



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA  
CELULAR

**CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE CAPTAÇÃO DE  
GLUTAMATO POR CROMATOGRRAFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA EM TECIDO RETINIANO.**

EDINALDO ROGÉRIO DA SILVA MORAES

BELÉM  
2011

**EDINALDO ROGÉRIO DA SILVA MORAES**

**CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE CAPTAÇÃO DE  
GLUTAMATO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA EM TECIDO RETINIANO.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração Biologia Celular.

Orientador: Professor Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva

BELÉM  
2011

**EDINALDO ROGÉRIO DA SILVA MORAES**

**CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE CAPTAÇÃO DE  
GLUTAMATO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA EM TECIDO RETINIANO.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração Biologia Celular.

Data de aprovação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Conceito: \_\_\_\_\_

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva – Orientador  
Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira – Banca examinadora  
Universidade Federal do Pará

---

Dra. – Karen Renata Matos Oliveira - Banca examinadora  
Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista – Suplente  
Universidade Federal do Pará

**BELÉM  
2011**

À Deus por me conceder vida para  
realizar este trabalho.

À Daniela Moraes que já faz  
parte da minha história.

## Agradecimentos

Ao professor Dr. Anderson Herculano pela orientação, disposição e confiança neste trabalho, agradeço também por sua consideração e amizade.

À minha família, vó Tereza e companhia, pelo grande suporte em todos os sentidos, em especial minha mãe, Edna Moraes, a qual foi e tem sido uma das principais responsáveis pelo meu sucesso. Também a minha gratidão à João Garcia por ter sido um grande amigo!

À Adriana Oliveira, que me deixa sem palavras para agradecer o quão é importante na minha vida, obrigado por tudo! Também a Isabel, Jonathan, Márcia e Isabella, os quais foram minha segunda família.

Ao amigo Tiago Pereira pela grande consideração e amizade, além de ter sido um grande aliado durante essa jornada acadêmica. À tia Delma que também faz parte do rol de pessoas que me querem bem.

Ao professor Dr. Domingos Diniz que nos deixou por herança o LNE. Ao mestre Alan Grisólia pela disponibilidade em repassar seus conhecimentos sobre CLAE. Também ao Mestre Luiz Maués pela grande contribuição teórica neste estudo. À Dra. Karen Renata Oliveira que colaborou com este trabalho com suas arguições pertinentes, além da sua amizade. Ao professor Dr. José Luiz Vieira pela disponibilidade, dicas e correções. À equipe do Laboratório de Neuroendocrinologia pelas críticas e correções, e a equipe do Laboratório de Farmacologia Molecular da professora Dra. Elena, em especial aos amigos Rogério e Alan Malaquias.

Agradeço a Universidade Federal do Pará, a Makarú-Ltda por ceder os embriões de ave e a CAPES pelo auxílio financeiro. Por fim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste estudo.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular de L-glutamato.....	18
Figura 2: Esquema didático da síntese, liberação e captação de glu no SNC..	18
Figura 3: Tipos de transportadores de glutamato.....	21
Figura 4: Esquema ilustrativo de um cromatógrafo líquido.....	26
Figura 5: Fluxograma do procedimento analítico.....	37
Figura 6: Tempo de retenção do glutamato e homoserina.....	41
Figura 7: Curva de calibração em solução de Hank.....	43
Figura 8: Curva de captação de glu no tecido retiniano.....	47
Figura 9: Cinética de captação de glu no tecido nervoso.....	48
Figura 10: Captação de glu considerando a presença do NaCl.....	49
Figura 11: Captação de glu em diferentes temperaturas.....	50
Figura 12: Modulação da captação de glu em diferentes concentrações de ZnCl ( $10^{-9}$ a $10^{-3}$ Molar).....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Ácido propiônico $\alpha$ -amino-4-hidroxi-5 metil-4-isoxazole
BSA	Albumina sérica bovina
Ca	Cálcio
CG	Cromatografia gasosa
Cl <sup>-</sup>	Cloreto
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EATTs (1-5)	Transportadores de aminoácidos excitatórios
GABA	Ácido gama aminobutírico
GAD	Glutamato descarboxilase
GLAST	Transportador de glutamato e aspartato
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GSH	Glutationa
Gt (g)	Transportador de glutamato glial
Gt (n)	Transportador de glutamato neuronal
H <sup>+</sup>	Hidrogênio
HOM	Homoserina
K <sup>+</sup>	Potássio
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Mentem
LD	Limite de detecção
LiCl	Cloreto de lítio
LQ	Limite de quantificação
mGlurs	Receptores metabotrópicos de glutamato
NaOH	Hidróxido de sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
OPA	Ortoftaldeído
SNC	Sistema Nervoso Central
TCA	Ácido tricloroacético
V <sub>m</sub>	Velocidade máxima
X <sub>CG</sub>	Trocador glutamato-cistina
ZnCl	Cloreto de zinco

## RESUMO

O presente estudo descreve um método eficiente e simples utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detector de fluorescência para determinação dos parâmetros cinéticos da captação de glutamato (glu) no sistema nervoso central (SNC). O tecido retiniano embrionário de ave com sete dias de desenvolvimento foi incubado com concentrações conhecidas de glu (50-500  $\mu$ M) por dez minutos. Os níveis do aminoácido derivado a partir de ortoftaldeído (OPA) no meio de incubação foram mensurados. Após avaliar a diferença entre a concentração de glu inicial e a final no meio, foi determinada a saturação do mecanismo de captação ( $K_m = 8,2$  e  $V_{max} = 9,8$  nmol/mg proteína/minuto). Estas determinações foram dependentes e independentes de sódio e temperatura, indicando que o mecanismo que regula a diminuição dos níveis de glu no SNC, é a captação via transportadores de alta afinidade. Além disso, o cloreto de zinco (ZnCl) (um inibidor do transportador glu/aspartato) foi utilizado em diversas concentrações e evocou diminuição da captação de glu. Com isto, destaca-se a elevada aplicabilidade desta metodologia. Além deste trabalho caracterizar metodologia alternativa para avaliar captação de glu no SNC usando CLAE, também pode ser importante ferramenta para estudos relacionados à caracterização do transporte do neurotransmissor durante injúrias no SNC.

Palavras-chave: captação de glutamato, CLAE, retina, transporte.

## ABSTRACT

The present study describes a simple and efficient method utilizing high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to fluorescence detection for the determination of kinetic parameters of glutamate uptake in nervous tissue. Retinal tissue obtained from 7-day-old chicks was incubated to known concentrations of glutamate (50-2000  $\mu\text{M}$ ) for 10 minutes, and the levels of the *o*-phthaldehyde (OPA)-derivatized neurotransmitter in the incubation medium were measured. By assessing the difference between initial and final concentrations of glutamate in the medium, a saturable uptake mechanism was characterized ( $K_m = 8,2$  e  $V_{max} = 9,8$  nmol/mg protein/minute). This measure was largely sodium- and temperature-dependent, strongly supporting that the mechanism for concentration decrements is indeed uptake by high-affinity transporters. Added to this, our results also demonstrated that zinc chloride (an inhibitor of glutamate/aspartate transporters) evoked a concentration dependent decrease in the glutamate uptake, demonstrating an elevate specificity of our methodology. Overall, the present work characterizes an alternative methodology to evaluate glutamate uptake in nervous tissue using HPLC. This approach could be an important tool for studies associated to the characterization of glutamate transport related with central nervous system injury.

