final volume of 500 μl in a standard incubation medium composed of Krebs' buffer and 5 μM (3700 Bq) of L-[³H]glutamate (1.81 GBq/mol, Amersham International, UK).

The synaptosomal L-[³H]glutamate uptake was performed in the presence of GA (10 nM). This concentration of GA was previously reported to reduce L-[³H]glutamate uptake in forebrain synaptosomes (Porciúncula et al., 2000). Controls did not contain glutaric acid. The uptake was carried out for 1, 3, 5, 10, 15 and 30 minutes at 37 °C after the addition of synaptosomes (100 μg of protein/tube) and stopped by centrifugation (16,000 × *g* for 1 min at 4 °C). Radioactivity in the

synaptosomal pellet was measured in a Wallac 1409 liquid scintillation counter. The specific L-[³H]glutamate uptake was calculated as the difference between total uptake at 37 °C and the uptake at 4 °C (non-specific uptake).

Kinetic analysis assay of L-[³H]glutamate uptake was performed in an incubation medium composed of Krebs' buffer in a final volume of 500 µl containing labeled and unlabeled glutamate at final concentrations ranging from 0.625 to 320 µM. The synaptosomal L-[³H]glutamate uptake was performed in the presence of GA (10 nM). Controls did not contain GA. The uptake was carried out for 10 minutes at 37 °C after the addition of synaptosomes from striatum (100 µg of protein/tube) and followed how above described. Kinetic parameters K_D and V_{MAX} for synaptosomal L-[³H]glutamate uptake were determined by nonlinear regression analysis (GraphPad Software, San Diego, CA).

In order, to evaluate the involvement of glutamate transporters on the GA-induced L-[³H]glutamate uptake reduction, the experiments were done in the presence of 50 µM L-*trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC), which is a substrate inhibitor of glutamate transporters.

To evaluate whether oxidative stress could alter GA-induced L-[³H]glutamate uptake reduction, other experiment was done in the presence of the synthetic antioxidant trolox (0.6, 3 and 6 µM), a water-soluble derivative of vitamin E with potent antioxidant properties, for 10 minutes at 37°C (Dreiem and Seegal, 2007).

2.4. Synaptosomal Reactive Species Formation

Reactive oxygen species were assayed using 2',7'- dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), which is de-esterified within synaptosomes to the ionized free acid, dichlorofluorescein, DCFH. This is trapped within cells and thus accumulated. DCFH is capable of being oxidized to the fluorescent 2',7'- dichlorofluorescein by reactive oxygen. The utility of this probe in isolated subcellular cerebral systems has been described (Bondy et al., 1998). Assays were performed in a final volume of 2000 µl in a standard incubation medium composed of Krebs' buffer, 100 µl synaptosomes (1mg/ml). The synaptosomes were loaded with 5 µM DCFH-DA for 15 min at 37°C. This incubation was stopped by centrifugation (16,000 x g for 5 min). The synaptosomal pellet was resuspended in Krebs' buffer in a final volume of 2000 µl. In this solution was added GA 10 nM and was read a long time for 1, 3, 5, 10, 15 and 30 min at 37°C. Controls did not contain GA. The fluorescence was determined on a

spectrofluorometer, with excitation wavelength at 488 nm, and emission wavelength 525 nm.

Other experiment was done in the presence of trolox (0.6, 3 and 6 μM) for 10 minutes at 37°C (Dreiem and Seegal, 2007), to evaluate whether this antioxidant could decrease GA-induced synaptosomal reactive species formation.

The synaptosomal reactive species formation was also determined in the presence of NMDA glutamate receptor antagonist, dizocilpine (MK-801; 5 μM) (Tavares et al., 2000) and non-NMDA glutamate receptor antagonist, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; 100 μM) (Barnes et al., 1994), to investigate the involvement of glutamate receptors on the GA-induced DCFH oxidation increase in striatal synaptosomes.

2.5. Lactate dehydrogenase (LDH) assay

Synaptosomes were incubated at 37 °C for 30 min in Krebs' buffer in the presence or absence of 10 nM GA. Viability was assessed by measuring the release of the cytosolic enzyme lactate dehydrogenase (LDH). LDH measurement was carried out in 25 μl aliquots using the LDH kit from Labtest reagents, Brazil. The LDH activity in the incubation medium was assayed spectrophotometrically at a wavelength of 340 nm. The results were expressed as percentage of total LDH release. Total LDH release (100% release) was achieved with 1% Triton X-100 in the incubation medium. Under the experimental conditions used, no changes in LDH were observed.

2.6. Chemiluminescence generated in cell-free systems

The assays were conducted in a standard medium composed of phosphate buffered saline (PBS, 10 mM KH_2PO_4 and 150 mM NaCl, pH 7.4) and luminol (50 mM, prepared daily in PBS) mixture. In this medium was added H_2O_2 (3.5 mM) or GA (10 nM). Controls contained only phosphate buffered saline and luminol mixture. Chemiluminescence generated was measured continuously for 3 min (Yildiz et al., 1998).

2.7. Protein determination

Protein content was measured colorimetrically by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (1 mg/ml) as a standard.

2.8. Statistics

The synaptosomal L-[³H]glutamate uptake and DCFH oxidation were analyzed by one- or two-way ANOVA, with time of measures treated as within subject factor, depending on the experimental design, followed by a Student-Newman-Keuls test. Data from kinetic analysis of Na⁺-dependent transport of synaptosomal L-[³H]glutamate uptake in the presence and absence the GA were analyzed by a student's *t*-test for paired and independent samples. Effect of trolox in the synaptosomal L-[³H]glutamate uptake and DCFH oxidation were analyzed by a 2 (presence or absence of trolox) × 2 (presence or absence of GA) factorial ANOVA. Effect of PDC in the synaptosomal L-[³H]glutamate uptake was analyzed by a 2 (presence or absence of PDC) × 2 (presence or absence of GA) factorial ANOVA. Effect of glutamate receptor antagonists, MK-801 and CNQX, in the DCFH oxidation was analyzed by a 2 (presence or absence of MK-801/CNQX) × 2 (presence or absence of GA) factorial ANOVA. *Post hoc* analyses were carried out by the *F* test for simple effect or the Student-Newman-Keuls test, when appropriate. All data are expressed as mean ± S.E.M. *P*<0.05 was considered significant.

3. Results

We first evaluated the effect GA (10 nM) on L-[³H]glutamate uptake by striatum synaptosomes of rats. Figure 1 shows that GA significantly decreased L-[³H]glutamate uptake into striatum synaptosomes as compared to controls [*F*(5,60)=23.56; *P*<0.001]. In order to verify whether cellular death could be responsible for the GA-induced glutamate uptake reduction, we evaluated the viability of striatum synaptosomes measured by LDH release assays. Statistical analysis revealed that synaptosomes incubated for 30 min with GA (10 nM) showed no significant leakage of the cytosolic marker LDH as compared to controls. Percentages of the total LDH content achieved by synaptosomal disruption with Triton X-100 were: 25.71 ± 2.51 (control); 25.06 ± 2.04 (GA 10 nM, *n* = 4 experiments).

Next experiments, we evaluated the involvement of the inhibitor of glutamate transporters PDC on the Na⁺-dependent L-[³H]glutamate uptake in the presence or absence of GA in striatal synaptosomes. We observed that both GA and PDC inhibited Na⁺-dependent L-[³H]glutamate uptake. Furthermore, GA did not change the inhibitory effect of PDC [*F*(1,16)=12.7; *P*<0.005] (Figure 2).

Figure 3 shows alterations on kinetic parameters of the glutamate uptake induced by the low concentration of GA. The hyperbolic glutamate concentration-velocity curve demonstrates typical substrate saturation kinetics expected of Na⁺-dependent glutamate transport in synaptosomes, with K_D value of 29.8±4.4 μM and V_{MAX} of 77.5±3.5 μmoles/kg protein/min. Statistical analysis revealed that GA significantly decreased [t=2.35; P<0.05] V_{MAX} (to 66.6±2.8 μmoles/kg protein/min) and did not change [t=0.91; P>0.05] K_D value (23.6±3.4 μM) of glutamate uptake as compared to controls.

Considering that glutamate uptake transporters can also be reduced by indirect mechanisms, including reactive species formation, we decided to verify the effect of GA on the synaptosomal oxidative stress. Statistical analysis that GA did not show oxidant activity per se as compared to H₂O₂ (data not shown), but increased [F(5,30)=80.06; P<0.001] DCFH oxidation in striatal synaptosomes at all times (1, 3, 5, 10, 15 and 30 min), as compared to control (Figure 4). In addition, we observed that trolox (0.6, 3 and 6 μM) decreased [significant treatment (control or trolox) by treatment (control or GA) interaction: F(3,24)=8.37; P<0.001] GA-induced oxidative stress production by synaptosomal preparations from striatum (Figure 5). However, statistical analysis revealed that trolox (0.6, 3 and 6 μM) did not decrease inhibition of glutamate uptake [F(3,56)=0.76; P>0.05] induced by GA (Figure 6).

Since GA increased DCFH oxidation in striatal synaptosomes, we decided to investigate whether ionotropic glutamate receptors were involved in the currently described increase of oxidative stress by GA. Statistical analysis showed that the non-NMDA glutamate receptor antagonist CNQX decreased [F(2,24)=6.49; P<0.01] GA-induced DCFH oxidation increase (Figure 7). In contrast, the addition of the NMDA glutamate receptor antagonist MK-801 in medium of incubation did not protect against GA-induced oxidative stress. These results agree with previous studies that demonstrated the lack of effect of NMDA glutamate antagonists against GA-induced decrease of Na⁺-independent glutamate binding to synaptic membranes and convulsions (Lima et al., 1998; Dalcin et al., 2007).

4. Discussion

Although the pathophysiology of GA-I is not yet fully established, the excitotoxicity has been proposed as an important neurotoxic mechanism in GA-I, especially due to the structural similarity between glutamate, GA and 3-OH-GA (Flott-Rahmel et al., 1997; Lima et al., 1998; Kölker et al., 1999, 2004b; Wajner et al., 2004; Rosa et al., 2004). It is conceivable that some conflicting results about GA-induced excitotoxicity could be due to the ontogenetic and organ specific differences of glutamate receptor and transporter expression (McDonald and Johnston, 1990; Ullensvang et al., 1997; Furuta et al., 1997; Ozawa et al., 1998). Therefore, the present investigation was undertaken to evaluate the effect of GA, at the lower concentration present during initial development of GA-I, on L-[³H]glutamate uptake and reactive species formation from striatum synaptosomal of rats. Furthermore, we evaluated, for first time, what kinetic parameters of glutamate uptake could be altered by GA.

In the present study, we have initially shown a time curve where the GA decreased L-[³H]glutamate uptake from striatal synaptosomes in all times tested. However, this effect was not due to cellular death, as evidenced by LDH viability test, suggesting that specific glutamate transporters localized in striatum could be responsible for that effect. Considering that the glial GLAST and GLT1 glutamate transporters and the neuronal glutamate transporter EAAC1 can be present in synaptosomes preparations (Tanaka et al., 1997; Danbolt, 2001), it is plausible to propose that one or more of these transporters could serve as a target for GA inhibitory effect. In agreement with this view, previous studies have demonstrated that glutamate uptake in synaptosomal preparations is mediated by GLT1 transporters (Robinson et al., 1993; Bridges et al., 1999). Moreover, it has been demonstrated that synaptosomes prepared from GLT1 deficient mutant mice have very low uptake activities (Tanaka et al., 1997; Danbolt, 2001). Furthermore, Western blotting analysis revealed that EAAC1 and GLAST transporters are also present on the striatum of rats at later ages (Furuta et al., 1997).

An important result of the present investigation was that a low concentration of GA (10 nM) significantly reduced the efficacy (V_{MAX}), but not the affinity (K_D) of glutamate uptake in striatal synaptosomes. These findings suggest that glutamate

uptake reduction induced by low concentration of GA is due non-competitive inhibition. Our results are in agreement with previous findings demonstrating that a high concentration of GA (1 mM) may reduce glutamate uptake in synaptosomes of whole brain (Porciúncula et al., 2000). Moreover, it was shown that 1 mM, but not 1 or 10 nM, of GA reduced the sodium-dependent glutamate binding in plasma membranes of whole brain, indicating that GA directly interacts with glutamate transporters (Porciúncula et al., 2000). In accordance with that idea that low concentration of GA did not directly interact with glutamate transporter, our kinetic data revealed that GA (10 nM) did not alter K_D value for glutamate uptake in striatal synaptosomes. Furthermore, the reduction in glutamate uptake produced by low concentrations of GA is mediated by a decrease in V_{Max} , which is consistent with a non-competitive inhibition of glutamate transporters. Thus, GA could reduce glutamate uptake directly by an interaction with an allosteric site in glutamate transporters (as acts reactive species). In fact, our experiments showed that the simultaneous addition of the glutamate transporter inhibitor PDC (50 μ M) and GA (10 nM) did not alter the inhibitory effect on the glutamate uptake in striatal synaptosomes compared to the effect elicited by PDC alone, indicating that GA can be binding to glutamate transporters and that this disturbance of glutamatergic neurotransmission may explain, at least in part, cerebral damage observed in GA-I.

Other point to be considered is that glutamate transporter activity can be inhibited by oxidation (Volterra et al., 1994; Trotti et al., 1996, 1998; Nanitsos et al., 2004). Thus, we evaluated whether GA-induced glutamate uptake reduction can be due to reactive species formation in the striatum synaptosomes of rats. Although trolox protects against GA-induced DCFH oxidation increase in all concentrations, it did not protect against GA-induced glutamate uptake reduction on the synaptosomes of cerebral structure studied, suggesting that ROS formation is a late event in the GA-induced neurotoxicity. Our results are in agreement with previous findings demonstrating that even though trolox may reduce DCFH increase to control levels (Dreiem and Seegal, 2007), it provides no protection against inhibition of aspartate uptake induced by methylmercury (MeHg) (Allen et al., 2001). Taken together these observations, our results suggest that the excitotoxicity induced by low GA concentration can be the initial mechanism of striatal damage and that free radical generation can occur secondarily to glutamatergic overstimulation, a fact that may be

related to striatum degeneration observed in GA-I patients. Furthermore, since that a previous study showed that GA inhibited synaptosomal glutamate uptake at 1mM concentration (Porciúncula et al., 2000), it may be presumed that much lower intracellular concentrations of GA (10 nM) are sufficient to inhibit glutamate transport and increase oxidative stress. In line of this view, it has been reported that slight reduction on the excitatory neurotransmitter uptake can account an excitotoxic response (Allen et al., 2001).

Besides, we cannot rule out the possibility of that GA may also stimulate glutamate receptors since we found that DCFH oxidation increase provoked by GA was significantly attenuated by the non-NMDA receptor antagonist, but not by MK-801, suggesting that these receptors contributed, at least partly, to the GA-induced oxidative stress. Our present findings may possibly explain a previous *in vivo* report showing that the behavioral alterations and convulsions provoked by intrastriatal administration of GA, in the same dose that caused oxidative stress (Figuera et al., 2006), were prevented by the non-NMDA antagonist DNQX, but not by the NMDA antagonist MK-801 in adult rats (Lima et al., 1998). Reinforcing this point, a recent report also showed that GA can bind to non-NMDA receptors in brain from rats (Porciúncula et al. 2004; Dalcin et al., 2007).

In addition, it has been demonstrated that glutamate transporters are mainly responsible for the maintenance of low extracellular glutamate concentrations (Rothstein et al., 1996; Danbolt, 2001; Amara and Fontana, 2002). Moreover, the transporter system present in synaptosomes has been considered as an important step for the modulation of the glutamatergic system by controlling the glutamate–glutamine cycle (Otis, 2001). Thus, inhibiting glutamate uptake, GA probably alters the synaptic turnover of glutamate, possibly leading to an increased cytosolic pool of the excitatory neurotransmitter, which in turn may result stimulation of glutamate receptors, causing intracellular Ca^{2+} increase, and leading to ROS generation (Volterra et al., 1994; Nanitsos et al., 2004). We hypothesize that this sequence of events is responsible for the GA-induced neurochemical alterations reported here. Taken together these observations and previous reports demonstrating that low GA concentration inhibits glutamate uptake (Porciúncula et al. 2004) and markedly reduces viability of neurons in culture via glutamate receptors (Kölker et al. 2000a,b), it is conceivable that our results may be related to these findings.

In this context, these mechanisms may explain the involvement of the glutamatergic system in the neuronal toxicity, convulsions and oxidative damage elicited by GA in rats (Kölker et al., 2001; Figuera et al., 2006; Magni et al., 2007; Rosa et al., 2007). Furthermore, the results presented in this report may be related to some of the pathological changes observed in patients with GA-I such as the post-synaptic vacuolization characteristic of excitotoxic neuronal death (Olney, 1980), which has been described in post-mortem examination of the brain of patients with GA-I (Amir et al., 1987). In fact, previous studies have demonstrated the presence of glutamate receptors in the basal ganglia and the characteristic lesions of these cerebral structures in GA-I (Amir et al., 1987; Goodman et al., 1995).

To determine precisely whether the induction of free radicals by GA occurs indirectly via its inhibitory activity on cellular metabolism, or whether it is a direct source of free radicals because of its chemical reactivity, we verified whether GA (10 nM) could increase chemiluminescence in cell-free system. We observed that GA did not show oxidant activity *per se* (data not shown), indicating that chemical reactivity of GA is not direct source of free radicals. In addition, these results reinforce the assumption that ROS generation elicited by this organic acid occur indirectly (Wajner et al., 2004) and that, in low concentration, some degree of cellular intactness is required to GA induce oxidative damage. In this context, it has been proposed that GA and 3-OHGA induce striatal degeneration by disrupting mitochondrial energy metabolism (Ulrich et al., 1999; Das et al., 2003; Ferreira et al., 2005), increasing glutamatergic neurotransmission (Wajner et al., 2004) and promoting oxidative stress (de Oliveira Marques et al., 2003; Latini et al., 2002; 2005b), which ultimately causes secondary excitotoxicity (Kölker et al., 1999; 2000a,b, 2002a,b; Porciúncula et al., 2004; Rosa et al., 2004).

Mechanisms other than glutamatergic facilitation have been claimed to account for the neurotoxic actions of GA, such as Na^+, K^+ -ATPase activity and GABAergic mechanisms inhibition induced by GA (Figuera et al., 2006), inhibition of α -ketoglutarate dehydrogenase complex by glutaryl-CoA (Sauer et al., 2005) and bioenergetic impairment (Sauer et al., 2005). Therefore, we cannot rule out that the neurotoxic effects of GA on the glutamate uptake and free radicals production may be mediated, at least in part, by one of these mechanisms (Figuera et al., 2006; Sauer et al., 2006). However, specific studies are necessary to determine the involvement of these alternative mechanisms in the currently described excitotoxic effect of GA-

induced on glutamate uptake and oxidative stress increase, and if these events are closely linked.

As regards to the physiological significance of our findings, although we cannot establish with certainty whether our *in vitro* data is related to the neurotoxicity observed in GA-I *in vivo*, it should be emphasized that the effects provoked by GA were observed with concentrations similar to those encountered in brain of glutaric acidemic patients (Goodman et al., 1977; Kölker et al., 2003; Kulkens et al., 2005, Sauer et al., 2006). Furthermore, the degree of alterations of the glutamatergic system detected in our study is accepted to cause excitotoxicity in systems testing the effect of potential excitotoxins (Ozawa et al., 1998; Allen et al., 2001; Danbolt, 2001; Meldrum, 2002).

In conclusion, to our knowledge this is the first report showing a kinetic study to glutamate uptake in the presence GA in striatum synaptosomes of rats. Furthermore, taken together our results suggest that the inhibition of glutamate uptake on synaptosomes by the metabolite could result in elevated concentrations of the excitatory neurotransmitter in the synaptic cleft and secondary stimulation of glutamate receptors by GA (a glutamate structurally similar molecule). This glutamatergic neurotransmission increase can lead to reactive species formation and potentially causing excitotoxicity to neural cells, a fact that may be related to the brain damage characteristic of glutaric acidemia type I. The present data may explain, at least partly, initial striatal damage at birth, as evidenced by acute bilateral destruction of caudate and putamen observed in children with GA-I (Goodman, 2004). However, further investigation should be carried out to define initial mechanisms that can be involved on striatum degeneration in this disorder.

Acknowledgements

Work supported by CNPq (grant: 500120/2003-0), C.F. Mello, J. Ferreira and A.F. Furian are the recipients of CNPq fellowships. M. Schneider Oliveira and D. V. Magni are the recipients of CAPES fellowships.

Figure Legends

Figure 1. Effect of glutaric acid (10 nM) on L-[³H]glutamate uptake by synaptosome from striatum of rats. Data are mean \pm S.E.M. for n= 6 in each group. **P*<0.001 as compared to control (Student-Newman-Keuls test).

Figure 2. Effect of PDC (in the absence and presence glutaric acid) on L-[³H]glutamate uptake by synaptosome from striatum of rats. Data are mean \pm S.E.M. for n= 5 in each group. **P*<0.005 as compared to control; #*P*<0.005 as compared to GA group (Student-Newman-Keuls test).

Figure 3. Effect of glutaric acid (10 nM) on kinetic analysis of high affinity, Na⁺ - dependent transport L-[³H]glutamate uptake by synaptosome from striatum of rats. Data are mean μ mol/kg protein/min \pm S.E.M. for n= 6 in each group. Corresponding kinetic analysis (V_{MAX} = μ mol/kg protein; K_D = μ M) are provided and insert in table. **P*<0.05 as compared to control (Student's *t*-test).

Figure 4. Effect of glutaric acid on DCFH oxidation by synaptosome from striatum of rats. The DCFH oxidation increase initiated 1 min after GA administration and persisted up to the end of the incubation period (30 min). Data are the means \pm SEM n = 4 animals in each group. **P*<0.001 compared with control (Student-Newman-Keuls test).

Figure 5. Effect of trolox (in the absence and presence glutaric acid) on DCFH oxidation by synaptosome from striatum of rats. Data are mean \pm S.E.M. for n= 6 in each group. **P*<0.001 as compared to control; #*P*<0.001 as compared to GA group (Student-Newman-Keuls test).

Figure 6. Effect of trolox (in the absence and presence glutaric acid) on L-[³H]glutamate uptake by synaptosome from striatum of rats. Data are mean \pm S.E.M. for n= 6 in each group. **P*<0.05 compared with control (Student-Newman-Keuls test).

Figure 7. Effect of MK-801 (5 μ M) and CNQX (100 μ M) (in the absence and presence glutaric acid) on DCFH oxidation by synaptosome from striatum of rats. Data are mean \pm S.E.M. for n= 5 in each group. **P*<0.01 as compared to control; #*P*<0.01 as compared to GA group (Student-Newman-Keuls test).