Keywords: glutamate uptake, HPLC, retina, transport.

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Glu e SNC .....	16
1.2 Transportadores de glu .....	19
1.3 O transporte de glu e algumas desordens neurológicas .....	22
1.4 Retina embrionária de aves como modelo de estudo .....	24
1.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	25
2 OBJETIVOS .....	27
2.1 Objetivo geral .....	27
2.2 Objetivos específicos .....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	28
3.1 <i>Explant</i> de retina de embrião de galinha .....	28
3.2 CLAE .....	28
3.3 Reagentes .....	29
3.4 Padrões .....	29
3.4.1 Soluções estoque .....	29
3.4.2 Solução intermediária .....	29
3.4.3 Soluções de trabalho .....	29
3.4.4 Solução do padrão interno .....	30
3.4.5 Soluções de calibração .....	30
3.4.6 Soluções controle .....	30
3.5 Condições cromatográficas .....	30
3.6 Processos de derivatização .....	33
3.6.1 Preparação de OPA (1º Solução) .....	33
3.6.2 Derivatização de aminoácidos (2º Solução) .....	33
3.7 Processos de validação do método .....	34
3.7.1 Parâmetros analíticos para validação do método.....	34
3.7.2 Tempo de retenção .....	34
3.7.3 Linearidade .....	34
3.7.4 Curva de calibração .....	35
3.7.5 Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ) .....	35
3.7.6 Exatidão .....	36

3.7.7 Precisão .....	36
3.7.8 Ensaio de recuperação .....	36
3.8 Captação indireta de glutamato por CLAE .....	38
3.8.1 Curso temporal de captação de glutamato na retina .....	38
3.8.2 Cinética de captação de glutamato ( $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$ ) .....	38
3.8.3 Aplicabilidade do método .....	39
3.8.3.1 Captação de glu em função da presença de sódio .....	39
3.8.3.2 Captação de glutamato em diferentes temperaturas .....	39
3.8.3.3 Ensaio de captação frente a um antagonista do transporte de glutamato .....	39
3.9 Dosagem de proteína .....	40
3.10 Análise estatística .....	40
4 RESULTADOS .....	41
4.1 Validação do método para quantificar glutamato .....	41
4.1.1 Tempo de retenção .....	41
4.1.2 Linearidade .....	42
4.1.3 Curva de calibração .....	42
4.1.4 Limites de detecção e quantificação .....	44
4.1.5 Exatidão .....	44
4.1.6 Precisão .....	45
4.1.7 Recuperação .....	45
4.2 Curso temporal de captação de glutamato na retina .....	46
4.3 Cinética de captação de glutamato na retina .....	46
4.4 Aplicabilidade do método .....	49
4.4.1 Captação de glu em função do $Na^+$ .....	49
4.4.2 Captação de glu em diferentes temperaturas .....	50
4.4.3 Modulação da captação de glu por ZnCl .....	51
5 DISCUSSÃO .....	52
6 CONCLUSÕES .....	58
REFERÊNCIAS .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

A avaliação da captação de glutamato (glu) no Sistema Nervoso Central (SNC) é de fundamental importância para diversos modelos experimentais em neurociência. A neurotransmissão e seus processos de transporte são cruciais e afetam quase todos os aspectos da função cerebral (EIJSDEN *et al.*, 2010). Neste contexto, algumas das metodologias utilizadas para avaliar tais fenômenos são baseadas, geralmente, no uso de glu ou aspartato radioativos ou de medições destes no ambiente intracelular por diversos métodos (MCLAMORE *et al.*, 2010).

Encontram-se na literatura uma variedade de técnicas disponíveis para medir concentrações de glu em sistemas biológicos, dentre estas pode-se destacar, enzimáticas (RICKUS *et al.*, 2001), patch clamp (HUME *et al.*, 1983; COPENHAGEN; JAHR, 1989) e microdiálise (CHEN; LUNTE, 1995). Segundo Mclamore *et al.*, (2010) estas técnicas apresentam desvantagens tais como: limitações temporais, inviabilidade econômica, e/ou incapacidade de detectar alterações no transporte de glu sob condições fisiológicas ou alostáticas.

Alguns trabalhos destacaram a avaliação do transporte de neurotransmissores em diversos modelos experimentais. Na década de 70, Tunncliff determinou parâmetros cinéticos da captação de glu na retina embrionária de galinha por cintilação líquida. Kim *et al.*, (1996) analisaram a cinética de transporte de glu em modelo *in vitro* de plexo coróide. Palmada (1998) demonstrou parâmetros cinéticos de alguns transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) no SNC, determinando as constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) para o transportador de glutamato e aspartato (EAAT1/GLAST) 80  $\mu$ M, transportador EAAT-2 (2  $\mu$ M) e EAAT-3 (12  $\mu$ M).

Gadea *et al.*, (2004) mostraram parâmetros cinéticos da captação de D-aspartato em cultura de glia de Müller para determinar possíveis mecanismos moleculares da modulação da neurotransmissão excitatória.

Neste contexto, fica evidente a necessidade de contínuos estudos voltados para caracterização do transporte de glu no SNC, ainda que diversos métodos de avaliação quantitativa de captação de aminoácidos excitatórios sejam utilizados, novas metodologias devem ser aperfeiçoadas e simplificadas para que se obtenham resultados fidedignos, que favoreçam o entendimento

de questões referentes à captação de glu. Métodos analíticos como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em fase gasosa (CG) são capazes de quantificar concentrações de glu em condições fisiológicas (WATSON *et al.*, 2006). Ribani *et al.*, (2004), apontam que a cromatografia vem se destacando na química analítica pela capacidade de realizar análises de cunho qualitativo e quantitativo em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos.

Ruhrmann e Kramer (1992) quantificaram o glu captado no citoplasma de *Zymomonas mobilis*. Devido o fato da análise quantitativa ser efetuada no ambiente intracelular, notou-se que havia perda de informação devido o metabolismo rápido deste aminoácido no citosol. Neste trabalho, os autores optaram pela utilização de agentes bloqueadores da degradação do glu para que não comprometesse a total fidelidade da quantificação analítica o que torna mais dispendiosa a análise, bem como os autores se certificaram que ao fazer o monitoramento da concentração extracelular de glu por CLAE ocorria diminuição linear desta.

Ao se considerar que a determinação de aminoácidos excitatórios por CLAE está bem estabelecida (SPINK *et al.*, 1986; GOLDSMLTH *et al.*, 1987; ALFREDSSON *et al.*, 1988; MONGE-ACUNA; FORNAGUERA-TRÍAS, 2009; CHAN, *et al.*, 2010), optou-se por utilizar esta técnica neste trabalho para demonstrar um modelo, no qual não é necessário o uso de radiação, e de procedimentos que necessitem lisar a membrana celular ou utilizar compostos que impeçam o metabolismo de glu intracelular.