Figure 1

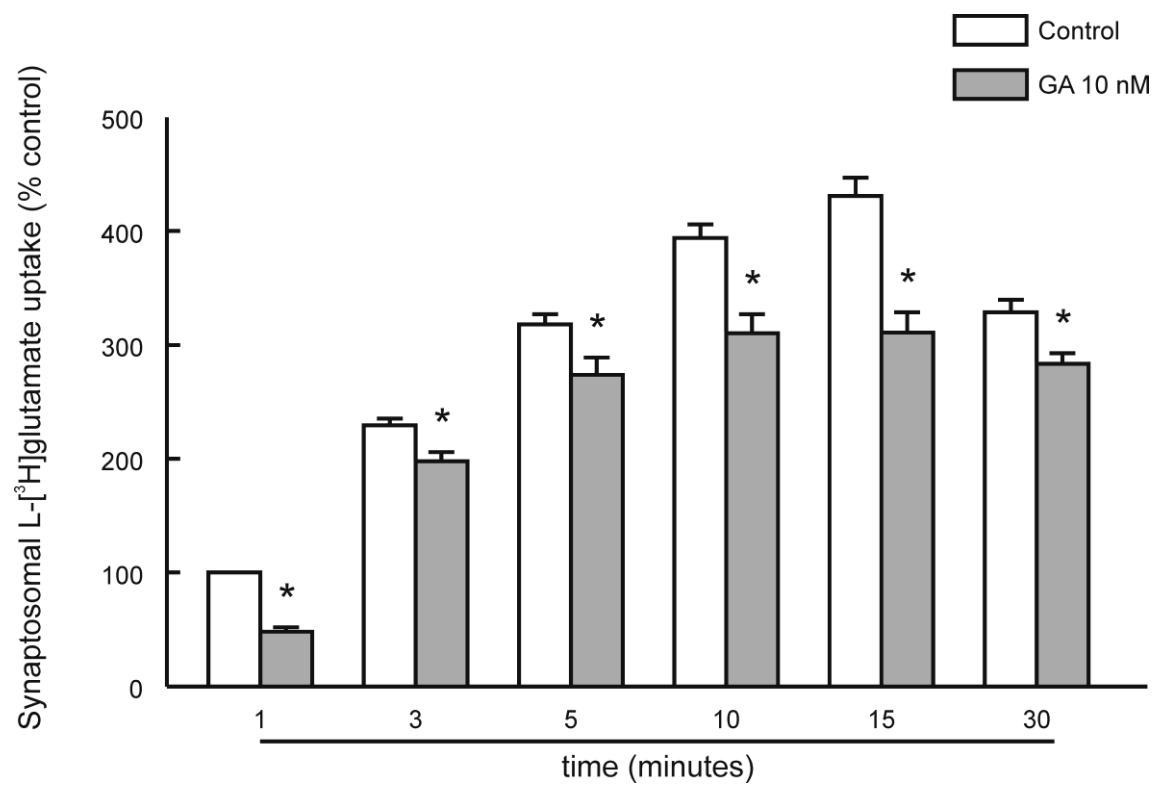


Figure 2

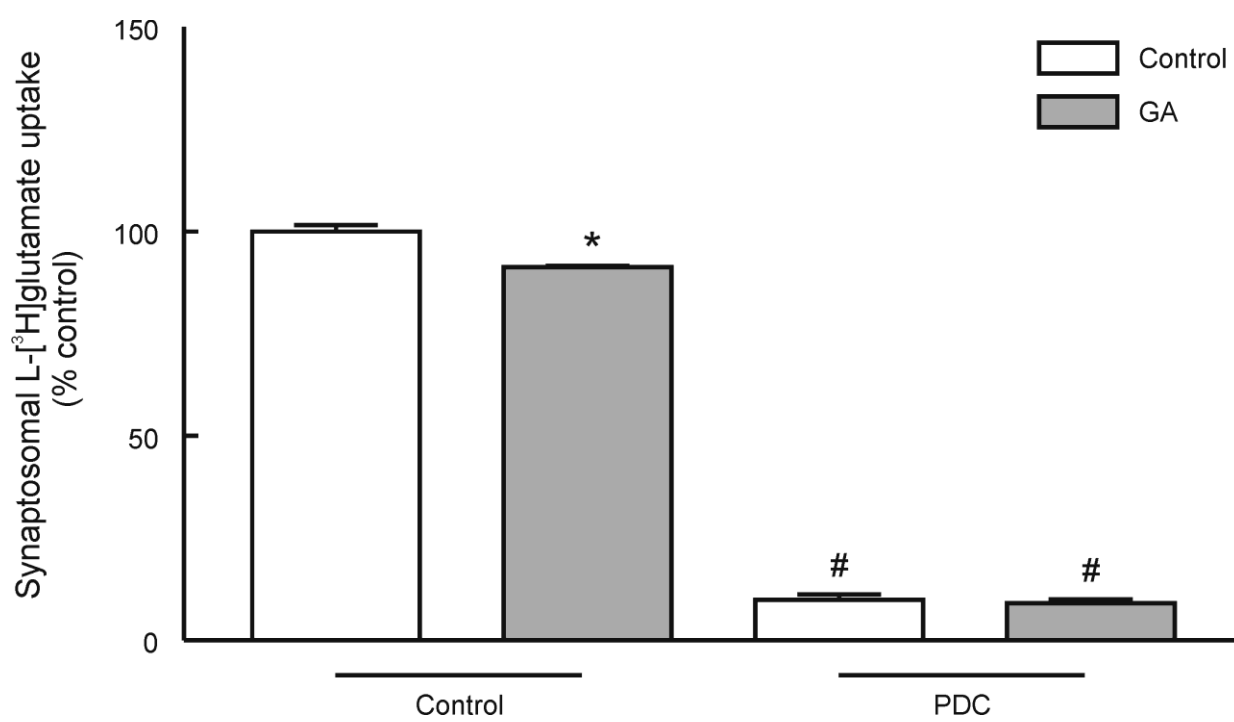


Figure 3

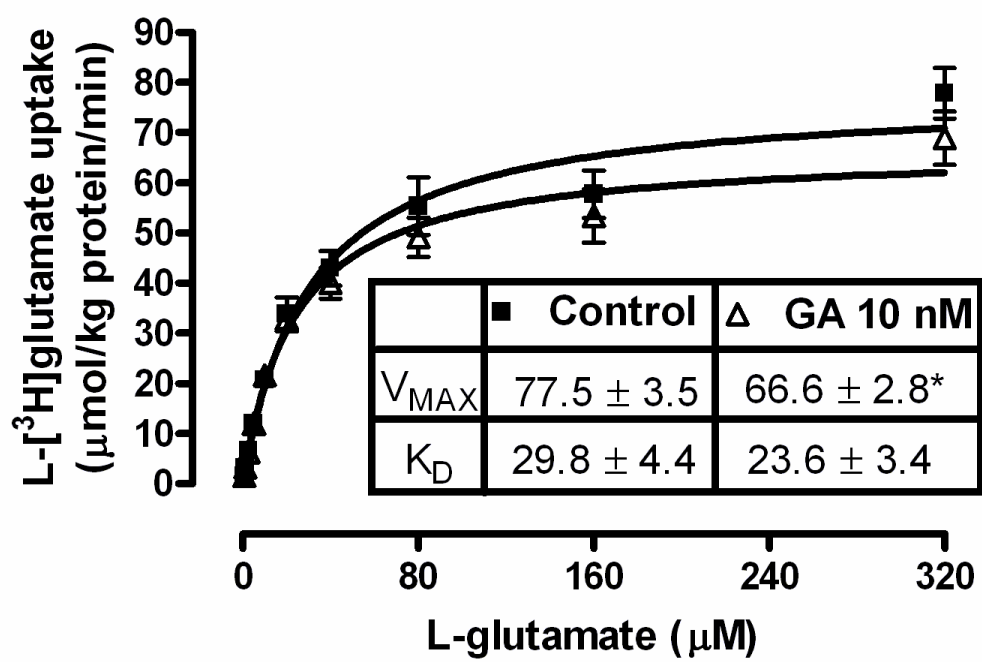


Figure 4

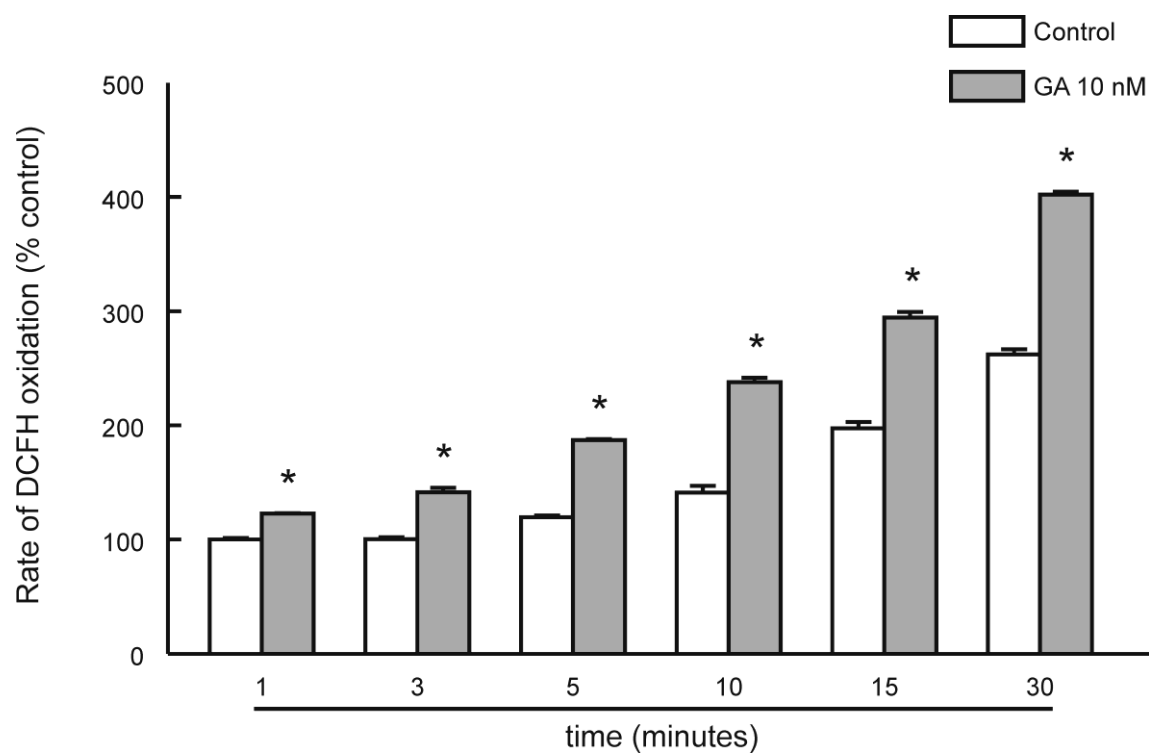


Figure 5

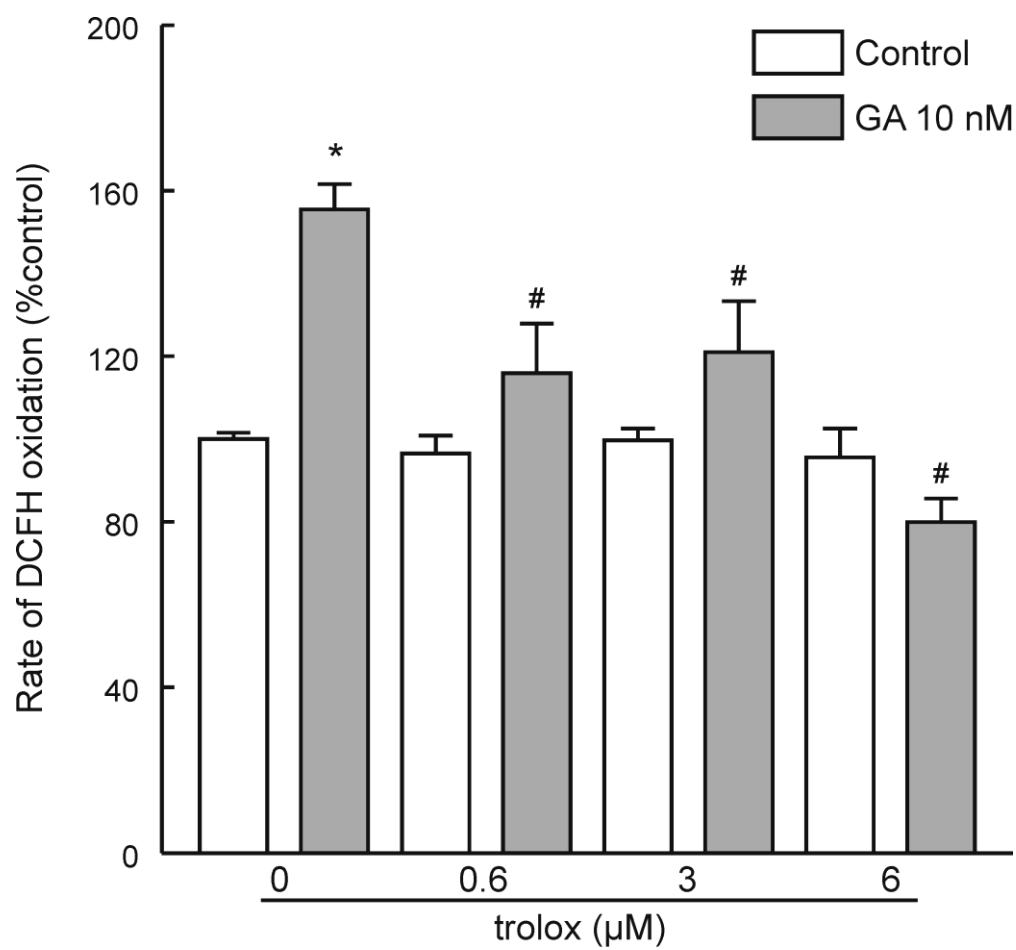


Figure 6

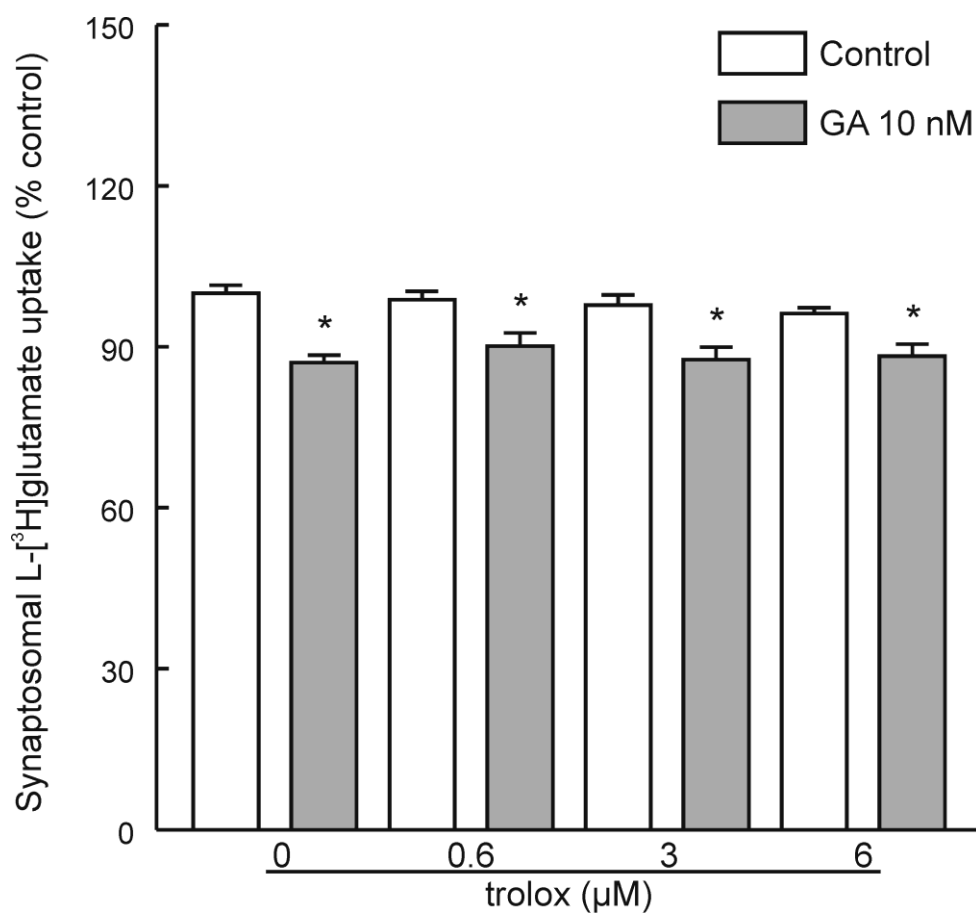
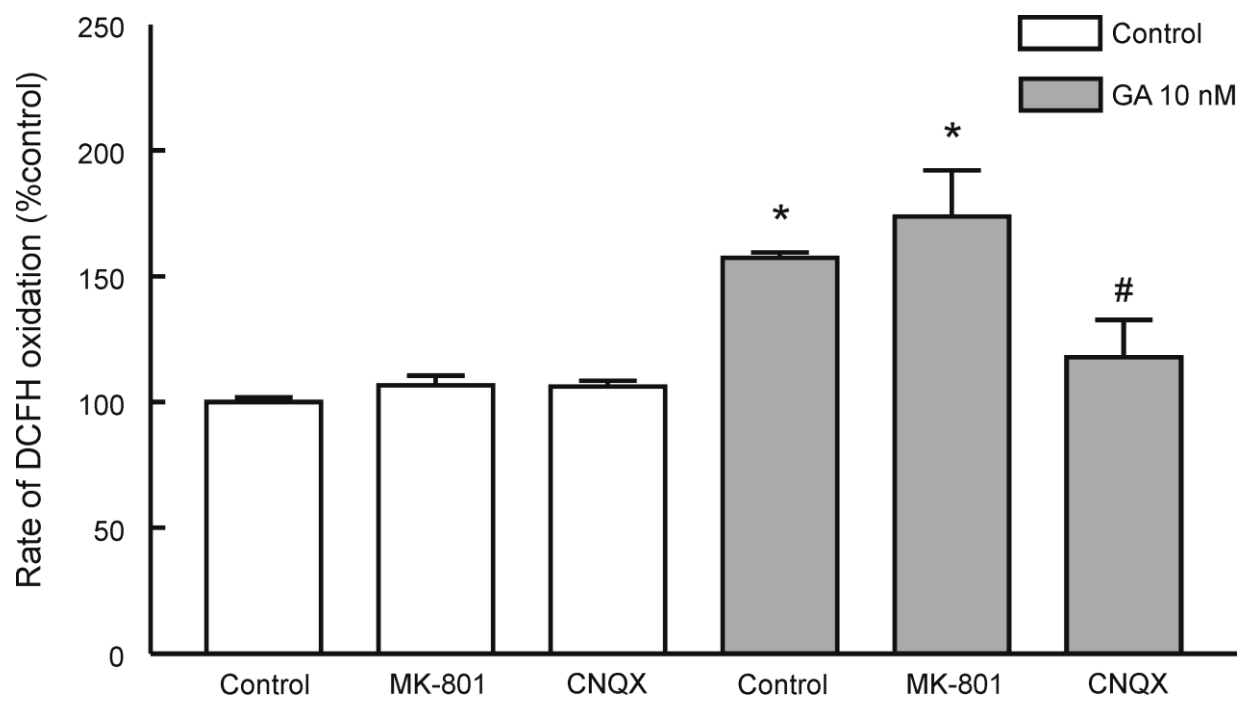


Figure 7



5. References

- Allen, J.W., Mutkus, L.A., Aschner, M., (2001). Methylmercury-mediated inhibition of ^3H -D-aspartate transport in cultured astrocytes is reversed by the antioxidant catalase. *Brain Res* 902, 92-100.
- Amara, S.G. and Fontana, A.C., (2002). Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int* 41, 313-318.
- Amir, N., el-Peleq, O., Shalev, R.S., Christensen, E., (1987). Glutaric aciduria type I: clinical heterogeneity and neuroradiologic features. *Neurology* 37, 1654-1657.
- Barnes, J.M., Dev, K.K., Henley, J.M., (1994). Cyclothiazide unmasks AMPA-evoked stimulation of [^3H]-L-glutamate release from rat hippocampal synaptosomes. *Br J Pharmacol* 113, 339-341.
- Bondy, S.C., Tseng, H., Orvig, C., (1998). Active oxygen species formation in synaptosomes exposed to an aluminum chelator. *Neurotoxicol Teratol* 20, 317-320.
- Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bridges, R.J., Kavanaugh, M.P., Chamberlin, A.R., (1999). A pharmacological review of competitive inhibitors and substrates of high-affinity, sodium-dependent glutamate transport in the central nervous system. *Curr Pharm Des* 5, 363-379.
- Conn, P.J. and Pin, J.P., (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37, 205-237.
- Dalcin, K.B., Rosa, R.B., Schmidt, A.L., Winter, J.S., Leipnitz, G., Dutra-Filho, C.S., Wannmacher, C.M., Porciúncula, L.O., Souza, D.O., Wajner, M., (2007). Age and

brain structural related effects of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids on glutamate binding to plasma membranes during rat brain development. *Cell Mol Neurobiol* 27, 805-818.

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

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

de Mello, C.F., Kölker, S., Ahlemeyer, B., de Souza, F.R., Figuera, M.R., Mayatepek, E., Kriegstein, J., Hoffmann, G.F., Wajner, M., (2001). Intrastriatal administration of 3-hydroxyglutaric acid induces convulsions and striatal lesions in rats. *Brain Res* 916: 70-75.

de Oliveira Marques, F., Hagen, M.E., Pederzoli, C.D., Sgaravatti, A.M., Durigon, K., Testa, C.G., Wannmacher, C.M.D., de Souza Wyse, A.T., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., (2003). Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. *Brain Res* 964, 153-158.

Dreiem A. and Seegal R.F., (2007). Methylmercury-induced changes in mitochondrial function in striatal synaptosomes are calcium-dependent and ROS-independent. *Neurotoxicology* 28, 720-726.

Dunkley, P.R., Heath, J.W., Harrison, S.M., Jarvie, P.E., Glenfield, J.P., Rostas, J.A., (1988). A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res* 441, 59-71.

Ferreira, G.C., Viegas, C.M., Schuck, P.F., Tonin, A., Ribeiro, C.A.J., Coelho, D.M., Dalla-Costa, T., Latini, A., Wyse, A.T.S., Wannmacher, C.M.D., Vargas, C.R.,

Wajner, M., (2005). Glutaric acid administration impairs energy metabolism in midbrain and skeletal muscle of young rats. *Neurochem Res* 30, 1123-1131.

Figuera, M.R., Royes, L.F., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Fiorenza, N.G., Frussa-Filho, R., Petry, J.C., Coelho, R.C., Mello, C.F., (2006). GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylentetrazole. *Neurobiol Dis* 22, 611-623.

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

Forstner, R., Hoffmann, G.F., Gassner, I., Heideman, P., De Klerk, J.B., Lawrenz-Wolf, B., Doring, E., Weiss-Wichert, P., Tröger, J., Colombo, J.P., Plöchl, E., (1999). Glutaric aciduria type I: ultrasonographic demonstration of early signs. *Pediatr Radiol* 29, 138-143.

Freudenberg, F., Lukacs, Z., Ullrich, K., (2004). 3-Hydroxyglutaric acid fails to affect the viability of primary neuronal rat cells. *Neurobiol Dis* 16, 581-584.

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

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

- Goodman S.I., Kratz L.E., DiGiulio K.A., Biery B.J., Goodman K.E., Isaya G., Frerman F.E., (1995). Cloning of glutaryl-CoA dehydrogenase cDNA, and expression of wild type and mutant enzymes in *Escherichia coli*. *Hum Mol Genet* 4, 1493-1498.
- Goodman, S.I. and Frerman, F.E., (2001). Organic acidemias due to defects in lysine oxidation: 2-ketoadipic acidemia and glutaric acidemia. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* McGraw-Hill, New York, 1451–1460.
- Goodman, S.I., (2004). Development of pathogenic concepts in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: The challenge. *J Inherit Metab Dis* 27, 801-803.
- Haberny, K.A., Paule, M.G., Scallet, A.C., Sistare, F.D., Lester, D.S., Hanig, J.P., Slikker, W. Jr., (2002). Ontogeny of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor system and susceptibility to neurotoxicity. *Toxicol Sci* 68, 9-17.
- Hollmann, M. and Heinemann, S., (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17, 31-108.
- Hoffmann, G.F. and Zschocke, J., (1999). Glutaric aciduria type I: from clinical, biochemical and molecular diversity to successful therapy. *J Inherit Metab Dis* 22, 381-391.
- Insel, T.R., Miller, L.P., Gelhard, R.E., (1990). The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain--I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience* 35, 31-43.
- Jensen, F.E., (2002). The role of glutamate receptor maturation in perinatal seizures and brain injury. *Int J Dev Neurosci* 20, 339- 347.

- Koeller, D.M., Woontner, M., Crnic, L.S., Kleinschmidt-DeMasters, B., Stephens, J., Hunt, E.L., Goodman, S.I., (2002). Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet* 11, 347-357.
- Kölker, S., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Hoffmann, G.F., (1999). 3-Hydroxyglutaric and glutaric acids are neurotoxic through NMDA receptors in vitro. *J Inherit Metab Dis* 22, 259-262.
- Kölker, S., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Hoffmann, G.F., (2000a). Cerebral organic acid disorders induce neuronal damage via excitotoxic organic acids in vitro. *Amino Acids* 18, 31-40.
- Kölker, S., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Hoffmann, G.F., (2000b). Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids in vitro: a new pathophysiologic approach to glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 47, 495-503.
- Kölker, S., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Hoffmann, G.F., (2001). Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr Res* 50, 76-82.
- Kölker, S., Kohr, G., Ahlemeyer, B., Okun, J.G., Pawlak, V., Horster, F., Mayatepek, E., Krieglstein, J., Hoffmann, G.F., (2002a). Ca^{2+} and Na^{+} dependence of 3-hydroxyglutarate-induced excitotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr Res* 52, 199-206.
- Kölker, S., Okun, J.G., Ahlemeyer, B., Wyse, A.T., Horster, F., Wajner, M., Kohlmüller, D., Mayatepek, E., Krieglstein, J., Hoffmann, G.F., (2002b). Chronic treatment with glutaric acid induces partial tolerance to excitotoxicity in neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *J Neurosci Res* 68, 424-431.

- Kölker, S., Hoffmann, G.F., Schor, D.S., Feyh, P., Wagner, L., Jeffrey, I., Pourfarzam, M., Okun, J.G., Zschocke, J., Baric, I., Bain, M.D., Jakobs, C., Chalmers, R.A., (2003). Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: region-specific analysis of organic acids and acylcarnitines in post mortem brain predicts vulnerability of the putamen. *Neuropediatrics* 34, 253-260.
- Kölker, S., Koeller, D.M., Okun, J.G., Hoffmann, G.F., (2004a). Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Ann Neurol* 55, 7-12.
- Kölker, S., Koeller, D.M., Sauer, S., Hörster, F., Schwab, M.A., Hoffmann, G.F., Ullrich, K., Okun, J.G., (2004b). Excitotoxicity and bioenergetics in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Inherit Metab Dis.* 27, 805-812.
- Kölker, S., Sauer S.W., Hoffmann G.F., Müller I., Morath M.A., Okun J.G., (2008). Pathogenesis of CNS involvement in disorders of amino and organic acid metabolism. *J. Inherit Metab Dis* 31, 194–204.
- Külkens, S., Harting, I., Sauer, S., Zschocke, J., Hoffmann, G.F., Gruber, S., Bodamer, O.A., Kölker, S., (2005). Late-onset neurologic disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neurology* 64, 2142-2144.
- Latini, A., Rosa, R.B., Scussiato, K., Llesuy, S., Bello-Klein, A., Wajner, M., (2002). 3-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. *Brain Res* 956, 367-373.
- Latini, A., Rodriguez, M., Rosa, R.B., Scussiato, K., Leipnitz, G., de Assis, D.R., Ferreira, G.C., Funchal, C., Jacques-Silva, M.C., Buzin, L., Giugliani, R., Cassina, A., Radi, R., Wajner, M., (2005a). 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. *Neuroscience* 135, 111-120.

- Latini, A., Scussiato, K., Leipnitz, G., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., (2005b). Promotion of oxidative stress by 3-hydroxyglutaric acid in rat striatum. *J Inherit Metab Dis* 28, 57-67.
- Liesert, M., Zschocke, J., Hoffmann, G.F., Muhlhauser, N., Buckel, W., (1999). Biochemistry of glutaric aciduria type I: activities of in vitro expressed wild-type and mutant cDNA encoding human glutaryl-CoA dehydrogenase. *J Inherit Metab Dis* 22, 256-258.
- Lima, T.T., Begnini, J., de Bastiani, J., Fialho, D.B., Jurach, A., Ribeiro, M.C., Wajner, M., de Mello, C.F., (1998). Pharmacological evidence for GABAergic and glutamatergic involvement in the convulsant and behavioral effects of glutaric acid. *Brain Res* 802, 55-60.
- Lipton, S.A. and Rosenberg, P.A., (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med* 330, 613–622.
- Lund, T.M., Christensen, E., Kristensen, A.S., Schousboe, A., Lund, A.M., (2004). On the neurotoxicity of glutaric, 3-hydroxyglutaric, and trans-glutaconic acids in glutaric acidemia type 1. *J Neurosci Res* 77, 143-147.
- Maragakis, N.J. and Rothstein, J.D., (2001). Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol* 58, 365–370.
- Magni, D.V., Oliveira, M.S., Furian, A.F., Fiorenza, N.G., Fighera, M.R., Ferreira, J., Mello, C.F., Royes, L.F., (2007). Creatine decreases convulsions and neurochemical alterations induced by glutaric acid in rats. *Brain Res* 1185, 336-345.

- McDonald, J.W. and Johnston, M.V., (1990). Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Rev* 15: 41-70.
- Meldrum BS., (2002). Implications for neuroprotective treatments. *Prog Brain Res* 135, 487–495.
- Migues, P.V., Leal, R.B., Mantovani, M., Nicolau, M., Gabilan, N.H., (1999). Synaptosomal glutamate release induced by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Neuroreport* 10, 67-70.
- Morton, D.H., Bennett, M.J., Seargeant, L.E., Nichter, C.A., Kelley, R.I., (1991). Glutaric aciduria type I: a common cause of episodic encephalopathy and spastic paralysis in the Amish of Lancaster County, Pennsylvania. *Am J Med Genet* 41, 89-95.
- Nagy, A.K., Shuster, T.A., Delgado-Escueta, A.V., (1986). Ecto-ATPase of mammalian synaptosomes: identification and enzymic characterization. *J Neurochem* 47, 976-986.
- Nakanishi, S., (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258, 597-603.
- Nanitsos, E.K., Acosta, G.B., Saihara, Y., Stanton, D., Liao, L.P., Shin, J.W., Rae, C., Balcar, V.J., (2004). Effects of glutamate transport substrates and glutamate receptor ligands on the activity of Na⁺/K⁺-ATPase in brain tissue in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31, 762-769.
- Olney, J.W., (1980). Dietary MSG and behavior. *Toxicol Appl Pharmacol* 30;53, 177-178.

Otis, T.S., (2001). Vesicular glutamate transporters in cógnito. *Neuron* 29, 11-14.

Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K., (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol* 54, 581–618.

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

Porciúncula, L.O., Dal-Pizzol, A., Jr., Coitinho, A.S., Emanuelli, T., Souza, D.O., Wajner, M., (2000). Inhibition of synaptosomal [³H]glutamate uptake and [³H]glutamate binding to plasma membranes from brain of young rats by glutaric acid in vitro. *J Neurol Sci* 173, 93-96.

Porciúncula, L.O., Emanuelli, T., Tavares, R.G., Schwarzbald, C., Frizzo, M.E., Souza, D.O., Wajner, M., (2004). Glutaric acid stimulates glutamate binding and astrocytic uptake and inhibits vesicular glutamate uptake in forebrain from young rats. *Neurochem Int* 45, 1075-1086.

Rosa, R.B., Schwarzbald, C., Dalcin, K.B., Ghisleni, G.C., Ribeiro, C.A., Moretto, M.B., Frizzo, M.E., Hoffmann, G.F., Souza, D.O., Wajner, M., (2004). Evidence that 3-hydroxyglutaric acid interacts with NMDA receptors in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of young rats. *Neurochem Int* 45, 1087-1094.

Rosa R.B., Dalcin K.B., Schmidt A.L., Gerhardt D., Ribeiro C.A., Ferreira G.C., Schuck P.F., Wyse A.T., Porciúncula L.O., Wofchuk S., Salbego C.G., Souza D.O., Wajner M., (2007). Evidence that glutaric acid reduces glutamate uptake by cerebral cortex of infant rats. *Life Sci* 81, 1668-1676.

- Robinson, M.B., Sinor, J.D., Dowd, L.A., Kerwin, J.F., (1993). Subtypes of sodium-dependent high-affinity L-[³H]glutamate transport activity – pharmacologic specificity and regulation by sodium and potassium. *J Neurochem* 60, 167-179.
- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., Welty, D.F., (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675-686.
- Sauer, S.W., Okun, J.G., Schwab, M.A., Crnic, L.R., Hoffmann, G.F., Goodman, S.I., Koeller, D.M., Kölker, S., (2005). Bioenergetics in glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a role for glutaryl-coenzyme A. *J Biol Chem* 280, 21830-21836.
- Sauer, S.W., Okun, J.G., Fricker, G., Mahringer, A., Müller, I., Crnic, L.R., Mühlhausen, C., Hoffmann, G.F., Hörster, F., Goodman, S.I., Harding, C.O., Koeller, D.M., Kölker, S., (2006). Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Neurochem* 97, 899-910.
- Silva, C.G., Silva, A.R., Ruschel, C., Helegda, C., Wyse, A.T., Wannmacher, C.M., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., (2000). Inhibition of energy production in vitro by glutaric acid in cerebral cortex of young rats. *Metab Brain Dis* 15, 123-131.
- Strauss, K.A., Morton, H., (2003). Type I glutaric aciduria. Part 2. A model of acute striatal necrosis. *Am J Med Gen* 121, 53–70.
- Strauss, K.A., Puffenberger, E.G., Robinson, D.L., Morton, H., (2003). Type I glutaric aciduria. Part 1. Natural history of 77 patients. *Am J Med Gen* 121, 38–52.

- 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., Wada, K., (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276, 1699-1702.
- Tavares, R.G., Santos, C.E., Tasca, C.I., Wajner, M., Souza, D.O., Dutra-Filho, C.S., (2000). Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *J Neurol Sci* 181, 44-49.
- Trotti, D., Rossi, D., Gjesdal, O., Levy, L.M., Racagni, G., Danbolt, N.C., Volterra, A., (1996). Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J Biol Chem* 271, 5976-5979.
- Trotti, D., Danbolt, N.C., Volterra, A., (1998). Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci* 19, 328-334.
- Ullensvang, K., Lehre, K.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C., (1997). Differential development expression of the two rat brain glutamate transporter proteins GLAST and GLT. *Eur J Neurosci* 9, 1646-1655.
- Ullrich, K., Flott-Rahmel, B., Schluff, P., Musshoff, U., Das, A., Lucke, T., Steinfeld, R., Christensen, E., Jakobs, C., Ludolph, A., Neu, A., Roper, R., (1999). Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis* 22, 392-403.
- Volterra, A., Trotti, D., Tromba, C., Floridi, S., Racagni, G., (1994). Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci* 14, 2924-2932.

Yildiz, G., Demiryürek, A.T., Sahin-Erdemli, I., Kanzik, I., (1998). Comparison of antioxidant of aminoguanidine, methylguanidine and guanidine by luminal-enhanced chemiluminescence. *Br J Pharmacol* 124, 905-910.

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

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A acidemia glutárica é um erro inato do metabolismo caracterizado, bioquimicamente, pelo acúmulo principal de GA e 3-OH-GA nos líquidos biológicos e tecidos dos pacientes afetados (GOODMAN et al., 1977; FUNK et al., 2005; KÖLKER et al., 2006), sendo que o acúmulo desses ácidos orgânicos tem sido considerado o responsável pelas alterações patológicas apresentadas por estes pacientes (FLOTT-RAHMEL et al., 1997; LIMA et al., 1998; HOFFMANN & ZSCHOCKE, 1999; GOODMAN, 2004; WAJNER et al., 2004). Desde que os tratamentos atuais utilizados na terapêutica da GA-I não são completamente eficazes na prevenção das manifestações clínicas e principalmente da degeneração estriatal apresentada pelos pacientes glutaricoacidêmicos (STRAUSS & MORTON, 2003), se faz necessária a busca por compostos que possam auxiliar no tratamento dessa acidemia. Neste contexto, a administração de Cr, um composto ergogênico, tem apresentado efeitos protetores em uma ampla variedade de doenças neurodegenerativas (WENDT et al., 2002; ZHANG et al., 2003; ANDRES et al., 2005; BENDER et al., 2005; 2006; BÜRKLEN et al., 2006; HERSCH et al., 2006;) e também em acidemias orgânicas (KÖLKER et al., 2001b; DAS et al., 2003; ROYES et al., 2003; 2006; VASQUES et al., 2006). A partir disso, decidiu-se investigar o efeito a administração aguda de Cr sobre as convulsões e o dano oxidativo induzidos pela administração intra-estriatal de GA.

Primeiramente o presente estudo confirmou resultados anteriores que o GA elucida convulsões comportamentais e eletrográficas, e aumenta a geração de ER em ratos *in vivo* (FIGHERA et al., 2006). Além disso, foi demonstrado pela primeira vez, que uma única administração oral de Cr oferece proteção significativa ao aumento do conteúdo de proteína carbonil, a redução da atividade da Na^+, K^+ ATPase e as convulsões comportamentais e eletrográficas induzidas pelo GA *in vivo*. Este estudo também evidenciou que a Cr protege da redução da captação de L- ^3H]glutamato induzida pelo GA em sinaptossomas de estriado de ratos *in vitro*.

Nossos primeiros resultados evidenciaram que a injeção intraestriatal unilateral de GA (4 μmol /estriado) causa convulsões comportamentais, apresentando um baixo limiar para o primeiro episódio convulsivo e uma duração elevada das convulsões, sendo que estes achados comportamentais foram

confirmados através de registros eletroencefalográficos. Neste contexto, o aumento na frequência da onda delta, evidenciada no estriado e no córtex após a administração de intra-estriatal de GA, estão de acordo com achados de FUJIMOTO e colaboradores (2000), que demonstraram descargas sincrônicas periódicas, caracterizadas por intermitentes ondas delta positivas de 4-6 Hz e 100-200 μV na estrutura cortical de um paciente com GA-I durante um episódio de encefalopatia aguda. De acordo com dados na literatura, existe um grande número de evidências sugerindo que o acúmulo de GA pode estar envolvido com o aparecimento dos episódios convulsivos e com as alterações neurológicas observadas nos pacientes com GA-I (LIMA et al., 1998; KÖLKER et al., 1999; 2001a,b; 2002b; FIGHERA et al., 2006).

Uma disfunção no metabolismo e na homeostase do glutamato tem sido relacionada com a neuropatogênese de várias doenças cerebrais, incluindo a epilepsia (KELLY & STANLEY, 2001). Alguns estudos têm mostrado que a inibição dos transportadores de glutamato conduz a uma atividade neuronal recorrente, caracterizada por periódicas despolarizações celulares e surtos de potenciais de ação (DEMARQUE et al., 2004). Este efeito oscilatório altera o padrão dos surtos paroxismais recorrentes bilaterais seguido por oscilações beta-gama cortical (MILH et al., 2007). Neste contexto, resultados da literatura sugerem que a redução na captação de glutamato induzida pelo GA (PORCIÚNCULA et al., 2000; 2004) pode levar a um aumento na atividade excitatória, a qual pode facilitar o aparecimento das convulsões comportamentais e eletrográficas (FIGHERA et al., 2006). Além disso, desde que a disfunção mitocondrial e conseqüente depleção de ATP são eventos envolvidos nas convulsões e do estresse oxidativo (CASSARINO et al., 1999), é plausível propor que um distúrbio do metabolismo energético, elucidado por este ácido orgânico (FUNK et al., 2005; FERREIRA et al., 2005), conduz a uma hiperexcitabilidade neuronal, convulsões e estresse oxidativo.

Em relação a esses achados e com base na correlação positiva entre a duração das convulsões e a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzida pelo GA (FIGHERA et al., 2006), sugere-se também que uma inibição de alvos seletivos pelos radicais livres, como a Na^+, K^+ -ATPase, tem um importante papel na hiperexcitabilidade neuronal e no concomitante dano oxidativo elucidado pelo GA. Por outro lado, é crítico enfatizar que, neste modelo de acidemia orgânica, uma inibição metabólica primária induzida pela injeção intraestriatal de GA pode alterar a

disponibilidade de ATP para vários processos regulatórios, alterando a regulação normal da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase. Neste contexto, estudos anteriores têm proposto que o óxido nítrico, o monóxido de carbono e receptores de glutamato NMDA modulam a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase através da ativação de proteínas quinases G e C regulatórias, nos quais os radicais livres desempenham uma função modulatória (NATHANSON et al., 1995; PETRUSHANKO et al., 2006). Entretanto, estudos complementares são necessários para esclarecer esta hipótese.

Além disso, este estudo mostrou que o tratamento prévio com Cr (300 mg/kg, vo) protegeu contra o aparecimento das convulsões comportamentais e eletrográficas, do aumento do conteúdo de proteína carbonil e da inibição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzidas pelo GA. Por outro lado, este trabalho também revelou que a Cr (50 e 150 mg/kg, vo), em doses capazes de prevenir o aumento do conteúdo de proteína carbonil induzido pelo GA, não impediu as convulsões e a inibição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, sugerindo que o dano oxidativo parece ocorrer separadamente dos episódios convulsivos (FIGHERA et al., 2006) e que o efeito da Cr em reduzir o conteúdo de proteína carbonil não está relacionada a sua ação anticonvulsivante. Entretanto, devemos considerar que alvos seletivos, como a Na⁺,K⁺-ATPase, que poderia não contribuir significativamente com a quantidade total de proteína carbonil, poderia ser responsável pelas convulsões induzidas pelo GA. Dessa forma, se esses alvos forem mais sensíveis ao dano oxidativo, eles poderiam requerer proteção antioxidante adicional, o que poderia ser oferecido pelo aumento das doses de Cr. Portanto, não é possível excluir a participação de mecanismos antioxidantes na ação anticonvulsivante da Cr neste modelo de acidemia.

Nessa linha de visão, alguns estudos mostram que o efeito neuroprotetor da Cr, em vários processos neurodegenerativos, envolve a ação no metabolismo energético intracelular, a prevenção do aumento dos níveis de Ca²⁺ e de ER intramitocondriais, os quais estão relacionados com a morte celular e a excitotoxicidade (O'GORMAN et al., 1997; LEIST & NICOTERA, 1998; DOLDER et al., 2003; KLIVENYI et al., 2003; ANDRES et al., 2005). Além disso, recentes estudos indicam que a Cr exerce citoproteção devido a sua atividade antioxidante direta (SESTILI et al., 2006). Portanto, é possível que a estabilização do metabolismo energético intracelular e as propriedades antioxidantes da Cr também

podem ser responsáveis pela proteção evidenciada neste modelo de acidemia glutárica.

Muitos estudos têm investigado o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica sobre a neurotoxicidade induzida pelo GA e 3-OH-GA (WAJNER et al., 2004). Neste contexto, evidenciamos que o GA (10 nM) inibiu a captação de L-[³H]glutamato em sinaptossomas estriatais de ratos, concordando com os trabalhos de PORCIÚNCULA e colaboradores (2000; 2004), que mostraram que o GA reduz a captação de L-[³H]glutamato em sinaptossomas de cérebro de ratos e em culturas de astrócitos. Desde que existem evidências de que substâncias que aumentam função GABAérgica e/ou inibem a transmissão glutamatérgica podem diminuir os episódios convulsivos e o estresse oxidativo (KARPIAK et al., 1981; AMATO et al., 1999; FIGHERA et al., 2003; ROYES et al., 2003, 2006), podemos especular que a redução da captação de L-[³H]glutamato induzida por este ácido orgânico pode facilitar a ativação dos receptores glutamatérgicos e, conseqüentemente, as convulsões. Tem sido demonstrado que inibidores dos transportadores de glutamato podem facilitar o aparecimento de episódios convulsivos durante a falência energética (SEPKUTY et al., 2002; DEMARQUE et al., 2004). Desde que o GA induz prejuízo energético celular e estresse oxidativo (FERREIRA et al., 2005), a Cr pode ter agido como um antioxidante, por manter a bioenergética mitocondrial e proteger os neurônios do dano excitotóxico causados pelo GA por reduzir a concentração deste aminoácido excitatório na fenda sináptica.

Entretanto, o exato mecanismo pelo qual o GA reduz a captação de L-[³H]glutamato ainda não está bem esclarecido. Foi sugerido que a inibição da captação de L-[³H]glutamato pode ser devido a uma interação direta do GA com os transportadores de glutamato (PORCIÚNCULA et al., 2004) ou por mecanismos indiretos, incluindo a formação de ER e redução da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase (VOLTERRA et al., 1994; NANITSOS et al., 2004). Assim, a redução da captação de glutamato pelo GA podem estar relacionada com a sua capacidade de induzir estresse oxidativo e reduzir a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, desde que a Cr foi capaz de prevenir a formação de ER e a redução da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzidas pelo GA.

Em resumo, esta primeira parte do presente estudo relata que administração estriatal de GA induz comportamento convulsivo, aumento do conteúdo de proteína carbonil e diminui a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, além de demonstrar pela primeira

vez, que esses danos são prevenidos pela administração oral aguda de Cr. Além disso, a Cr também protegeu da redução da captação de L-[³H]glutamato sinaptossomal induzida pelo GA *in vitro*. Apesar do mecanismo preciso da degeneração estriatal e do comportamento convulsivo dos pacientes com GA-I não ser conhecido, é plausível propor que compostos como a Cr, que diminuem a toxicidade induzida pelo GA, avaliada por parâmetros comportamentais e neuroquímicos, podem ser úteis como terapia adjuvante no acúmulo de GA. No entanto, estudos clínicos devem ser realizados a fim de avaliar a sua eficácia clínica em pacientes com GA-I.

Desde que os ácidos orgânicos acumulados nesta acidemia são considerados os responsáveis pelas alterações patológicas apresentadas pelos pacientes glutaricoacidêmicos, uma melhor compreensão das ações neurotóxicas desses ácidos orgânicos possibilitará o desenvolvimento de terapias mais efetivas para as crianças afetadas por esta acidemia orgânica (STRAUSS & MORTON, 2003).

Portanto, esta segunda parte da presente investigação foi realizada para avaliar o efeito de uma baixa concentração de GA (10 nM), que possivelmente pode estar presente no início da GA-I, na captação de L-[³H]glutamato e na formação de ER em sinaptossomas de estriado de ratos. Além disso, avaliamos pela primeira vez quais os parâmetros cinéticos da captação de L-[³H]glutamato que poderiam ser alterados pela presença do GA. Também verificamos a participação dos transportadores de glutamato na captação deste neurotransmissor na presença do GA. E por fim, investigamos o envolvimento dos receptores de glutamato NMDA e não-NMDA na formação de ER induzidas por esse ácido orgânico.

Mostramos inicialmente uma curva de tempo onde o GA diminuiu a captação de L-[³H]glutamato estriatal em sinaptossomas em todos os tempos testados. Sendo que este efeito não foi devido à morte celular, sugere-se que os transportadores de glutamato específicos localizados no estriado poderiam ser responsáveis por esse efeito. Além disso, considerando que os transportadores de glutamato gliais GLAST e GLT1 e o transportador de glutamato neuronal EAAC1 estão presentes em preparações sinaptossomais (TANAKA et al., 1997; DANBOLT, 2001), é plausível propor que um ou mais desses transportadores poderão servir como alvo para o efeito inibitório do GA (ROSA et al., 2007). Nesse contexto, estudos anteriores têm demonstrado que a captação L-[³H]glutamato em preparações sinaptossomais pode ser mediada por transportadores GLT1 (ROBINSON et al., 1993; Pontes et al.,

1999). Além disso, foi demonstrado que sinaptossomas preparados a partir de camundongos mutantes deficientes de GLT1 apresentam atividade de captação muito baixa (TANAKA et al., 1997; DANBOLT, 2001).