Pelo fato de não haver qualquer enzima extracelular que possa metabolizar o glu de forma significativa, por conseguinte, a única maneira rápida para remoção é por captação (BALCAR; JOHNSTON, 1972; LOGAN; SNYDER, 1972). Este método propõe a avaliação indireta da captação deste neurotransmissor, e sua doação ao tecido retiniano íntegro será determinada pelo cálculo da diferença entre a concentração de glu inicial e a final neste meio.

$$\Delta Glut = [Glut]_{t_0} - [Glut]_{t_{final}}$$

Sendo assim, será disponibilizada nova opção metodológica para mensurar a captação de glu de forma indireta, porém confiável, uma vez que se

propõe também sua validação, seguindo as normas da ANVISA-Brasil (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) Resolução 899/2003, bem como a determinação dos parâmetros cinéticos da captação de glu na retina e comparações com outras metodologias descritas na literatura que utilizam moduladores do transporte de glu, avaliando com isso, a aplicabilidade do método proposto e aumentando, desta forma, a confiabilidade dos resultados.

## 1.1 Glu e SNC

O glu (figura 1) é um importante neurotransmissor excitatório e gliotransmissor no SNC. Sua modulação extracelular pela liberação e captação dinâmica dos neurônios e astrócitos se torna fundamental para o desempenho de funções fisiológicas, pois é um mecanismo primário para a comunicação neuronal (FONNUM, 1984; DANBOLT, 2001; NEDERGAARD *et al.*, 2002).

No terminal pré-sináptico, o glu fica estocado no interior de vesículas sendo liberado por exocitose na fenda sináptica após despolarização da célula, promovida por processos dependentes de cálcio (MELDRUM, 2000).

Uma vez liberado à fenda sináptica, as respostas fisiológicas do glu são dadas por receptores que podem ser do tipo ionotrópicos e/ou metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são: o NMDA (N-metil-D-aspartato), o AMPA (ácido propiônico  $\alpha$ -amino-4-hidroxi-5-metil-4-isoxazole) e o cainato, que modulam o fluxo de íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{++}$ ), através da membrana plasmática. Os receptores do tipo metabotrópicos variam de 1-8 (mGlurs, 1-8). Eles interagem com proteínas G e assim modulam a atividade no citosol das células via segundos mensageiros (MELDRUM, 2000).

Como mediador das sinapses excitatórias, o glu exerce papel importante em funções essenciais no SNC (OLNEY, 1978), pois está envolvido em processos tais como o envelhecimento (SEGOVIA, 2001), memória e aprendizado (IZQUIERDO; MEDINA, 1997). Além disso, também desempenha importante função no desenvolvimento do SNC, indução e eliminação sináptica, migração celular, diferenciação e morte celular (DANBOLT, 2001), além de participar no processo de sinalização inibitória no SNC, pois atua como precursor para a síntese do neurotransmissor inibitório GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) em neurônios GABAérgicos, sendo esta reação catalisada pela enzima glutamato descarboxilase (GAD) (TAKAHASHI *et al.*, 1996).

O glu pode ser formado a partir da glicose no ciclo de Krebs, por transaminação do  $\alpha$ -cetogluturato por uma transaminase (DEUTCH; ROTH, 1999), desaminação de  $\alpha$ -cetogluturato pela glutamato desidrogenase e ainda diretamente a partir da glutamina.

Após sua liberação na fenda sináptica e ter exercido funções fisiológicas, o glu é captado pelos neurônios e glia por um processo de alta afinidade

dependente de sódio. Nas células gliais, é transaminado pela glutamina sintetase para formar glutamina, que é transportada para os terminais nervosos, sendo então convertida em glu novamente pela enzima glutaminase (WESTERGAARD *et al.*,1995). Este ciclo é conhecido como “ciclo glutamato-glutamina” (Figura 2).

As principais vias eferentes e aferentes corticais utilizam o glu como neurotransmissor, assim como os numerosos circuitos excitatórios locais no córtex, hipocampo, cerebelo e retina (DANBOLT, 2001; POW, 2001).

Na retina, o glu participa no processamento do estímulo visual, pois é responsável pela transmissão sináptica entre células fotorreceptoras, células bipolares e células ganglionares (KALLONIATIS; NAPPER, 2002). A maior parte do glu extracelular é captado via transportadores de alta afinidade acoplados através da retina (REYE *et al.*, 2001; KUGLER, 2002; BEYER, 2003), sendo as células de Müller as principais responsáveis por sua remoção (RAUEN *et al.*,1998).

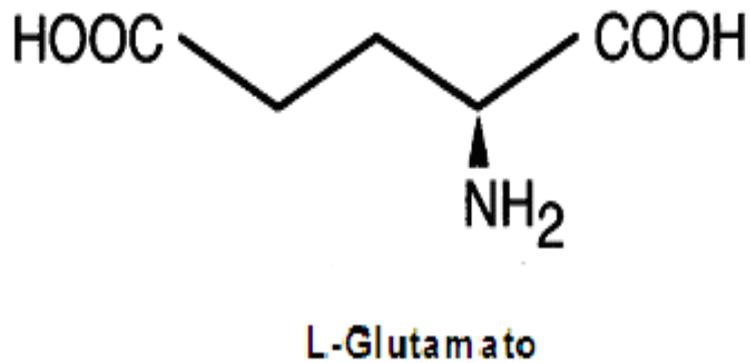


Figura 01: Estrutura molecular de L-glutamato.  
DANBOLT, 2001

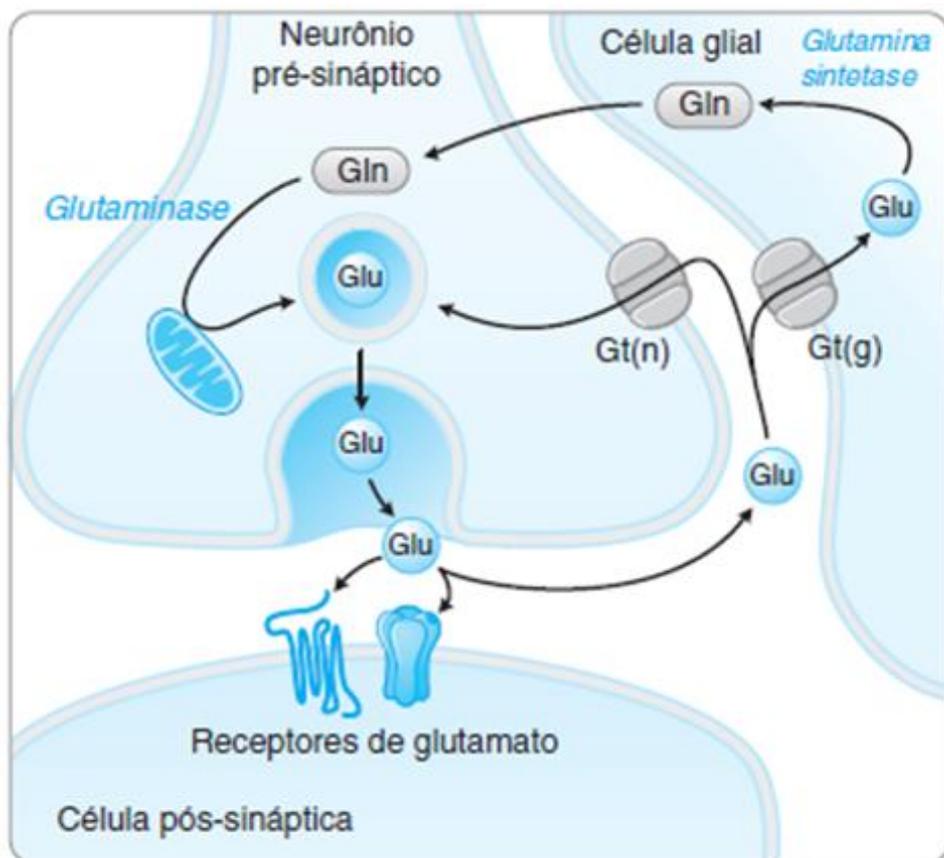


Figura 02: Esquema didático da síntese, liberação e captação de glu no SNC. Glutamato (Glu), glutamina (Gln), Gt(n) (transportador de glutamato neuronal) e Gt(g) (transportador de glutamato glial). (GOLAN, *et al.*, 2009).