Um importante resultado da presente investigação foi que uma baixa concentração de GA (10 nM) reduziu significativamente a eficácia (V_{Max}), mas não a afinidade (K_D) na captação de L-[3H]glutamato em sinaptossomas de estriado. Estes resultados sugerem que a redução da captação de L-[3H]glutamato induzida por esta baixa concentração de GA é devida a uma inibição não competitiva. Nossos resultados estão de acordo com resultados anteriores que demonstram que uma alta concentração de GA (1 mM) pode reduzir a captação de L-[3H]glutamato em sinaptossomas de cérebro (PORCIÚNCULA et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que o GA 1 mM, mas não a concentração de 1 ou 10 nM, reduz a ligação de L-[3H]glutamato dependente de Na^+ em membrana plasmática de cérebro, o que indica que GA (em concentrações maiores) interage diretamente com transportadores de glutamato (PORCIÚNCULA et al., 2000). De acordo com a idéia de que baixas concentrações de GA não interagem diretamente com os transportadores de glutamato, nossos dados cinéticos revelaram que o GA (10 nM) não alterou o valor de K_D na captação de L-[3H]glutamato em sinaptossomas de estriado. Além disso, a redução da captação de L-[3H]glutamato produzida por baixas concentrações de GA é medeada por uma diminuição na V_{Max} , a qual é consistente com um mecanismo de inibição não competitivo para esses transportadores. Assim, o GA poderia reduzir diretamente a captação de L-[3H]glutamato através de uma interação com um sítio alostérico nos transportadores de glutamato.

Para comprovar a participação dos transportadores de glutamato na redução da captação desse neurotransmissor induzida pelo GA, realizamos a adição simultânea do GA com o inibidor dos transportadores de glutamato, o PDC (50 μM). Nossos resultados mostraram que o PDC não alterou o efeito inibitório sobre a captação de L-[3H]glutamato induzido pelo GA em sinaptossomas estriatais, quando comparado com o efeito elucidado pelo PDC sozinho. Estes achados experimentais sugerem que o GA pode estar ligado aos transportadores de glutamato, e que este distúrbio na neurotransmissão glutamatérgica pode explicar, pelo menos em parte, o dano cerebral observado na GA-I.

Outro ponto a ser considerado é que a atividade dos transportadores de glutamato pode ser inibida por oxidação (VOLTERRA et al., 1994; TROTTI et al., 1996, 1998). Assim, avaliamos se a redução na captação de L-[³H]glutamato induzida pelo GA poderia ser devida à formação de ER em sinaptossomas de estriado de ratos. Embora, a adição de trolox tenha protegido contra o aumento da oxidação da DCFH induzida pelo GA, o mesmo não protegeu contra a redução da captação de L-[³H]glutamato induzida pelo GA em sinaptossomas de estriado, sugerindo que a formação de ER pode ser um evento tardio na neurotoxicidade induzida pelo GA. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de DREIEM & SEEGEL (2007) que demonstram que embora o trolox possa reduzir o aumento do DCFH causado pelo metilmercúrio (MeHg) aos níveis basais, ele não exerce qualquer proteção na inibição da captação de aspartato induzida por este composto (ALLEN et al., 2001). Nossos resultados, em conjunto com estas observações, sugerem que a excitotoxicidade induzida pela baixa concentração de GA pode estar presente no início do dano estriatal, e que a geração de radicais livres parece ocorrer secundariamente a superestimulação glutamatérgica, um fato que pode estar relacionado com a degeneração estriatal observada em pacientes com GA-I. Além disso, um estudo anterior mostrou que o GA na concentração de 1 mM inibe a captação de L-[³H]glutamato sinaptossomal (PORCIÚNCULA et al., 2000), podendo-se presumir que concentrações intracelular muito menores de GA podem ser suficientes para inibir o transporte de glutamato e aumentar o estresse oxidativo. Nesse contexto, tem sido relatado que uma pequena redução na captação de neurotransmissores excitatórios pode resultar em uma resposta excitotóxica (ALLEN et al., 2001).

Também não podemos excluir a possibilidade de que o GA pode estimular diretamente os receptores de glutamato, desde que encontramos que o aumento na oxidação da DCFH provocada pelo GA foi significativamente atenuado pelo antagonista de receptor de glutamato não-NMDA CNQX, mas não pelo MK-801, sugerindo que estes receptores contribuem, pelo menos em parte, para o estresse oxidativo induzido pelo GA. Nossos resultados podem explicar um estudo prévio *in vivo* que demonstra que as alterações comportamentais e as convulsões provocadas por administração intraestriatal de GA, na mesma dose em que causa estresse oxidativo (FIGHERA et al., 2006), foram prevenidas pelo antagonista glutamatérgico não-NMDA DNQX, mas não pelo antagonista NMDA MK-801 em ratos adultos (LIMA

et al., 1998). Reforçando este ponto, um recente estudo também demonstrou que o GA liga em receptores glutamatérgicos não-NMDA no cérebro de ratos (PORCIÚNCULA et al. 2004; DALCIN et al., 2007).

Além disso, tem sido demonstrado que os transportadores de glutamato são os principais responsáveis pela manutenção de baixas concentrações de glutamato extracelular (ROTHSTEIN et al., 1996; DANBOLT, 2001; AMARA & FONTANA, 2002). O sistema de transporte presente em sinaptossomas tem sido considerado como um importante passo para a modulação do sistema glutamatérgico, controlando o ciclo glutamato-glutamina (OTIS, 2001). Assim, inibindo a captação de L-[³H]glutamato, o GA pode alterar o volume de glutamato sináptico levando a um aumento do pool citosólico deste neurotransmissor excitatório, o qual, por sua vez, pode resultar em uma excessiva estimulação dos receptores de glutamato e consequente geração de radicais livres (VOLTERRA et al., 1994; NANITSOS et al., 2004). A partir desses resultados, é provável que esta seqüência de eventos, aqui apresentada, pode ser a responsável pelas alterações neuroquímicas e comportamentais induzidas pelo GA.

Neste contexto, este mecanismo pode explicar o envolvimento do sistema glutamatérgico na toxicidade neuronal, convulsões e dano oxidativo induzido pelo GA em ratos (KÖLKER et al., 2001b; FIGHERA et al., 2006; ROSA et al., 2007). Além disso, esses resultados podem estar relacionados com algumas das alterações patológicas observadas em pacientes com GA-I, como a vacuolização pós-sináptica característica de morte neuronal excitotóxica (OLNEY, 1980) a qual tem sido descrita em exames *post-mortem* no cérebro de pacientes com GA-I (AMIR et al., 1987). De acordo, estudos anteriores demonstraram a presença de receptores de glutamato nos gânglios basais, e de lesões características nestas estruturas cerebrais em pacientes com GA-I (AMIR et al., 1987; GOODMAN et al., 1995).

Para determinar precisamente se a indução de radicais livres pelo GA ocorre indiretamente através de sua atividade inibitória no metabolismo celular, ou se é uma fonte direta de radicais livres devido à sua reatividade química, foi avaliado se o GA (10 nM) poderia aumentar a quimioluminescência em sistemas ausentes de células. Observamos que o GA não apresentou atividade oxidante *per se* (dados não mostrados), indicando que a reatividade química do GA não é fonte direta de radicais livres. Estes resultados reforçam a hipótese de que a geração de ER induzida por este ácido orgânico ocorre indiretamente (WAJNER et al., 2004) e que,

em baixa concentração, algum grau de estrutura celular é necessário para o GA induzir danos oxidativos.

Além disso, recentes trabalhos sugerem que outros mecanismos podem estar envolvidos na neurotoxicidade observada na GA-I, como a inibição da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase e dos mecanismos GABAérgicos (FIGHERA et al., 2006), a disfunção endotelial seguida pela perda da integridade da barreira hematoencefálica (STRAUSS & MORTON, 2003; ZINNANTI et al., 2006; MÜHLHAUSEN et al., 2006), a inibição dos complexos α -cetoglutarato desidrogenase e piruvato desidrogenase pela glutaril-CoA (SAUER et al., 2005) e a disfunção e a morte celular de precursores oligodentrogliais (GERSTNER et al., 2005). Também têm sido descrita uma competição entre GA e transportadores $\text{NaC}2$ e $\text{NaC}3$ pelo transporte de succinato e outros intermediários do ciclo do ácido cítrico dos astrócitos para os neurônios (YODOYA et al., 2006; STELLMER et al., 2007). Além disso, estudos revelaram que a degeneração característica da GA-I, possa ser devido a ação dos metabólitos da via das quinureninas, uma das rotas de catabolismo do triptofano (HEYES, 1987; VARADKAR & SURTEES, 2004). Dessa forma, não é possível excluir que os efeitos neurotóxicos do GA na captação de L-[^3H]glutamato e na produção de radicais livres também podem estar relacionados, pelo menos em parte, por um desses mecanismos (FIGHERA et al., 2006; SAUER et al., 2006). No entanto, estudos específicos são necessários para determinar o envolvimento destes eventos no efeito excitotóxico descrito para o GA na captação de L-[^3H]glutamato e no aumento do estresse oxidativo.

Embora não se possa estabelecer com certeza se os dados *in vitro* observados no presente trabalho estão relacionados com a neurotoxicidade observada na GA-I, deve-se ressaltar que os efeitos provocados pelo GA foram observados em concentrações semelhantes a aquelas encontradas no cérebro de pacientes glutaricoacidêmicos (GOODMAN et al., 1977; KÖLKER et al., 2003; KÜLKENS et al., 2005, SAUER et al., 2006). Além disso, o grau de alteração do sistema glutamatérgico detectado no presente estudo é aceito para causar excitotoxicidade em testes com excitotoxinas (OZAWA et al., 1998; ALLEN et al., 2001; DANBOLT, 2001; MELDRUM, 2002).

Em conclusão a esta segunda parte, é do nosso conhecimento que este é o primeiro relato de um estudo cinético da captação de L-[^3H]glutamato na presença de GA em sinaptossomas de estriado de ratos. Além disso, o conjunto de resultados

sugere que a inibição da captação de L-[³H]glutamato em sinaptossomas por este metabólito pode resultar em elevadas concentrações desse neurotransmissor excitatório na fenda sináptica e secundária estimulação dos receptores de glutamato pelo GA (uma molécula estruturalmente semelhante ao glutamato). Este aumento na neurotransmissão glutamatérgica leva a formação de ER que potencialmente causam excitotoxicidade nas células neurais, fato que parece estar relacionado com os danos cerebrais característicos da GA-I. Os presentes resultados podem explicar, pelo menos em parte, o dano estriatal inicial ao nascimento, como evidenciado pela destruição bilateral aguda do caudado e do putâmen observados em crianças com GA-I (GOODMAN, 2004).

Por fim, podemos concluir que apesar dos mecanismos responsáveis pela degeneração estriatal apresentada pelos pacientes glutaricoacidêmicos ainda não estão bem esclarecidos e os atuais tratamentos não são completamente eficazes na prevenção dessa degeneração, os resultados deste trabalho mostram os efeitos protetores da administração oral de Cr nas ações deletérias ocasionadas pelo GA. Além disso, o presente estudo demonstrou pela primeira vez, que uma baixa concentração de GA causa ações excitotóxicas primárias, bem como, estresse oxidativo na estrutura cerebral predominantemente afetada nesta doença sugerindo um sinergismo entre estes eventos, o que confere uma maior vulnerabilidade do cérebro imaturo às neurotoxinas acumuladas na GA-I. Dessa maneira, acreditamos que este trabalho possa auxiliar na elucidação da gênese dos mecanismos neurotóxicos do GA que conduzem à neurodegeneração característica dos pacientes glutaricoacidêmicos, e também servir de base para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes que melhorem a qualidade de vida destes pacientes.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Tendo em vista os objetivos do presente trabalho, podemos concluir que:

Capítulo I

1. O tratamento prévio com Cr (300 mg/kg; v.o.) aumentou a latência para a primeira convulsão e reduziu a duração dos episódios convulsivos induzidos pela injeção intraestriatal de GA (4 μ mol/estriado) em ratos.
2. Os registros eletroencefalográficos após a injeção intraestriatal de GA (4 μ mol/estriado) evidenciaram episódios convulsivos típicos, e a administração prévia de Cr (300 mg/kg, v.o.) preveniu o aparecimento destes registros eletroencefalográficos convulsivos em ratos.
3. O tratamento prévio com Cr (50, 150 e 300 mg/kg; v.o.) preveniu o aumento no conteúdo de proteína carbonil induzida pela injeção intraestriatal de GA (4 μ mol/estriado) em homogeneizados de estriado de ratos.
4. A administração prévia de Cr (300 mg/kg; v.o.) preveniu a redução da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase induzida pela injeção intraestriatal de GA (4 μ mol/estriado) em homogeneizados de estriados de ratos.
5. A co-incubação de Cr (10 μ M) com o GA (10 nM) reverteu a redução da captação de L-[^3H]glutamato induzida pelo GA em sinaptossomas de estriado de ratos *in vitro*.

Capítulo II

6. O GA (10 nM) reduziu a captação de L-[^3H]glutamato Na^+ -dependente (ligação a transportadores) em sinaptossomas de estriado de ratos em todos os tempos testados (1, 3, 5, 10, 15 e 30 minutos).

7. A co-incubação de PDC (50 μM), um inibidor competitivo do transporte de glutamato, com o GA (10 nM) nos ensaios de captação de L-[^3H]glutamato Na^+ -dependente (ligação a transportadores) em sinaptossomas de estriado de ratos, sugere que o GA pode deslocar o glutamato de seus transportadores.
8. O GA (10 nM) produziu uma redução na eficácia (V_{MAX}), sem alterar a afinidade (K_{D}), na captação de L-[^3H]glutamato Na^+ -dependente (ligação a transportadores) em sinaptossomas de estriado de ratos, sugerindo uma inibição não competitiva da captação de L-[^3H]glutamato entre o GA e o glutamato pelos seus transportadores.
9. O GA (10 nM) aumentou a formação de ER em sinaptossomas de estriado de ratos em todos os tempos testados (1, 3, 5, 10, 15 e 30 minutos).
10. O trolox (0.6, 3 e 6 μM) preveniu o aumento da formação de ER induzidas pelo GA (10 nM) em sinaptossomas de estriado de ratos.
11. O trolox (0.6, 3 e 6 μM) não preveniu a redução da captação de L-[^3H]glutamato induzida pelo GA (10 nM) em sinaptossomas de estriado de ratos.
12. O antagonista de receptores de glutamato AMPA/cainato, CNQX (100 μM) reduziu a formação de ER induzidas pelo GA (10 nM), entretanto, o antagonista de receptores de glutamato NMDA, MK-801 (5 μM) não protegeu a formação de ER induzidas pelo GA (10 nM) em sinaptossomas de estriado de ratos.
13. O GA (10 nM) não apresentou propriedade oxidante *per se*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, J.W., MUTKUS, L.A., ASCHNER, M. Methylmercury-mediated inhibition of ^3H -D-aspartate transport in cultured astrocytes is reversed by the antioxidant catalase. *Brain Res* 902:92-100, 2001.
- AMARA, S.G. & FONTANA, A.C. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int* 41:313-318, 2002.
- AMATO, A., CONNOLLY, C.N., MOSS, S.J., SMART, T.G. Modulation of neuronal and recombinant GABAA receptors by redox reagents. *J Physiol* 517:35-50, 1999.
- AMIR, N., EL-PELEQ, O., SHALEV, R.S., CHRISTENSEN, E. Glutaric aciduria type I: clinical heterogeneity and neuroradiologic features. *Neurology* 37:1654-1657, 1987.
- ANDRES, R.H., DUCRAY, A.D., PEREZ-BOUZA, A., SCHLATTNER, U., HUBER, A.W., KREBS, S.H., SEILER, R.W., WALLIMANN, T., WIDMER, H.R. Creatine supplementation improves dopaminergic cell survival and protects against MPP^+ toxicity in an organotypic tissue culture system. *Cell Transplant* 14:537-550, 2005.
- ANDRES, R.H., DUCRAY, A.D., SCHLATTNER, U., WALLIMANN, T., WIDMER, H.R. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull* 76:329-43, 2008.
- ARMSTRONG, D.L. Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca^{2+} -activated phosphatase in mammalian brain. *Trends Neurosci* 12:117-22, 1989.
- BARIC, I., ZSCHOCKE, J. CHRISTENSEN, E., DURAN, M., GOODMAN, S.I., LEONARD, J.V., MULLER, E., MORTON, D.H., SUPERTI-FURGA, A., HOFFMANN, G.F. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I. *J Inherit Metab Dis* 21:326-340, 1998.
- BARIC, I., FURNIC, K., HOFFMANN, G.F. Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. *Croat Med J* 42:379-383, 2001.
- BARREIRO, A., REY, A., GONZÁLEZ, G. Aciduria Glutárica tipo I: Descripción del primer caso clínico nacional. *Revista Médica del Uruguay*, 20: 221-227, 2004.
- BARRIVIERA, M.L., LOURO, S.R., WAJNBERG, E., HASSON-VOLOCH, A. Denervation alters protein-lipid interactions in membrane fractions from electrocytes of *Electrophorus electricus* (L.). *Biophys Chem* 91:93-104, 2001

- BATTAGLIOLI, G., MARTIN, D.L., PLUMMER, J., MESSER, A. Synaptosomal glutamate uptake declines progressively in the spinal cord of a mutant mouse with motor neuron disease. *J Neurochem* 60:1567-1569, 1993.
- BECKMAN, J.S. The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. In: Lancaster J, ed. *Nitric oxide principles and actions*. San Diego: Academic Press, v. 7, 1996.
- BENDER, A., AUER, D.P., MERL, T., REILMANN, R., SAEMANN, P., YASSOURIDIS, A., BENDER, J., WEINDL, A., DOSE, M., GASSER, T., KLOPSTOCK, T. Creatine supplementation lowers brain glutamate levels in Huntington's disease. *J Neurol* 252:36-41, 2005.
- BENDER, A., KOCH, W., ELSTNER, M., SCHOMBACHER, Y., BENDER, J., MOESCHL, M., GEKELER, F., MÜLLER-MYHSOK, B., GASSER, T., TATSCH, K., KLOPSTOCK, T. Creatine supplementation in Parkinson disease: a placebo-controlled randomized pilot trial. *Neurology* 67:1262-1264, 2006.
- BENNETT, J.P., LOGAN, W.J., SNYDER, S.H. Amino acids as central nervous transmitters: the influence of ions, amino acid analogues, and ontogeny on transport systems for L-glutamic and L-aspartic acids and glycine into central nervous synaptosomes of the rat. *Journal Neurochemistry* 21:1533-1550, 1973.
- BERGER, U.V. & HEDIGER, M.A. Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridization. *Anat Embryol* 198:13-30, 1998.
- BESSMAN, S.P. & GEIGER, P.J. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science* 211, 448-452, 1981.
- BICKEL, H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme* 38:14-26, 1987.
- BIERY, B.J., STEIN, D.E., MORTON, D.H., GOODMAN, S.I. Gene structure and mutations of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase: impaired association of enzyme subunits that is due to an A421V substitution causes glutaric acidemia type I in the Amish. *Am J Hum Genet* 59:1006-1011, 1996.
- BJUGSTAD, K.B., GOODMAN, S.I., FREED, C.R. Age at symptom onset predicts severity of motor impairment and clinical outcome of glutaric acidemia type 1. *J Pediatr* 137:681-686, 2000.

- BJUGSTAD, K.B., ZAWADA, W.M., GOODMAN, S. FREE, C.R. IGF-1 and bFGF reduce glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid toxicity in striatal cultures. *J Inherit Metab Dis* 24:631-647, 2001.
- BOLDYREV, A.A., BULYGINA, E.R., KRAMARENKO, G.G., VANIN, A.F. Effect of nitroso compounds on Na/K-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1321:243-251, 1997.
- BOVERIS, A. & CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *J Biochem* 134:707-716, 1973.
- BREWER, G.J. & WALLIMANN, T.W. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 74:1968-1978, 2000.
- BRISMAR, J. & OZAND, P.T. CT and MR of the brain in glutaric academia type I: a review of 59 published cases and a report of 5 new patients. *Am J Neuroradiol* 16:675-683, 1995.
- BROUILLET, E., HYMAN, B.T., JENKINS, B.G., HENSHAW, D.R., SCHULZ, J.B., SODHI, P., ROSEN, B.R., BEAL, M.F. Systemic or local administration of azide produces striatal lesions by an energy impairment-induced excitotoxic mechanism. *Exp Neurol* 129:175-182, 1994.
- BRUNBECH, L. & SABERS, A. Effect of antiepileptic drugs on cognitive function in individuals with epilepsy: a comparative review of newer versus older agents. *Drugs* 62:593-604, 2002.
- BÜRKLEN, T.S., SCHLATTNER, U., HOMAYOUNI, R., GOUGH, K., RAK, M., SZEGHALMI, A., WALLIMANN, T. The Creatine Kinase/Creatine Connection to Alzheimer's Disease: CK-Inactivation, APP-CK Complexes and Focal Creatine Deposits. *J Biomed Biotechnol* 35936:1-11, 2006.
- BURLINA, A.P., ZARA, G., HOFFMANN, G.F., ZSCHOCKE, J., BURLINA, A.B. Management of movement disorders in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: anticholinergic drugs and botulinum toxin as additional therapeutic options. *J Inherit Metab Dis* 27:911-915, 2004.
- BURNS, L.H., PAKZABAN, P., DEACON, T.W., BROWNELL, A.L., TATTER, S.B., JENKINS, B.G., ISACSON, O. Selective putaminal excitotoxic lesions in non-human primates model the movement disorder of Huntington disease. *Neuroscience* 64:1007-1017, 1995.

- BUTTERFIELD, D.A. & KANSKI, J. Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech Ageing Dev* 122:945-962, 2001.
- CASSARINO, D. S. & BENNETT, J. P. JR. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 29:1-25, 1999.
- CASSARINO, D.S., PARKS, J.K., PARKER, W.D., Jr., BENNETT, J.P. Jr. The parkinsonian neurotoxin MPP⁺ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome c in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1453:49-62, 1999.
- CHALMERS, R.A., PURKISS, P., WATTS, R.W., LAWSON, A.M. Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. *J Inherit Metab Dis* 3:27-43, 1980.
- CHALMERS, R.A. & LAWSON, A.M. Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias. London, Chapman & Hall. 221-229, 1982.
- CHANCE, A., SIES, H., BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiology Review* 59:527-605, 1979.
- CHEVREUL. Sur la composition chimique du bouillon de viandes. *J Pharm Sci Access* 21: 231-242, 1835.
- CHOW, C.W., HAAN, E.A., GOODMAN, S.I., ANDERSON, R.M., EVANS, W.A., KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B.K., WISE, G., MCGILL, J.J., DANKS, D.M. Neuropathology in glutaric acidemia type I. *Acta Neuropathol* 76: 590-594, 1988.
- CHRISTENSEN, E., RIBES, A., MERINERO, B., ZSCHOCKE, J. Correlation of genotype and phenotype in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 27:861-868, 2004.
- COMAN, D., YAPLITO-LEE, J., BONEH, A. New indications and controversies in arginine therapy. *Clin Nutr* 27:489-496, 2008.
- CONN, J.P. & PIN, J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237, 1997.
- COYLE, J.T. & PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695, 1993.

- DAIKHIN, Y. & YUDKOFF, M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr* 130:1026-1031, 2000.
- DALCIN, K.B., ROSA, R.B., SCHMIDT, A.L., WINTER, J.S., LEIPNITZ, G., DUTRA-FILHO, C.S., WANNMACHER, C.M., PORCIÚNCULA, L.O., SOUZA, D.O., WAJNER, M. Age and brain structural related effects of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids on glutamate binding to plasma membranes during rat brain development. *Cell Mol Neurobiol* 27:805-818, 2007.
- DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105, 2001.
- DAS, A.M., LUCHE, T., ULLRICH, K. Glutaric aciduria I: creatine supplementation restores creatine phosphate levels in mixed cortex cells from rat incubated with 3-hydroxyglutarate. *Mol Genet Metab* 78:108-111, 2003.
- DEDEOGLU, A., KUBILUS, J.K., YANG, L., FERRANTE, K.L., HERSCH, S.M., BEAL, M.F., FERRANTE, R.J. Creatine therapy provides neuroprotection after onset of clinical symptoms in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurochem* 85:1359-1367, 2003.
- DEL MAESTRO, R. F. An approach and to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl* 492:153-167, 1980.
- DEMARQUE, M., VILLENEUVE, N., MANENT, J.B., BECQ, H., REPRESA, A., BENARI, Y., ANIKSZTEJN, L. Glutamate transporters prevent the generation of seizures in the developing rat neocortex. *J Neurosci* 24:3289-3294, 2004.
- DE MELLO, C.F., RUBIN, M.A., COELHO, J., WAJNER, M., SOUZA, D.O. Effects of methylmalonate and propionate on [³H]glutamate binding, adenylate cyclase activity and lipid synthesis in rat cerebral cortex. *Biochem Mol Biol Int* 42:1143-1150, 1997.
- DE MELLO, C.F., KÖLKER, S., AHLEMEYER, B., DE SOUZA, F.R., FIGHERA, M.R., MAYATEPEK, E., KRIEGLSTEIN, J., HOFFMANN, G.F., WAJNER, M. Intrastratial administration of 3-hydroxyglutaric acid induces convulsions and striatal lesions in rats. *Brain Res* 916:70-75, 2001.
- DE OLIVEIRA MARQUES, F., HAGEN, M.E., PEDERZOLLI, C.D., SGARAVATTI, A.M., DURIGON, K., TESTA, C.G., WANNMACHER, C.M.D., DE SOUZA WYSE, A.T., WAJNER, M., DUTRA-FILHO, C.S. Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. *Brain Res* 964:153-158, 2003.

- DESHPANDE, S.B., FUKUDA, A., NISHINO, H. 3-Nitropropionic acid increases the intracellular Ca²⁺ in cultured astrocytes by reverse operation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Exp Neurol* 145:38-45, 1997.
- DOLDER, M., WALZEL, B., SPEER, O., SCHLATTNER, U., WALLIMANN, T. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem* 278:17760- 17766, 2003.
- DREIEM, A. & SEEGAL, R.F. Methylmercury-induced changes in mitochondrial function in striatal synaptosomes are calcium-dependent and ROS-independent. *Neurotoxicology* 28:720-726, 2007.
- DRIGO, P., PIOVAN, S., BATTISTELLA, P.A., DELLA PUPPA, A., BURLINA, A.B. Macrocephaly, subarachnoid fluid collection, and glutaric aciduria type I. *J Child Neurol* 11:414-417, 1996.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cells function. *Physiol Rev* 82:47-95, 2002.
- DUGAN, L.L., SENSI, S.L., CANZONIERO, L.M., HANDRAN, S.D., ROTHMAN, S.M., LIN, T.S., GOLDBERG, M.P., CHOI, D.W. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* 15:6377-6388, 1995.
- EGGLETON, P. & EGGLETON, G.P. The inorganic phosphate and a labile form of organic phosphate in the gastrocnemius of the frog. *Biochem J* 21:190–195, 1927.
- ERECINSKA, M. & SILVER, I.A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 35:245-296, 1990.
- ESTERBAUER, H., KOLLER, E., SLEE, R.G., KOSTER, J.F. Possible involvement of the lipid-peroxidation product 4-hydroxynonenal in the formation of fluorescent chromolipids. *J Biochem* 239:405-409, 1986.
- FERREIRA, G.C., VIEGAS, C.M., SCHUCK, P.F., TONIN, A., RIBEIRO, C.A.J., COELHO, D.M., DALLA-COSTA, T., LATINI, A., WYSE, A.T.S., WANNMACHER, C.M.D., VARGAS, C.R., WAJNER, M. Glutaric acid administration impairs energy metabolism in midbrain and skeletal muscle of young rats. *Neurochem Res* 30:1123-1131, 2005.
- FERREIRA, G. DA C., SCHUCK, P.F., VIEGAS, C.M., TONIN, A., LATINI, A., DUTRA-FILHO, C.S., WYSE, A.T., WANNMACHER, C.M., VARGAS, C.R., WAJNER, M. Energy metabolism is compromised in skeletal muscle of rats chronically-treated with glutaric acid. *Metab Brain Dis* 22:111-123, 2007.

- FIGHERA, M.R., BONINI, J.S., DE OLIVEIRA, T.G., FRUSSA-FILHO, R., ROCHA, J.B., DUTRA-FILHO, C.S., RUBIN, M.A., MELLO, C.F. GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid. *Int J Biochem Cell Biol* 35:465-473, 2003.
- FIGHERA, M.R., ROYES, L.F., FURIAN, A.F., OLIVEIRA, M.S., FIORENZA, N.G., FRUSSA-FILHO, R., PETRY, J.C., COELHO, R.C., MELLO, C.F. GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylentetrazole. *Neurobiol Dis* 22:611-623, 2006.
- FISHER, A.B. Intracellular production of oxygen-derived free radicals. Proceedings of a Book Lodge Symposium, Augusta, Apr. 27-29:99-104, 1987.
- FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y. The nature of the "inorganic phosphate" in voluntary muscle. *Science* 65:401-403, 1927.
- FLOOR, E. Iron as a vulnerability factor in nigrostriatal degeneration in aging and Parkinson's disease. *Cell Mol Biol* 46:709-720, 2000.
- FLOTT-RAHMEL, B., FALTER, C., SCHLUFF, P., FINGERHUT, R., CHRISTENSEN, E., JAKOBS, C., MUSSHOFF, U., FAUTEK, J.D., DEUFEL, T., LUDOLPH, A., ULLRICH, K. Nerve cell lesions caused by 3-hydroxyglutaric acid: a possible mechanism for neurodegeneration in glutaric acidaemia I. *J Inherit Metab Dis* 20: 387-390, 1997.
- FLOYD, R.A. & HENSLEY, K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 23:795-807, 2002.
- FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42:1-11, 1984.
- FORFIA, P.R., HINTZE, T.H., WOLIN, M.S., KALEY, G. Role of nitric oxide in the control of mitochondrial function. *Adv Exp Med Biol* 471:381-388, 1999.
- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 44:147-159, 1975.
- FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. *Science* 201:875-880, 1978.
- FRIZZO, M. E., SCHWARZBOLD, C., PORCIUNCULA, L. O., DALCIN, K. B., ROSA, R. B., RIBEIRO, C. A., SOUZA, D. O., WAJNER, M. 3-hydroxyglutaric acid enhances glutamate uptake into astrocytes from cerebral cortex of young rats. *Neurochem Int* 44:345-53, 2004.

- FUJIMOTO, S., SHIBATA, I., SUGIYAMA, N., OHBA, S., TOGARI, H., WADA, Y. Unique electroencephalographic change of acute encephalopathy in glutaric aciduria type 1. *Tohoku J Exp Med* 191:31-38, 2000.
- FUNK, C.B., PRASAD, A.N., FROSK, P., SAUER, S., KÖLKER, S., GREENBERG, C.R., DEL BIGIO, M.R. Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort. *Brain* 128:711-722, 2005.
- FURUTA, A., ROTHSTEIN, J.D., MARTIN, L.J. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci* 17:8363-8375, 1997.
- GEGELASHVILI, G. & SCHOUSBOE, A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol Pharmacol* 52:6-15, 1997.
- GERSTNER, B., GRATOPP, A., MARCINKOWSKI, M., SIFRINGER, M., OBLADEN, M., BUHRER, C. Glutaric acid and its metabolites cause apoptosis in immature oligodendrocytes: a novel mechanism of white matter degeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 57:771–776, 2005.
- GOODMAN, S.I., MARKEY, S.P., MOE, P.G., MILES, B.S., TENG, C.C. Glutaric aciduria: a 'new' disorder of amino acid metabolism. *Biochem Med* 12:12-21, 1975.
- GOODMAN, S.I., NORENBURG, M.D., SHIKES, R.H., BRESLICH, D.J., MOE, P.G. Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. *J Pediatr* 90:746-750, 1977.
- GOODMAN S.I., KRATZ L.E., DIGIULIO K.A., BIERY B.J., GOODMAN K.E., ISAYA G., FRERMAN F.E. Cloning of glutaryl-CoA dehydrogenase cDNA, and expression of wild type and mutant enzymes in *Escherichia coli*. *Hum Mol Genet* 4:1493-1498, 1995.
- GOODMAN, S.I. & FRERMAN, F.E. Organic acidemias due to defects in lysine oxidation: 2-ketoadipic acidemia and glutaric acidemia. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th edition. New York, McGraw-Hill:2195-2204, 2001.
- GOODMAN, S.I. Development of pathogenic concepts in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: The challenge. *J Inherit Metab Dis* 27:801-803, 2004.
- GREENBERG, C.R., REIMER, D., SINGAL, R., TRIGGS-RAINE, B., CHUDLEY, A.E., DILLING, L.A., PHILIPPS, S., HAWORTH, J.C., SEARGEANT, L.E., GOODMAN, S.I. A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl-

- CoA dehydrogenase gene is associated with the Island Lake variant of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet* 4:493-495, 1995.
- GREENE, J.G., PORTER, R.H., ELLER, R.V., GREENAMYRE, J.T. Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum. *J Neurochem* 61:1151-1154, 1993.
- GREENE, J.G. & GREENAMYRE, J.T. Exacerbation of NMDA, AMPA, and L-glutamate excitotoxicity by the succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J Neurochem* 64:2332-2338, 1995.
- GREENE, J.G. & GREENAMYRE, J.T. Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol* 48:613-634, 1996.
- GRISAR, T., GUILLAUME, D., DELGADO-ESCUETA, A.V. Contribution of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Res* 12:141-149, 1992.
- GUNTER, T.E., GUNTER, K.K., SHEU, S.S., GAVIN, C.E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol.* 267:313-339, 1994.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. C. In: *Free radicals in biology and medicine*, 3^a ed., New York, Oxford University Press, 1999.
- HARRIS, E.D. Copper as a cofactor and regulator of copper,zinc superoxide dismutase. *J Nutr* 122:636-640, 1992.
- HARRIS, M.E., CARNEY, J.M., COLE, P.S., HENSLEY, K., HOWARD, B.J., MARTIN, L., BUMMER, P., WANG, Y., PEDIGO, N.W.JR., BUTTERFIELD, D.A. β -amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimer's disease. *Neuroreport* 6:1875-1879, 1995.
- HÄRTEL, U., ECKEL, E., KOCH, J., FUCHS, G., LINDER, D., BUCKEL, W. Purification of glutaryl-CoA dehydrogenase from *Pseudomonas* sp., an enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. *Arch Microbiol* 159:174-181, 1993.
- HASSEL, B. & SONNEWALD, U. Selective inhibition of the tricarboxylic acid cycle of GABAergic neurons with 3-nitropropionic acid in vivo. *J Neurochem* 65:1184-1191, 1995.
- HERSCH, S.M., GEVORKIAN, S., MARDER, K., MOSKOWITZ, C., FEIGIN, A., COX, M., COMO, P., ZIMMERMAN, C., LIN, M., ZHANG, L., ULUG, A.M., BEAL, M.F., MATSON, W., BOGDANOV, M., EBBEL, E., ZALETA, A., KANEKO, Y.,

- JENKINS, B., HEVELONE, N., ZHANG, H., YU, H., SCHOENFELD, D., FERRANTE, R., ROSAS, H.D. Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH²'dG. *Neurology* 66:250-252, 2006.
- HEYES, M.P. Hypothesis: a role for quinolinic acid in the neuropathology of glutaric aciduria type I. *Can J Neurol Sci* 14:441-443, 1987.
- HOFFMANN, G.F., TREFZ, F.K., BARTH, P., BÖHLES, J.H., BIGGEMANN, B., BREMER, H.J., CHRISTENSEN, E., FROSCH, M., HANEFELD, F., HUNNEMAN, D.H., JACOBI, H., KURLEMANN, G., LAWRENZ-WOLF, B., RATING, D., ROE, C.R., SCHUTGENS, R.B.H., ULLRICH, K., WEISSER, J., WENDEL, U., LEHNERT, W. Glutaril-CoA Dehydrogenase Deficiency: a distinct encephalopathy. *Pediatrics* 88:1194-1203, 1991.
- HOFFMANN, G.F., GIBSON, K.M., TREFZ, F.K., NYHAN, W.L., BREMER, H.J., RATING, D. Neurological manifestations of organic acid disorders. *Eur J Pediatr* 153:94-100, 1994.
- HOFFMANN, G.F., ATHANASSOPOULOS, S., BURLINA, A.B., DURAN, M., DE KLERCK, J.B.C., LEHNERT, W., LEONARD, J.V., MONAVARI, A.A., MÜLLER, E., MUNTAU, A.C., NAUGHTEN, E.R., PLECKO-STARTING, B., SUPERTI-FURGA, A., ZSCHOCKE, J., CHRISTENSEN, E. Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuropediatrics* 27:115-123, 1996.
- HOFFMANN, G.F. & ZSCHOCKE, J. Glutaric aciduria type I: from clinical, biochemical and molecular diversity to successful therapy. *J Inherit Metab Dis* 22:381-391, 1999.
- HOFFMANN, G.F., VON KRIES, R., KLOSE, D., LINDNER, M., SCHULZE, A., MUNTAU, A.C., RÖSCHINGER, W., LIEBL, B., MAYATEPEK, E., ROSCHER, A.A. Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. *Eur J Pediatr* 163:76-80, 2004.
- HOLLMANN, M. & HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108, 1994.
- HOLTZMAN, D., TOGLIATTI, A., KHAIT, I., JENSEN, F. Creatine increases survival and suppresses seizures in the hypoxic immature rat. *Pediatr Res* 44:410-414, 1998.