## 1.2 Transportadores de glu

Cinco diferentes subtipos de transportadores de glu (transportadores de aminoácidos excitatórios, EAAT, 1–5) já foram identificados e caracterizados: EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT1), EAAT3 (EAAC1), EAAT4 e EAAT5. Estes apresentam localização celular distinta, assim como diferentes características farmacológicas, histológicas e moleculares (DANBOLT *et al.*, 1998; SEAL; AMARA, 1999). Todos são do tipo eletrogênico, pois utilizam gradiente iônico de cotransporte e contra-transporte (ZERANGUE; KAVANAUGH, 1996).

A captação celular de glu é acoplada ao transporte dos íons inorgânicos  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , sendo que o transporte de uma molécula de glu para o interior da célula é vinculado à entrada de dois ou três íons  $\text{Na}^+$  e um próton, e à saída de um íon  $\text{K}^+$  (NEDERGAARD *et al.*, 2002).

O EAAT1 em humanos apresenta 96% de homologia ao transportador GLAST presente em ratos (STORCK, 1992). GLAST é um transportador específico para L-glu e L-aspartato e desempenha papel importante na sinalização dos neurotransmissores nas sinapses excitatórias. Este é predominantemente localizado nas células gliais de Bergmann, no entanto, pode ser encontrado nas demais células distribuídas por todo sistema nervoso central, como nos astrócitos e células de Müller (LEHRE, 1997; FURUTA *et al.*, 1997).

O EAAT2 presente em humanos apresenta 95% de homologia a sequência do GLT1 presente em ratos (PINES, 1992). O transportador EAAT2, é também predominante nas células da glia, apresentando distribuição uniforme e abundante por todo o sistema nervoso central (FURUTA, 1997).

Em relação ao EAAT3, possui 92% de homologia com a sequência de coelho chamado EAAC1 (KANAI; HEDIGER, 1998). Os transportadores EAAT3 e EAAT4 são, predominantemente, encontrados nos neurônios, sendo que o EAAT3 encontra-se expresso por todo o sistema nervoso central, principalmente no córtex e no hipocampo (SIMS; ROBINSON, 1999). O EAAT 4 é expresso no cerebelo, no tronco encefálico, córtex e hipocampo. A sequência de aminoácidos exibe 65%, 41% e 48% homólogos ao transportador EAAT1, EAAT2 e EAAT3, respectivamente (PALMADA, 1998).

O EAAT5 é um transportador de glutamato presente em humano, cuja expressão se dá principalmente na retina (ARRIZA *et al.*, 1997). Segundo Eliasof (1998), a expressão do transportador EAAT5 foi caracterizada como exclusiva dos neurônios, nas células fotorreceptoras e bipolares na retina.

A concentração de moléculas de transportadores de glu no tecido nervoso é alta. Cerca de 15.000 (quinze mil) a 21.000 (vinte e um mil) moléculas de transportadores de glu glial estão presentes por  $\mu\text{m}^3$  de tecido no estriado radiado de hipocampo e de camadas moleculares de cerebelo, respectivamente (LEHRE; DANBOLT, 1998). Segundo Dehnes *et al.*, (1998) com exceção de um transportador EAAT4 nas células de Purkinje, a densidade de transportadores neuronais (EAAC) é desconhecida .

Outro tipo de transporte de glu dependente de cloreto e independente de sódio foi descrito e caracterizado farmacologicamente no SNC incluindo a retina (antiporte cistina-glutamato, sistema  $X_{CG}^-$ ) (SATO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Este pertence ao grupo da família de aminoácidos associados a glicoproteínas. O  $X_{CG}^-$  é um antiporte que normalmente regula a captação de cistina em troca da liberação de glu. A cistina captada é usada para a síntese de glutathiona (GSH) (MCBEAN, 2002; BRINGMANN *et al.*, 2009).

Uma vez que este sistema  $X_{CG}^-$  transporta cistina utilizando o gradiente transmembrana do glu como força motriz (BANNAI; TATEISHI, 1986), a troca também pode mediar a captação de glu independente de sódio, pois sua concentração extracelular é elevada (KATO *et al.*, 1993). A figura 3 demonstra um esquema relacionado aos tipos de transportadores de glu no SNC e suas distintas localizações.

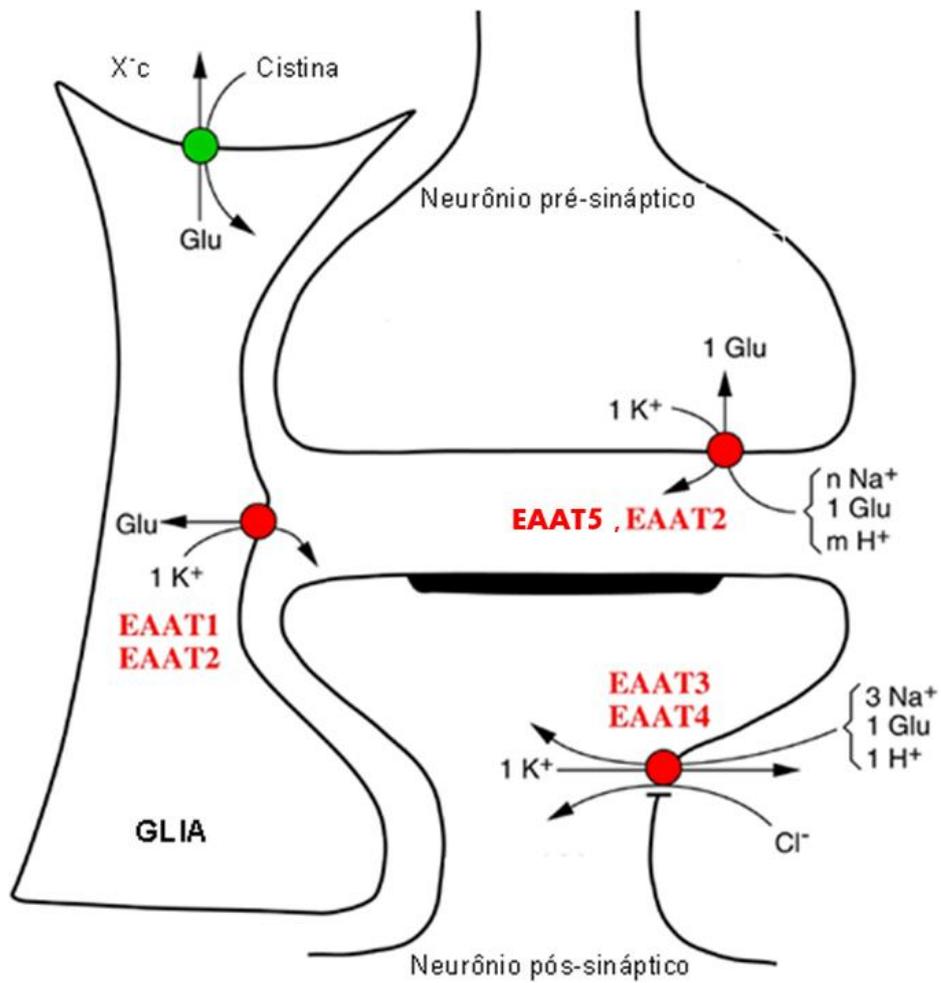


Figura 03: Tipos de transportadores de glutamato no SNC e suas distintas localizações. EAATs ( ● ) e Xc<sup>-</sup> ( ● ) Danbolt, 2001 (modificado).