- JAMME, I., PETIT, E., DIVOUX, D., GERBI, A., MAIXENT, J.M., NOUVELOT, A. Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* 7:333-337, 1995.
- JENNER, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet* 344:796-698, 1994.
- JORGENSEN, P.L. Structure, function and regulation of Na,K-ATPase in the kidney. *Kidney Int* 29:10-20, 1986.
- KARPIAK, S.E., MAHADIK, S.P., GRAF, L., RAPPORT, M.M. An immunological model of epilepsy: seizures induced by antibodies to GM1 ganglioside. *Epilepsia* 22:189-196, 1981.
- KELLY, A. & STANLEY, C.A. Disorders of glutamate metabolism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7:287-295, 2001.
- KLEIN, A.M. & FERRANTE, R.J. The neuroprotective role of creatine. *Subcell Biochem* 46:205-243, 2007.
- KLIVENYI, P., FERRANTE, R.J., MATTHEWS, R.T., BOGDANOV, M.B., KLEIN, A.M., ANDREASSEN, O.A., MUELLER, G., WERMER, M., KADDURAH-DAOUK, R., BEAL, M.F. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* 5:347-350 1999.
- KLIVENYI, P., GARDIAN, G., CALINGASAN, N.Y., YANG, L., BEAL, M.F. Additive neuroprotective effects of creatine and a cyclooxygenase 2 inhibitor against dopamine depletion in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 21:191-198, 2003.
- KOELLER, D.M., WOONTNER, M., CRNIC, L.S., KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B., STEPHENS, J., HUNT, E.L., GOODMAN, S.I. Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet* 11:347-357, 2002.
- KÖLKER, S., AHLEMEYER, B., KRIEGLSTEIN, J., HOFFMANN, G. F. 3-Hydroxyglutaric and glutaric acids are neurotoxic through NMDA receptors in vitro. *J Inherit Metab Dis* 22:259-262, 1999.
- KÖLKER, S., AHLEMEYER, B., KRIEGLSTEIN, J., HOFFMANN, G.F. Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids in vitro: a new pathophysiologic approach to glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 47:495-503, 2000.

- KÖLKER, S., AHLEMEYER, B., HUHNE, R., MAYATEPEK, E., KRIEGLSTEIN, J., AND HOFFMANN, G. F. Potentiation of 3-hydroxyglutarate neurotoxicity following induction of astrocytic iNOS in neonatal rat hippocampal cultures. *Eur J Neurosci* 13:2115-2122, 2001a.
- KÖLKER, S., AHLEMEYER, B., KRIEGLSTEIN, J., HOFFMANN, G.F. Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr Res* 50:76-82, 2001b.
- KÖLKER, S., KOHR, G., AHLEMEYER, B., OKUN, J.G., PAWLAK, V., HORSTER, F., MAYATEPEK, E., KRIEGLSTEIN, J., HOFFMANN, G.F. Ca^{2+} and Na^+ dependence of 3-hydroxyglutarate-induced excitotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr Res* 52:199-206, 2002a.
- KÖLKER, S., OKUN, J.G., AHLEMEYER, B., WYSE, A.T., HORSTER, F., WAJNER, M., KOHLMULLER, D., MAYATEPEK, E., KRIEGLSTEIN, J., HOFFMANN, G.F. Chronic treatment with glutaric acid induces partial tolerance to excitotoxicity in neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *J Neurosci Res* 68: 424-431, 2002b.
- KÖLKER, S., HOFFMANN, G.F., SCHOR, D.S., FEYH, P., WAGNER, L., JEFFREY, I., POURFARZAM, M., OKUN, J.G., ZSCHOCKE, J., BARIC, I., BAIN, M.D., JAKOBS, C., CHALMERS, R.A. Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: region-specific analysis of organic acids and acylcarnitines in post mortem brain predicts vulnerability of the putamen. *Neuropediatrics* 34:253-260, 2003.
- KÖLKER, S., KOELLER, D. M., OKUN, J. G., HOFFMANN, G. F. Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Ann Neurol* 55:7-12, 2004.
- KÖLKER, S., GARBADE, S.F., GREENBERG, C.R., LEONARD, J.V., SAUDUBRAY, J.M., RIBES, A., KALKANOGLU, H.S., LUND, A.M., MERINERO, B., WAJNER, M., TRONCOSO, M., WILLIAMS, M., WALTER, J.H., CAMPISTOL, J., MARTI-HERRERO, M., CASWILL, M., BURLINA, A.B., LAGLER, F., MAIER, E.M., SCHWAHN, B., TOKATLI, A., DURSUN, A., COSKUN, T., CHALMERS, R.A., KOELLER, D.M., ZSCHOCKE, J., CHRISTENSEN, E., BURGARD, P., HOFFMANN, G.F. Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 59: 840-847, 2006.

- KUGLER, P. & SCHMITT, A. Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia* 27:129-142, 1999.
- KÜLKENS, S., HARTING, I., SAUER, S., ZSCHOCKE, J., HOFFMANN, G.F., GRUBER, S., BODAMER, O.A., KÖLKER, S. Late-onset neurologic disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neurology* 64:2142-2144, 2005.
- KYLLERMAN, M., SKEJELDAL, O.H., LUNDBER, M., HOLME, I., JELLUM, E., VON DOBLEN, U., FOSSEN, A., CARLSSON, G. Dystonia and dyskinesia in glutaric aciduria type I: clinical heterogeneity and therapeutic considerations, *Mov Disord* 9:22-30, 1994.
- KYLLERMAN, M., SKJELDAL, O., CHRISTENSEN, E., HAGBERG, G., HOLME, E., LÖNNQUIST, T., SKOV, L., ROTWELT, T., VON DÖBELN, U. Long-term follow-up, neurological outcome and survival rate in 28 Nordic patients with glutaric aciduria type 1. *Eur J Paediatr Neurol* 8:121-129, 2004.
- LATINI, A., ROSA, R.B., SCUSSIATO, K., LLESUY, S., BELLO-KLEIN, A., WAJNER, M. 3-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. *Brain Res* 956:367-373, 2002.
- LATINI, A., RODRIGUEZ, M., ROSA, R.B., SCUSSIATO, K., LEIPNITZ, G., DE ASSIS, D.R., FERREIRA, G.C., FUNCHAL, C., JACQUES-SILVA, M.C., BUZIN, L., GIUGLIANI, R., CASSINA, A., RADI, R., WAJNER, M. 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. *Neuroscience* 135:111-120, 2005a.
- LATINI, A., SCUSSIATO, K., LEIPNITZ, G., DUTRA-FILHO, C. S., WAJNER, M. Promotion of oxidative stress by 3-hydroxyglutaric acid in rat striatum. *J. Inherit. Metab Dis* 28:57-67, 2005b.
- LATINI, A., FERREIRA, G.C., SCUSSIATO, K., SCHUCK, P.F., SOLANO, A.F., DUTRA-FILHO, C.S., VARGAS, C.R., WAJNER, M. Induction of oxidative stress by chronic and acute glutaric acid administration to rats. *Cell Mol Neurobiol* 27:423-438, 2007.
- LAWLER, J. M., BARNES, W. S., WU, G., SONG, W., DEMAREE, S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun* 290:47-52, 2002.
- LEIBEL, R.L., SHIH, V.E., GOODMAN, S., BAUMAN, M.L., MCCABE, E.R., ZWERDLING, R.G., BERGMAN, I., COSTELLO, C. Glutaric acidemia: a metabolic disorder causing progressive choreoathetosis. *Neurology* 30:1163-1168, 1980.

- LEIST, M. & NICOTERA, P. Calcium and neuronal death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 132:79-125, 1998.
- LENICH, A.C. & GOODMAN, S.I. The purification and characterization of glutaryl-CoA dehydrogenase from porcine and human liver. *J Biol Chem* 261:4090-4096, 1986.
- LIMA, F.D., SOUZA, M.A., FURIAN, A.F., RAMBO, L.M., RIBEIRO, L.R., MARTIGNONI, F.V., HOFFMANN, M.S., FIGHERA, M.R., ROYES, L.F., OLIVEIRA, M.S., DE MELLO, C.F. Na⁺,K⁺-ATPase activity impairment after experimental traumatic brain injury: relationship to spatial learning deficits and oxidative stress. *Behav Brain Res* 193:306-310, 2008.
- LIMA, T.T., BEGNINI, J., DE BASTIANI, J., FIALHO, D.B., JURACH, A., RIBEIRO, M.C., WAJNER, M., DE MELLO, C.F. Pharmacological evidence for GABAergic and glutamatergic involvement in the convulsant and behavioral effects of glutaric acid. *Brain Res* 802:55-60, 1998.
- LINDNER, M., KÖLKER, S., SCHULZE, A., CHRISTENSEN, E., GREENBERG, C.R., HOFFMANN, G.F. Neonatal screening for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 27:851-859, 2004.
- LIPTON, S.A. & ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330:613-622, 1994.
- LOHMANN, K. Über die enzymatische Aufspaltung der Kreatinphosphorsäure; zugleich ein Beitrag zum Chemismus der Muskelkontraktion. *Biochem* 271:264-277, 1934.
- LOVELL, M.A., XIE, C., MARKESBERY, W.R. Acrolein, a product of lipid peroxidation, inhibits glucose and glutamate uptake in primary neuronal cultures. *Free Radic Biol Med* 29:714-720, 2000.
- LOVELL, M.A., XIE, C., MARKESBERY, W.R. Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. *Neurobiol Aging* 22:187-194, 2001.
- LUCAS, D.R. & NEWHOUSE, J.P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 58:193-201, 1957.
- LUNDSGAARD, E. Weitere Untersuchungen über Muskelkontraktionen ohne Milchsäurebildung. *Biochem* 227:51-83, 1930.

- MADL, J.E. & BURGESSER, K. Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 13:4429-4444, 1993.
- MALCON, C., KADDURAH-DAOUK, R., BEAL, M.F. Neuroprotective effects of creatine administration against NMDA and malonate toxicity. *Brain Res* 860:195-198, 2000.
- MALFATTI, C.R., ROYES, L.F., FRANCESCATO, L., SANABRIA, E.R., RUBIN, M.A., CAVALHEIRO, E.A., MELLO, C.F. Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na⁺,K⁺-ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. *Epilepsia* 44:761-767, 2003.
- MARAGAKIS, N.J. & ROTHSTEIN, J.D. Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol* 58:365-370, 2001.
- MATTHEWS, R.T., YANG, L., JENKINS, B.G., FERRANTE, R.J., ROSEN, B.R., KADDURAH-DAOUK, R., BEAL, M.F. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J Neurosci* 18:156-163, 1998.
- MATTHEWS, R.T., FERRANTE, R.J., KLIVENYI, P., YANG, L., KLEIN, A.M., MUELLER, G., KADDURAH-DAOUK, R., BEAL, M.F. Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol* 157:142-149, 1999.
- MAYATEPEK, E., HOFFMANN, G.F., BAUMGARTNER, R., SCHULZE, A., JAKOBS, C., TREFZ, F.K., BREMER, H.J. Atypical vitamin B12-uresponsive methylmalonic aciduria in sibship with severe progressive encephalomyopathy: a new genetic disease? *Eur J Pediatr* 155:398-403, 1996.
- MCDONALD, J.W., SILVERSTEIN, F.S., JOHNSTON, M.V. Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res* 459:200-203, 1988.
- MCDONALD, J.W. & SCHOEPP, D.D. Aminooxyacetic acid produces excitotoxic brain injury in neonatal rats. *Brain Res* 624:239-44, 1993.
- MCLAUGHLIN, B.A., NELSON, D., SILVER, I.A., ERECINSKA, M., CHESSELET, M.F. Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. *Neuroscience* 86:279-290, 1998.
- MCNAUGHT, K.S., THULL, U., CARRUPT, P.A., ALTOMARE, C., CELLAMARE, S., CAROTTI, A., TESTA, B., JENNER, P., MARSDEN, C.D. Inhibition of complex I

- by isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Biochem Pharmacol* 50:1903-1911, 1995.
- MENEGHINI, R. A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje*, v. 5, p. 57-62, 1987.
- MERINERO, B., PEREZ-CERDA, C., FONT, L.M., GARCIA, M.J., APARICIO, M., LORENZO, G., MARTINEZ PARDO, M., GARZO, C., MARTINEZ-BERMEJO, A., PASCUAL CASTROVIEJO, I. Variable clinical and biochemical presentation of seven Spanish cases with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuropediatrics* 26:238-242, 1995.
- MIELE, M., DESOLE, M.S., ENRICO, P., MIELE, E. [Selective pharmacological changes of regional ascorbic acid metabolism in the brain] *Clin Ter Sep* 134:345-353, 1990.
- MILH, M., BECQ, H., VILLENEUVE, N., BEN-ARI, Y., ANIKSZTEJN, L. Inhibition of glutamate transporters results in a "suppression-burst" pattern and partial seizures in the newborn rat. *Epilepsia* 48:169-174, 2007.
- MOREL, P., TALLINEAU, C., PONTCHARRAUD, R., PIRIOU, A., HUGUET, F. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem Int* 33:531-540, 1998.
- MÜHLHAUSEN, C., OTT, N., CHALAJOUR, F., TILKI, D., FREUDENBERG, F., SHAHHOSSINI, M., THIEM, J., ULLRICH, K., BRAULKE, T., ERGÜN, S. Endothelial effects of 3-hydroxyglutaric acid: implications for glutaric aciduria type I. *Pediatr Res* 59:196-202, 2006.
- MURIEL, P. & SANDOVAL, G. Nitric oxide and peroxynitrite anion modulate liver plasma membrane fluidity and Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase activity. *Nitric Oxide* 4:333-342, 2000.
- MURIEL, P., CASTAÑEDA, G., ORTEGA, M., NOËL, F. Insights into the mechanism of erythrocyte Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by nitric oxide and peroxynitrite anion. *J Appl Toxicol* 23:275-278, 2003.
- NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603, 1992.
- NANITSOS, E.K., ACOSTA, G.B., SAIHARA, Y., STANTON, D., LIAO, L.P., SHIN, J.W., RAE, C., BALCAR, V.J. Effects of glutamate transport substrates and glutamate receptor ligands on the activity of Na⁻/K⁽⁺⁾-ATPase in brain tissue in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31:762-769, 2004.

- NATHANSON, J.A., SCAVONE, C., SCANLON, C., MCKEE, M. The cellular Na⁺ pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. *Neuron* 14:781-794, 1995.
- NEUMAIER-PROBST, E., HARTING, I., SEITZ, A., DING, C., KOLKER, S. Neuroradiological findings in glutaric aciduria type I (glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency). *J Inher Metab Dis* 27:869-876, 2004.
- NOLD, M. & WENNEMERS, H. Peptide damage under Fenton conditions is sequence-dependent. *Chem Commun* 21:1800-1801, 2004.
- OBERHOLZER, V.G., LEVIN, B., BURGESS, E.A., YOUNG, W.F. Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. *Arch Dis Child* 42:492-504, 1967.
- OBRENOVITCH, T.P., URENJAK, J., ZILKHA, E., JAY, T.M. Excitotoxicity in neurological disorders the glutamate paradox. *Int J Dev Neurosci* 18:281-287, 2000.
- O'GORMAN, E., BEUTNER, G., DOLDER, M., KORETSKY, A.P., BRDICZKA, D., WALLIMANN, T. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 414:253-257, 1997.
- OKUN, J.G., HÖRSTER, F., FARKAS, L.M., FEYH, P., HINZ, A., SAUER, S., HOFFMANN, G.F., UNSICKER, K., MAYATEPEK, E., KÖLKER, S. Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. *J Biol Chem* 277:14674-14680, 2002.
- OLIVEIRA, M.S., FURIAN, A.F., ROYES, L.F.F., FIGHERA, M.R., MYSKIW, J.C., FIORENZA, N.G., MELLO, C.F. Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128:721-728, 2004.
- OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719-721, 1969.
- OLNEY, J.W. & DE GUBAREFF, T. Glutamate neurotoxicity and Huntington's chorea. *Nature* 271:557-559, 1978.
- OLNEY, J.W. Dietary MSG and behavior. *Toxicol Appl Pharmacol* 53:177-178, 1980.
- OTIS, T.S. Vesicular glutamate transporters in cognition. *Neuron* 29:11-14, 2001.
- OZAWA, S., KAMIYA, H., TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581-618, 1998.

- PAN, J. W. & TAKAHASHI, K. Cerebral energetic effects of creatine supplementation in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:1745-1750, 2007.
- PATEL, M. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and epilepsy. *Free Radic Res* 36:1139-1146, 2002.
- PATEL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med* 37:1951-1962, 2004.
- PAVLAKOVIĆ, G., KANE, M.D., EYER, C.L., KANTHASAMY, A., ISOM, G.E. Activation of protein kinase C by trimethyltin: relevance to neurotoxicity. *J Neurochem* 65:2338-2343, 1995.
- PEPICELLI, O., FEDELE, E., BERARDI, M., RAITERI, M., LEVI, G., GRECO, A., AJMONE-CAT, M.A., MINGHETTI, L. Cyclo-oxygenase-1 and -2 differently contribute to prostaglandin E2 synthesis and lipid peroxidation after in vivo activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampus. *J Neurochem* 93:1561-1567, 2005.
- PETRUSHANKO, I., BOGDANOV, N., BULYGINA, E., GRENACHER, B., LEINSOO, T., BOLDYREV, A., GASSMANN, M., BOGDANOVA, A. Na-K-ATPase in rat cerebellar granule cells is redox sensitive. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:916-925, 2006.
- PINEDA, M., RIBES, A., BUSQUETS, C., VILASECA, M.A., ARACIL, A., CHRISTENSEN, E. Glutaric aciduria type I with high residual glutaryl-CoA dehydrogenase activity. *Dev Med Child Neurol* 40:840-842, 1998.
- PLAITAKIS, A. & CONSTANTAKAKIS, E. Altered metabolism of excitatory amino acids, N-acetyl-aspartate and N-acetyl-aspartyl-glutamate in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull* 30:381-386, 1993.
- PORCIÚNCULA, L.O., DAL-PIZZOL, A., JR., COITINHO, A.S., EMANUELLI, T., SOUZA, D.O., WAJNER, M. Inhibition of synaptosomal [³H]glutamate uptake and [³H]glutamate binding to plasma membranes from brain of young rats by glutaric acid in vitro. *J Neurol Sci* 173:93-96, 2000.
- PORCIÚNCULA, L.O., EMANUELLI, T., TAVARES, R.G., SCHWARZBOLD, C., FRIZZO, M.E., SOUZA, D.O., WAJNER, M. Glutaric acid stimulates glutamate binding and astrocytic uptake and inhibits vesicular glutamate uptake in forebrain from young rats. *Neurochem Int* 45:1075-1086, 2004.
- PRASS, K., ROYL, G., LINDAUER, U., FREYER, D., MEGOW, D., DIRNAGL, U., STÖCKLER-IPSIROGLU, G., WALLIMANN, T., PRILLER, J. Improved reperfusion

- and neuroprotection by creatine in a mouse model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:452-459, 2007.
- PRATICÒ, D. & DELANTY, N. Oxidative injury in diseases of central nervous system; focus on Alzheimer's disease. *Am J Med* 109:577-585, 2000.
- PRYOR, W.A. & CASTLE, L. Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. *Methods Enzymol* 105:293-299, 1984.
- RADI, R., RODRIGUEZ, M., CASTRO, L., TELLERI, R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 308:89-95, 1994.
- RAPPORT, R.L. 2ND, HARRIS, A.B., FRIEL, P.N., OJEMANN, G.A. Human epileptic brain Na, K ATPase activity and phenytoin concentrations. *Arch Neurol* 32:549-554, 1975.
- RASHED, M., OZAND, P.T., AL AQEEL, A., GASCON, G.G. Experience of King Faisal Specialist Hospital and Research Center with Saudi organic acid disorders. *Brain Dev* 16:1-6, 1994.
- RIBEIRO, M.C., DE AVILA, D.S., SCHNEIDER, C.Y., HERMES, F.S., FURIAN, A.F., OLIVEIRA, M.S., RUBIN, M.A., LEHMANN, M., KRIEGLSTEIN, J., MELLO, C.F. Alpha-Tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. *Epilepsy Res* 66:185-94, 2005.
- RIOBO, N.A., MELANI, M., SANJUAN, N., FISZMAN, M.L., GRAVIELLE, M.C., CARRERAS, M.C., CADENAS, E., PODEROSO, J.J. The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase activity in rat brain development. *J Biol Chem* 277:42447-42455, 2002.
- ROBINSON, M.B., SINOR, J.D., DOWD, L.A., KERWIN, J.F. Subtypes of sodium-dependent high-affinity L-[³H]glutamate transport activity – pharmacologic specificity and regulation by sodium and potassium. *J Neurochem* 60:167-179, 1993.
- ROBINSON, M.B. & DOWD, L.A. Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. *Adv Pharmacol* 37:69-115, 1997.
- ROSA, R.B., SCHWARZBOLD, C., DALCIN, K.B., GHISLENI, G.C., RIBEIRO, C.A., MORETTO, M.B., FRIZZO, M.E., HOFFMANN, G.F., SOUZA, D.O., WAJNER, M. Evidence that 3-hydroxyglutaric acid interacts with NMDA receptors in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of young rats. *Neurochem Int* 45:1087-1094, 2004.

- ROSA, R.B., DALCIN, K.B., SCHMIDT, A.L., GERHARDT, D., RIBEIRO, C.A., FERREIRA, G.C., SCHUCK, P.F., WYSE, A.T., PORCIÚNCULA, L.O., WOFCHUK, S., SALBEGO, C.G., SOUZA, D.O., WAJNER M. Evidence that glutaric acid reduces glutamate uptake by cerebral cortex of infant rats. *Life Sci* 81:1668-1676, 2007.
- ROSE, A.M. & VALDES, R. JR. Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clin Chem* 40:1674-1685, 1994.
- ROSENOW, F., HERHOLZ, K., LANFERMANN, H., WEUTHEN, G., EBNER, R., KESSLER, J., GHAEMI, M., HEISS, W.D. Neurological sequelae of cyanide intoxication the patterns of clinical, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography findings. *Ann Neurol* Nov 38:825-828, 1995.
- ROTHSTEIN, J.D., MARTIN, L.J., KUNCL, R.W. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326:1464-1468, 1992.
- ROTHSTEIN, J.D., JIN, L., DYKES-HOBERG, M., KUNCL, R.W. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6591-6595, 1993.
- ROTHSTEIN, J.D., DYKES-HOBERG, M., PARDO, C.A., BRISTOL, L.A., JIN, L., KUNCL, R.W., KANAI, Y., HEDIGER, M., WANG, Y., SCHIELKE, J.P., WELTY, D.F. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686, 1996.
- ROYES, L.F., FIGHERA, M.R., FURIAN, A.F., OLIVEIRA, M.S., DA SILVA, L.G., MALFATTI, C.R., SCHNEIDER, P.H., BRAGA, A.L., WAJNER, M., MELLO, C.F. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neuroscience* 118:1079-90, 2003.
- ROYES, L.F., FIGHERA, M.R., FURIAN, A.F., OLIVEIRA, M.S., MYSKIW, J.DE C., FIORENZA, N.G., PETRY, J.C., COELHO, R.C., MELLO, C.F. Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. *Pharmacol Biochem Behav* 83:136-144, 2006.
- SAID, S.I., PAKBAZ, H., BERISHA, H.I., RAZA, S. NMDA receptor activation: critical role in oxidant tissue injury. *Free Radic Biol Med* 15;28:1300-1302, 2000.
- SAKS, V.A., ROSENSHTRAUKH, L.V., SMIRNOV, V.N., CHAZOV, E.I. Role of creatine phosphokinase in cellular function and metabolism. *J Physiol Pharmacol* 56:691-706, 1978.

- SATTLER, R. & TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 78:3-13, 2000.
- SAUER, S.W., OKUN, J.G., SCHWAB, M.A., CRNIC, L.R., HOFFMANN, G.F., GOODMAN, S.I., KOELLER, D.M., KÖLKER, S. Bioenergetics in glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a role for glutaryl-coenzyme A. *J Biol Chem* 280:21830-21836, 2005.
- SAUER, S.W., OKUN, J.G., FRICKER, G., MAHRINGER, A., MÜLLER, I., CRNIC, L.R., MÜHLHAUSEN, C., HOFFMANN, G.F., HÖRSTER, F., GOODMAN, S.I., HARDING, C.O., KOELLER, D.M., KÖLKER, S. Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Neurochem* 97:899-910, 2006.
- SCHLÜTER, K., FIGIEL, M., ROZYCZKA, J., ENGELE, J. CNS region-specific regulation of glial glutamate transporter expression. *Eur J Neurosci* 16:836-842, 2002.
- SCHULZ, J.B. & BEAL, M.F. Neuroprotective effects of free radical scavengers and energy repletion in animal models of neurodegenerative disease. *Ann N Y Acad Sci* 765:100-110, 1995.
- SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE, D. (Eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th edition. New York, McGraw-Hill. 3-45, 2001.
- SEPKUTY, J.P., COHEN, A.S., ECCLES, C., RAFIQ, A., BEHAR, K., GANEL, R., COULTER, D.A., ROTHSTEIN, J.D. A neuronal glutamate transporter contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy. *J Neurosci* 22:6372-6379, 2002.
- SESTILI, P., MARTINELLI, C., BRAVI, G., PICCOLI, G., CURCI, R., BATTISTELLI, M., FALCIERI, E., AGOSTINI, D., GIOACCHINI, A.M., STOCCHI, V. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 40:837-849, 2006.
- SILVA, C.G., SILVA, A.R., RUSCHEL, C., HELEGDA, C., WYSE, A.T., WANNMACHER, C.M., DUTRA-FILHO, C.S., WAJNER, M. Inhibition of energy production in vitro by glutaric acid in cerebral cortex of young rats. *Metab Brain Dis* 15:123-131, 2000.
- SNYDER, S.H. & BREDET, D.S. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* 266:68-71, 1992.

- SNYDER, S.H. & SABATINI, D.M. Immunophilins and the nervous system. *Nat Med* 1:32-37, 1995.
- SOUTHORN, P. A. & POWIS, G. Free radicals in medicine I. Nature and biologic reactins. *Mayo Clin Proc* 63:381-389, 1988.
- STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 928:22-38, 2001.
- STELLMER, F., KEYSER, B., BURCKHARDT, B.C., KOEPESELL, H., STREICHERT, T., GLATZEL, M., JABS, S., THIEM, J., HERDERING, W., KOELLER, D.M., GOODMAN, S.I., LUKACS, Z., ULLRICH, K., BURCKHARDT, G., BRAULKE, T., MÜHLHAUSEN, C. 3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3. *J Mol Med* 85:763-770, 2007.
- STOKKE, O., GOODMAN, S.I., MOE, P.G. Inhibition of brain glutamate decarboxylase by glutarate, glutaconate, and beta-hydroxyglutarate: explanation of the symptoms in glutaric aciduria? *Clin Chim Acta* 66:411-415, 1976.
- STRAUSS, K.A. & MORTON, H. Type I glutaric aciduria. Part 2. A model of acute striatal necrosis. *Am J Med Gen* 121:53-70, 2003.
- STRAUSS, K.A., PUFFENBERGER, E.G., ROBINSON, D.L., MORTON, H. Type I glutaric aciduria. Part 1. Natural history of 77 patients. *Am J Med Gen* 121:38-52, 2003.
- STROMBERGER, C., BODAMER, O.A., STÖCKLER-IPSIROGLU, S. Clinical characteristics and diagnostic clues in inborn errors of creatine metabolism. *J Inherit Metab Dis* 26:299-308, 2003.
- SYKUT-CEGIELSKA, J., GRADOWSKA, W., MERCIMEK-MAHMUTOGLU, S., STÖCKLER-IPSIROGLU, S. Biochemical and clinical characteristics of creatine deficiency syndromes. *Acta Biochim Pol* 51:875-882, 2004.
- TABRIZI, S.J., BLAMIRE, A.M., MANNERS, D.N., RAJAGOPALAN, B., STYLES, P., SCHAPIRA, A.H., WARNER, T.T. Creatine therapy for Huntington's disease: clinical and MRS findings in a 1-year pilot study. *Neurology* 61:141-142, 2003.
- TABRIZI, S.J., BLAMIRE, A.M., MANNERS, D.N., RAJAGOPALAN, B., STYLES, P., SCHAPIRA, A.H., WARNER, T.T. High-dose creatine therapy for Huntington disease: a 2-year clinical and MRS study. *Neurology* 10;64:1655-1656. 2005
- 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., WADA, K. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699-1702, 1997.
- TARNOPOLSKY, M.A. Clinical use of creatine in neuromuscular and neurometabolic disorders. *Subcell Biochem* 46:183-204, 2007.
- TROTTI, D., ROSSI, D., GJESDAL, O., LEVY, L.M., RACAGNI, G., DANBOLT, N.C., VOLTERRA, A. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J Biol Chem* 15;271:5976-5979, 1996.
- TROTTI, D., DANBOLT, N.C., VOLTERRA, A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci* 19:328-334, 1998.
- TÚNEZ, I., MONTILLA, P., DEL CARMEN MUÑOZ, M., FEIJÓO, M., SALCEDO, M. Protective effect of melatonin on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes in an animal model of Huntington's disease. *J Pineal Res* 37:252-256, 2004.
- TWOMEY, E.L., NAUGHTEN, E.R., DONOGHUE, V. B., Ryan, S. Neuroimaging findings in glutaric aciduria type 1. *Pediatr Radiol* 33:823-830, 2003.
- TYLER, D. D. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem J* 147:493-504, 1975.
- UCHIDA, K. Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. *Trends Cardiovasc Med* 9:109-113, 1999.
- UCHIDA, K. Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino Acids* 25:249-257, 2003.
- ULLRICH, K., FLOTT-RAHMEL, B., SCHLUFF, P., MUSSHOFF, U., DAS, A., LUCKE, T., STEINFELD, R., CHRISTENSEN, E., JAKOBS, C., LUDOLPH, A., NEU, A., ROPER, R. Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis* 22:392-403, 1999.
- UMEMURA, A., MABE, H., NAGAI, H., SUGINO, F. Action of phospholipases A2 and C on free fatty acid release during complete ischemia in rat neocortex. Effect of phospholipase C inhibitor and N-methyl-D-aspartate antagonist. *J Neurosurg* 76:648-651, 1992.
- VARADKAR, S. & SURTEES, R. Glutaric aciduria type I and kynurenine pathway metabolites: a modified hypothesis. *J Inherit Metab Dis* 27:835-842, 2004.

- VASQUES, V., BRINCO, F., VIEGAS, C.M., WAJNER, M. Creatine prevents behavioral alterations caused by methylmalonic acid administration into the hippocampus of rats in the open field task. *J Neurol Sci* May 244:23-29, 2006.
- VOLTERRA, A., TROTTI, D., TROMBA, C., FLORIDI, S., RACAGNI, G. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci* 14:2924-2932, 1994.
- WAJNER, M., BARSCHAK, A.G., LUFT, A.P., PIRES, R., GRILLO, E., LOHR, A., FUNAYAMA, C., SANSEVERINO, M.T., GIUGLIANI, R., VARGAS, C.R. Organic aciduria: diagnosis in high-risk Brazilian patients. *J Pediatr* 77:401-406, 2001.
- WAJNER, M., LATINI, A., WYSE, A. T., DUTRA-FILHO, C. S. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: Insights from animal studies. *J Inher Metab Dis* 27:427-448, 2004.
- WALKER, J.B. & HANNAN, J.K. Creatine biosynthesis during embryonic development. False feedback suppression of liver amidinotransferase by N-acetimidoylsarcosine and 1-carboxymethyl-2-iminoimidazolidine (cyclocreatine). *Biochemistry* 15:2519-2522, 1976.
- WALLIMANN, T., WYSS, M., BRDICZKA, D., NICOLAY, K., EPPENBERGER, H.M. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the phosphocreatine circuit for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281:21-40, 1992.
- WALLIMANN, T., DOLDER, M., SCHLATTNER, U., EDER, M., HORNEMANN, T., O'GORMAN, E., RUCK, A., BRDICZKA, D. Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. *Biofactors* 8:229-234, 1998.
- WENDT, S., DEDEOGLU, A., SPEER, O., WALLIMANN, T., BEAL, M.F., ANDREASSEN, O.A. Reduced creatine kinase activity in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Free Radic Biol Med* 32:920-966, 2002.
- WERNIS, S. W. & LUCHESI, B. R. Free radicals and ischemic tissue injury. *TIPS* 11:161-166, 1990.
- WICK, M., FUJIMORI, H., MICHAELIS, T., FRAHM, J. Brain water diffusion in normal and creatine-supplemented rats during transient global ischemia. *Magn Reson Med* 42:798-802, 1999.

- WÜLLNER, U., YOUNG, A.B., PENNEY, J.B., BEAL, M.F. 3-Nitropropionic acid toxicity in the striatum. *J Neurochem* 63:1772-1781, 1994.
- WYSS, M. & KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80:1107-1213, 2000.
- YAMAGUCHI, S., ORII, T., YASUDA, K., YOSHINORI, K. A case of glutaric aciduria type 1 with unique abnormalities in the cerebral CT findings. *Tohoku J Exp Med* 151:293-299, 1987.
- YODOYA, E., WADA, M., SHIMADA, A., KATSUKAWA, H., OKADA, N., YAMAMOTO, A., GANAPATHY, V., FUJITA, T. Functional and molecular identification of sodium-coupled dicarboxylate transporters in rat primary cultured cerebrocortical astrocytes and neurons. *J Neurochem* 97:162-173, 2006.
- ZHANG, W., NARAYANAN, M., FRIEDLANDER, R.M. Additive neuroprotective effects of minocycline with creatine in a mouse model of ALS. *Ann Neurol* 53:267-270, 2003.
- ZEEVALK, G.D., DERR-YELLIN, E., NICKLAS, W.J. Relative vulnerability of dopamine and GABA neurons in mesencephalic culture to inhibition of succinate dehydrogenase by malonate and 3-nitropropionic acid and protection by NMDA receptor blockade. *J Pharmacol Exp Ther* 275:1124-1130, 1995.
- ZINNANTI, W.J., LAZOVIC, J., WOLPERT, E.B., ANTONETTI, D.A., SMITH, M.B., CONNOR, J.R., WOONTNER, M., GOODMAN, S.I., CHENG, K.C. A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain* 129:899-910, 2006.
- ZINNANTI, W.J., LAZOVIC, J., HOUSMAN, C., LANOUE, K., O'CALLAGHAN, J.P., SIMPSON, I., WOONTNER, M., GOODMAN, S.I., CONNOR, J.R., JACOBS, R.E., CHENG, K.C. Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I. *J Clin Invest* 117:3258-3270, 2007.
- ZSCHOCKE, J., QUAK, E., GULDBERG, P., HOFFMANN, G.F. Mutation analysis in glutaric aciduria type I. *J Med Genet* 37:177-181, 2000.