### 1.3 O Transporte de glu e algumas desordens neurológicas

Algumas disfunções nos transportadores de glu promovem seu acúmulo no espaço extracelular podendo levar a morte celular por excitotoxicidade (IZUMI *et al.*, 1999). Este fenômeno ocorre porque altas concentrações do glu no ambiente neuronal podem induzir ativação excessiva dos seus receptores e desencadear processos mediados pelo cálcio, que pode provocar degeneração neuronal e morte celular (GAGLIARDI, 2000).

Grande parte da captação de glu está acoplada a processos dependentes de sódio e potássio, seu acúmulo nas células pode ser até 10.000 vezes superior as concentrações extracelulares (MARAGAKIS; ROTHSTEIN, 2006). Os transportadores de glu são modulados também pela atividade da bomba de sódio/potássio. Desta forma, um colapso no gradiente de sódio leva a condições limitantes de energia, o que pode promover ineficiência no seu transporte (DANBOLT *et al.*, 1998).

Uma das conseqüências do mau funcionamento destes transportadores é o transporte reverso de glu, quando ao invés de ser captado, é liberado da célula, aumentando assim sua concentração no meio extracelular, o que pode ser letal aos neurônios (MONTIEL *et al.*, 2005; MARAGAKIS; ROTHSTEIN, 2006). Desta forma, a concentração de glu na fenda sináptica deve ser mantida abaixo dos níveis excitotóxicos (LIPTON; ROSENBERG, 1994; DANBOLT, 2001).

Além da manutenção de níveis ideais de glu nos espaços extracelulares, seu transporte normal também é essencial para vias metabólicas como produção de energia e síntese de GSH, um tripeptídeo com importantes funções antioxidantes no SNC (DANBOLT, 2001). Portanto, o controle do seu nível extracelular é de suma importância para manutenção da homeostasia no SNC, incluindo a retina (IZUMI *et al.*, 1999).

A monitoração dos níveis glutamatérgicos no SNC se torna importante pelo fato de se caracterizar valores de referência dos níveis normais da sinalização glutamatérgica, bem como aquelas alterações relacionadas às neuropatologias (DAY, 2006).

Diversas desordens neurológicas estão associadas ao transporte de glu e sua excitotoxicidade, dentre outras se destacam, Alzheimer (HARRIS *et al.*, 1995), epilepsia (MELDRUM *et al.*, 1994), isquemia (CHOI, 1990), esclerose amiotrófica lateral, doença de Parkinson, esquizofrenia (LIPTON; ROSENBERG, 1994), déficit de atenção/hiperatividade (PERLOV, *et al.*, 2007) e acidente vascular encefálico (BITTIGAU; IKONOMIDOU, 1997).

Como descrito anteriormente existe um tipo de transporte de glu independente de  $\text{Na}^+$  ( $X_{\text{CG}}^-$ ), também envolvido em importantes neuropatologias. Como destaque, alguns tipos de câncer cerebral (glioma). Segundo Ye *et al.*, (1999), a proliferação de gliomas leva a morte neuronal por excitotoxicidade. Isto porque, a liberação de glu pelo trocador  $X_{\text{CG}}^-$  aumenta o excesso deste na fenda sináptica, que é atenuado por sua captação através de seus transportadores acoplados aos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Porém diversas linhagens de células de gliomas por apresentarem alta atividade de troca glutamatérgica pelo sistema  $X_{\text{CG}}^-$  e, em contrapartida, serem deficientes na expressão de transportadores de glu dependentes de  $\text{Na}^+$ , levam a um acúmulo da sua concentração no ambiente extracelular.

Montiel *et al.*, (2007), após suspeitarem que a inibição de uma via metabólica intracelular diminuía a captação de glu em hipocampo de ratos e por conseguinte um dano neuronal, recorreram a coleta por microdiálise e dosagem por CLAE para estabelecer a relação entre a inibição da via e o transporte de glu.

Ochiai *et al.*, (2006) determinaram os níveis de captação de diversos aminoácidos entre eles o glu, por cintilação líquida e CLAE, em uma linhagem celular (MOLT 4, célula T4 leucêmica humana), para entender alguns aspectos bioquímicos importantes da atuação de drogas anti-leucêmicas.

Monge-Acuña e Fornaguera-Trías (2009) discutiram em seu trabalho a importância da determinação de GABA, glu e glutamina em modelos animais pelo fato de existir uma correlação destes aminoácidos a doenças neurológicas. Segundo eles, existe grande interesse no desenvolvimento de terapias em trabalhos de pesquisa, pré-clínicos e ensaios clínicos, os quais se empenham em reestabelecer o equilíbrio do sistema neurotransmissor GABA/glu. Nesse contexto, existe grande variedade de drogas que foram

desenvolvidas, as quais se destacam: os ansiolíticos, os sedativos hipnóticos, os estabilizadores de humor, anestésicos e anticonvulsivantes.

Além disso, outras importantes doenças retinianas estão envolvidas com o transporte glutamatérgico. Dentre elas, a retinopatia diabética e o glaucoma. Ward *et al.*, (2005) determinaram que havia alterações nos níveis da expressão do transportador GLAST/EAAT1 em modelos de ratos com diabetes. Ambati *et al.*, (1997), também já haviam mostrado alterações no nível de glu no vitreo de pacientes durante a retinopatia diabética.

Dentre outros fatores importantes que levam ao dano retiniano durante o glaucoma, foi descrito por Naskar *et al.*, (2000), uma baixa regulação dos níveis de expressão do transportador GLAST. Esta falha de expressão, tem por consequência, o aumento da concentração de glu e dano retiniano por excitotoxicidade.

Considerando os descritos acima, a monitoração, seja qualitativa ou quantitativa, de neurotransmissores em situações normais ou patológicas é fundamental para o progresso dos estudos em neurociências. Sendo assim, ratifica-se a importância do desenvolvimento de métodos para avaliar o transporte de glu em amostras biológicas (SILVA, *et al.*, 2009).

#### **1.4 Retina embrionária de aves como modelo de estudo**

A retina de aves é um excelente modelo para avaliar alterações neuroquímicas no SNC (BELECKY-ADAMS *et al.*, 2008). Devido a sua localização extracranial, o procedimento de dissecação é simples, e causa menos trauma ao tecido quando comparado com a preparação de fatias cerebrais. Apesar de sua fina espessura, a retina é forte o bastante para permanecer intacta durante o processo de isolamento, sendo o corte do nervo óptico o único dano causado ao tecido (POW, 2001; BELECKY-ADAMS *et al.*, 2008).

Em alguns vertebrados (répteis, aves, anfíbios e mamíferos) a retina não possui vasos penetrantes, e recebe seus nutrientes por capilaridade de outras superfícies. Portanto este órgão não é tão prejudicado ao ser removido do olho

e transferido para um meio contendo fluido similar ao natural (CENTURIÃO, 2004).

Dados morfológicos, metabólicos e eletrofisiológicos indicam que a retina isolada mantém praticamente todas as suas atividades fisiológicas. É um excelente modelo para avaliar a fisiologia e função dos transportadores de aminoácidos excitatórios. O estudo do tecido *in vitro* (assim como acontece com fatias cerebrais) permite ao observador expor as células de retina intactas as drogas com concentrações e tempo de exposição pré definidos, assim como, quantificar sua entrada e saída das células (POW, 2001; CENTURIÃO, 2004; BELECKY-ADAMS *et al.*, 2008).

### **1.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

CLAE é um método físico-químico de separação, no qual os constituintes de determinada amostra interagem com um solvente (fase móvel), o qual passa através de uma coluna cromatográfica (fase estacionária). É um tipo de cromatografia líquida que utiliza colunas preenchidas com materiais especialmente preparados para a fase móvel, eluída sob alta pressão. Assim, a separação destes componentes acontece. Posteriormente tais componentes são identificados e quantificados por distintos sistemas de detecção como, por exemplo, espectrofotômetro UV/Vis, o fluorímetro e detector eletroquímico. A CLAE tem a capacidade de realizar separações analíticas e análises de cunho quantitativo de uma variabilidade de compostos presentes em amostras complexas, em escala de tempo de minutos com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS, 2006). Um esquema ilustrativo de seus componentes é mostrado na figura 4.

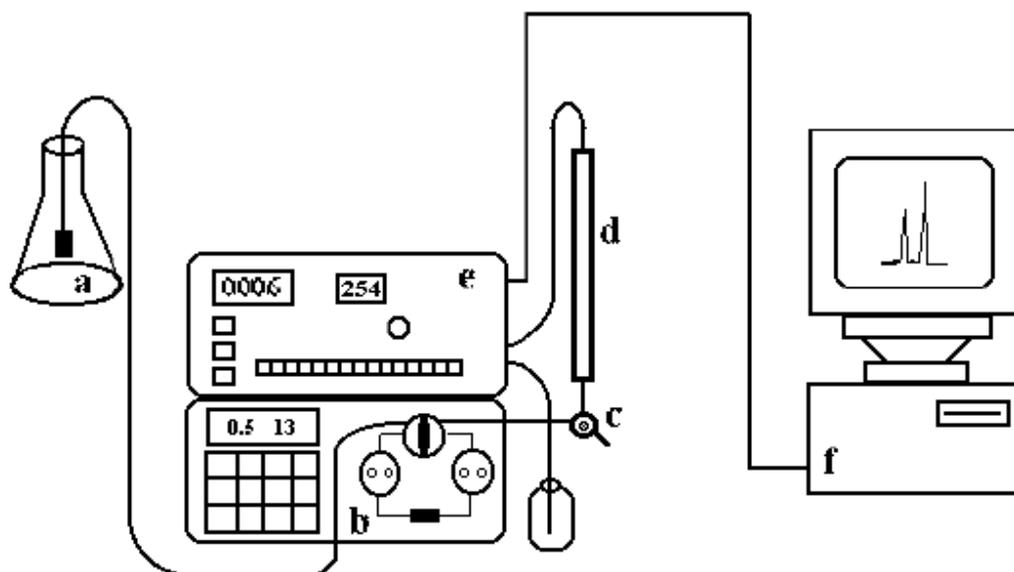


Figura 04: Esquema ilustrativo de um cromatógrafo líquido. **a** (fase móvel); **b** (bomba); **c** (injetor de amostra); **d** (coluna analítica); **e** (detector), e **f** (integrador/registrator).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Desenvolver metodologia analítica para quantificar a captação de glu no tecido retiniano.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter os parâmetros analíticos necessários para validação do método (linearidade, curva de calibração, tempo de retenção, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e recuperação) para quantificar o aminoácido glu na matriz de análise;
- Determinar a concentração de glu no meio extracelular nos períodos inicial ( $T_0$ ) e final ( $T_{final}$ ) de exposição ao tecido nervoso;
- Caracterizar a cinética de captação a partir de diferentes concentrações de glu e tempo de exposição;
- Verificar a aplicabilidade do método de captação considerando a presença de sódio, diferentes temperaturas e frente a um bloqueador do transportador de glu.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 *Explant* de retina de embrião de galinha

Utilizou-se o modelo *explant* de retinas de embriões de galinha em estágio de desenvolvimento de sete a oito dias, datados de acordo com Hamburger e Hamilton (1951). Os animais foram sacrificados e, posteriormente, tiveram seus globos oculares removidos em placa de Petri contendo solução de Hank gelado (128 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de CaCl<sub>2</sub>, 12 mM de glicose e 20 mM de HEPES). A seguir, o tecido retiniano dissecado intacto, foi transferido para poços de placa de cultura de células (uma retina por poço), e submetido aos tratamentos descritos posteriormente.

Importante ressaltar que devido à escolha deste método optar por não trabalhar com procedimentos de extração do analito do conteúdo intracelular, a matriz estudada foi a solução de Hank.

### 3.2 CLAE

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, composto por bomba, modelo LC20-AT, detector de fluorescência, modelo RF-10AxI, degaseificador, modelo DGA-20A5, módulo comunicador, modelo CBM-20A acoplado a microcomputador com software de integração *Lab solution*, injetor de amostras Rheodyne com alça de injeção de 20 microlitros, forno, modelo CTO 20A, coluna cromatográfica Shimadzu, Shim-Pack VP-ODS, dimensão 250 x 4,6 mm e com partículas de 5 µm. As amostras foram injetadas no cromatógrafo com auxílio de microseringa de 50 µL (Hamilton).

### **3.3 Reagentes**

Utilizou-se metanol grau CLAE (Merck). 2-propanol acetato de sódio, ácido acético, ácido bórico, cloreto de zinco, *o*-phthaldehyde (OPA), N-acetilcisteína, L-glutamato e L-homoserina foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### **3.4 Padrões**

#### **3.4.1 Soluções estoque**

As soluções estoque de glu e de padrão interno, homoserina, foram preparadas pela dissolução dos respectivos aminoácidos em água ultra pura para a obtenção das concentrações de 1,0 mg/mL para o glu e 0,5 mg/mL para a homoserina.

#### **3.4.2 Solução intermediária**

A solução estoque de glu foi diluída em água ultra pura com o objetivo de se obter concentração de 100 µg/mL.

#### **3.4.3 Soluções de trabalho**

Efetou-se soluções de trabalho a partir de diluições da solução intermediária em água ultra pura a fim de se obter as seguintes concentrações: 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µg/mL.

#### **3.4.4 Solução do padrão interno**

A diluição da solução estoque de homoserina, foi feita em água ultra pura, para a obtenção da concentração de 30,0 µg/mL.

#### **3.4.5 Soluções de calibração**

As soluções de calibração foram preparadas a partir de uma solução estoque Hank (glu na concentração de 0,5 mg/mL), para a obtenção das concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µg/mL.

#### **3.4.6 Soluções controle**

Para o preparo das soluções controle, fez-se alíquotas a partir do glu na concentração de 0,5 mg/mL e diluído em solução de Hank, a fim de se obter concentrações de 1,0; 10,0 e 20,0 µg/mL.

### **3.5 Condições cromatográficas**

As amostras obtidas foram injetadas, após processo de derivatização descrito posteriormente, em um sistema CLAE, gradiente para eluição da fase móvel (Tabela 1) composto por fase A tampão acetato de sódio 50 µM, metanol e propanol (95% de tampão acetato com pH 5,67; 5% de metanol e 12 mL de propanol para cada litro de fase A), e fase B metanol 70 %, fluxo de 1,2 ml/min, eluição de 25 minutos, detector fluorescência, comprimento de onda de excitação 340 nm e emissão de 460 nm. O resumo do protocolo para determinação do aminoácido glu encontra-se exposto na tabela 2.

Tabela 1: Fase móvel com gradiente composto por fase A tampão acetato de sódio 50  $\mu$ M, metanol e propanol. pH = 5,67. Fase B metanol 70 %, fluxo de 1,2 mL/min, eluição de 25 minutos.

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Fase A %</b>	<b>Fase B %</b>
<b>0,01</b>	<b>100</b>	<b>0</b>
<b>10</b>	<b>70</b>	<b>30</b>
<b>20</b>	<b>50</b>	<b>50</b>
<b>25</b>	<b>100</b>	<b>0</b>

Tabela 2: Resumo do protocolo do método para determinação do aminoácido glutamato

Características do protocolo	Especificações
Fase Móvel	Fase A (tampão acetato de sódio) Fase B Metanol 70%
Coluna Analítica	Shimadzu, 5 $\mu$ M. 250 x 4,6 mm
Fluxo	1.2 mL/min
Temperatura	26 °C
Agente Derivatizante	OPA (ortoftaldeído)
Tipo de Detector	Fluorescência (excitação 340 nm e emissão 460 nm)
Tempo de eluição	25 minutos
Analito quantificado	Glutamato

### **3.6 Processos de derivatização**

O processo de derivatização tem por objetivo aumentar a sensibilidade de detecção, sendo assim é um procedimento utilizado comumente em cromatografia (SILVA, *et al.*, 2009; DEVALL, *et al.*, 2007). Neste estudo foram feitos processos de derivatização com OPA, detalhados a seguir.

#### **3.6.1 Preparação de OPA (1º Solução)**

Em um tubo cônico âmbar de 2 mL de volume foi feita a mistura de 16,3 mg de N-acetil-cisteína, 13 mg de OPA e 300 µL de metanol. Nesta reação o OPA se ligou ao grupamento tiol da cisteína. É necessário manter repouso por 30 minutos para formar o complexo “OPA + cisteína.” (SHAH, *et al.*, 2002).

#### **3.6.2 Derivatização de aminoácidos (2º Solução)**

O complexo “OPA + cisteína” uma vez misturado aos aminoácidos de interesse (glu ou homoserina) irá formar o derivado isoindol. Este derivado é o composto que emitirá fluorescência. Sendo assim, com o objetivo de quantificar os aminoácidos utilizando derivados com OPA, foi realizado o seguinte procedimento: após 30 minutos de repouso da 1º solução, esta foi misturada a amostra de aminoácidos e tampão borato (pH 9.5) na proporção de 1:6:4 (v/v) respectivamente, em um tubo âmbar 2 mL de volume, aguardando um tempo de cinco minutos antes de aplicar no cromatógrafo.

### **3.7 Processos de validação do método**

#### **3.7.1 Parâmetros analíticos para validação do método**

Para validação, foram empregados os seguintes parâmetros: tempo de retenção; linearidade; curva de calibração; limite de detecção e quantificação; exatidão; precisão e ensaios de recuperação.

#### **3.7.2 Tempo de retenção**

O tempo de retenção é o parâmetro que verifica o período para eluição do analito desde o ato da injeção até a saída do ponto máximo do pico do sistema. Engloba o tempo que o componente em questão fica no sistema cromatográfico, quer na fase móvel quer na fase estacionária. A obtenção deste parâmetro permite a identificação do analito de interesse frente às condições cromatográficas previamente estabelecidas. Para determinação do tempo de retenção do glu foi injetada a solução intermediária de glu e hom obtida da solução do padrão interno.

#### **3.7.3 Linearidade**

Este processo corresponde à capacidade do detector em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em análise, em determinada faixa de aplicação. Após as soluções de trabalho juntamente com o padrão interno passarem pelo processo descrito no item 3.6.2, foram injetadas no cromatógrafo líquido sob as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 1. Em seguida os valores das relações das áreas do glutamato e do padrão interno foram projetados no eixo das ordenadas e as concentrações do analito no eixo das abscissas. Análise de regressão linear foi utilizada para determinar o coeficiente de correlação e a equação de reta. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.7.4 Curva de calibração**

As soluções de calibração após passarem pelo processo descrito no item 3.6.2, foram injetadas no cromatógrafo líquido sob as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 1. As relações das áreas de glu e do padrão interno foram projetadas no eixo das ordenadas enquanto que as respectivas concentrações no eixo das abscissas. A curva de regressão linear foi efetuada para obtenção do coeficiente de correlação e equação da reta. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.7.5 Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ)**

O LD do método representa a menor concentração do analito em exame que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, utilizando um determinado procedimento experimental, que neste caso, foi observado pela diferença do ruído da linha de base (relação sinal-ruído). Após as soluções de trabalho passarem pelo processo descrito no item 3.6.2, foram injetadas no cromatógrafo líquido sob as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 1. Este procedimento foi determinado a partir das sucessivas soluções diluídas de glu nas concentrações abaixo ou igual ao último ponto da curva de calibração.

O LQ é o valor limite que define o quanto de uma amostra pode ser detectada e quantificada com elevada precisão estatística (coeficiente de variação igual ou inferior a 10%). Após as soluções de calibração passarem pelo processo descrito no item 3.6.2, foram injetadas no cromatógrafo líquido sob as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 1. Para tal avaliação utilizou-se concentrações de glu superiores ao limite de detecção.

### 3.7.6 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão foi determinada a partir das soluções controle, que após passar por processo descrito no item 3.6.2, foram injetadas no cromatógrafo líquido sob as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 1. Os ensaios foram feitos em quintuplicata durante três dias consecutivos. Para calcular a exatidão efetuou-se a seguinte equação:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

### 3.7.7 Precisão

É a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão do método foi avaliada pelo coeficiente de variação intraensaio e interensaio, utilizando-se as soluções controle, após os processos descritos no item 3.6.2 e sob as condições descritas na tabela 1. Os ensaios foram realizados em quintuplicata durante três dias consecutivos.

### 3.7.8 Ensaio de recuperação

A recuperação do analito indica o quanto foi perdido durante as diversas etapas ocorridas nos procedimentos de preparo da amostra. A recuperação do presente método foi determinada a partir das soluções controle que foram mensuradas após os diferentes processos de tratamentos descritos no fluxograma apresentado na figura 5, e seguindo os procedimentos do item 3.6.2 e condições estabelecidas na tabela 1. Os ensaios foram feitos em triplicata durante dois dias consecutivos. Para calcular a recuperação utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor adicionado}} \times 100$$

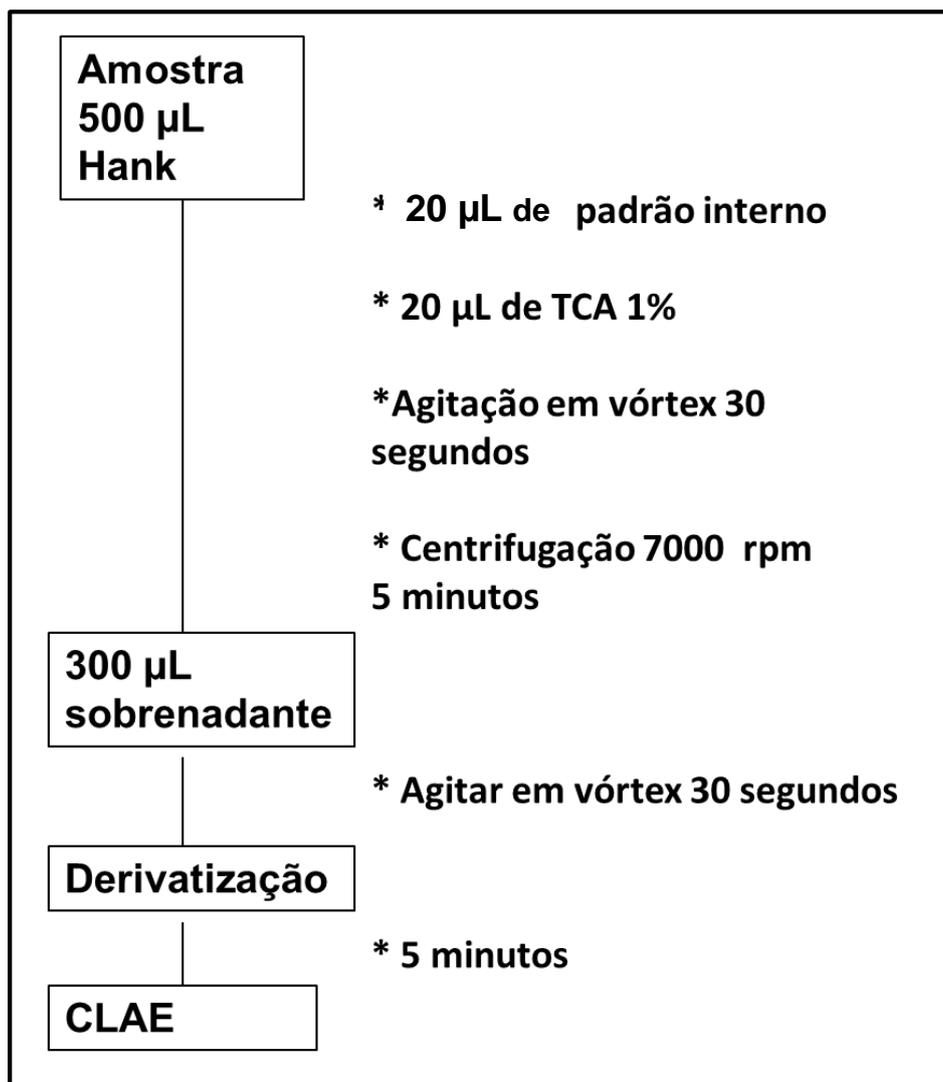


Figura 05: Fluxograma do procedimento analítico para determinação de glu por CLAE.

### **3.8 Captação indireta de glutamato por CLAE**

#### **3.8.1 Curso temporal de captação de glutamato na retina**

Para determinação do curso temporal de captação de glu no tecido nervoso, realizou-se o mesmo procedimento descrito no item 3.1, a seguir foi feita a incubação de glu no tecido a uma concentração conhecida (50  $\mu\text{M}$ ), em um volume total de 2 mL para cada poço a 37 °C, mantido em estufa de  $\text{CO}_2$  por 30 minutos, sendo realizadas coletas de 500  $\mu\text{L}$  do meio de incubação a cada cinco minutos. Posteriormente, as amostras foram acrescidas do padrão interno e ácido tricloroacético (TCA) a 1% para precipitação das proteínas e posterior centrifugação do material a 7000 RPM (rotações por minuto) por um período de cinco minutos. Por fim, fizeram-se coletas de 300  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para quantificação de glutamato remanescente no meio de incubação. A figura 5 mostra o fluxograma do procedimento analítico. Os ensaios de captação foram feitos em triplicata.

#### **3.8.2 Cinética de captação de glutamato ( $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$ )**

Para avaliar a cinética de captação de glu no tecido retiniano, foi adotado o mesmo procedimento do item 3.1 e as mesmas condições descritas em 3.8.1 e seguindo o mesmo processo de determinação analítica apresentado na figura 5. As retinas dissecadas foram expostas as diferentes concentrações de glutamato (50-2000  $\mu\text{M}$ ) para se obter um ponto de saturação da captação, sendo o tempo de análise aquele em que houve a captação máxima pré-estabelecida. A seguir, os valores referentes a constante da cinética enzimática de Michaelis-Mentem ( $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ ), foram determinadas com o auxílio do programa Graphpad Prisma V4.0.

### **3.8.3 Aplicabilidade do método**

#### **3.8.3.1 Captação de glu em função da presença de sódio**

Com o objetivo de verificar a aplicabilidade da metodologia, avaliou-se a captação do glu em meio contendo sódio ou não. Para isto, o tecido nervoso foi incubado com solução de Hank com NaCl (Hank cloreto de sódio) ou LiCl (Hank cloreto de lítio). As retinas foram dissecadas conforme descrito no item 3.1 e submetidas às mesmas condições descritas no item 3.8.1 e seguindo o mesmo processo de determinação analítica apresentado na figura 5, realizou-se incubações à concentração conhecida de glutamato (cerca de 160  $\mu\text{M}$ ) na retina, no tempo de captação de dez minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **3.8.3.2 Captação de glutamato em diferentes temperaturas**

Seguindo o mesmo procedimento do item 3.1, se estabeleceu três grupos de tratamento. No primeiro grupo, os ensaios de captação de glu foram realizados a temperatura de 37°C. O segundo grupo foi exposto a uma temperatura não fisiológica (8 °C) e o terceiro grupo o ensaio de captação glutamatérgica foi realizada em um ambiente também não fisiológico (0 °C). Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **3.8.3.3 Ensaios de captação frente a um bloqueador do transporte de glutamato**

De acordo com mesmo procedimento do item 3.1, 3.8.1 e figura 5, foi feita uma curva de captação de glutamato frente a um antagonista do transportador GLAST, cloreto de zinco (ZnCl). As retinas foram incubadas em uma concentração de glu pré-estabelecida (160  $\mu\text{M}$ ) com variações nas

concentrações de cloreto de zinco ( $10^{-9}$  a  $10^{-3}$  M). Os ensaios foram feitos em triplicata.

### 3.9 Dosagem de proteína

A dosagem de proteína foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976). Este método consiste no seguinte fundamento, ocorre ligação do corante azul de Coomassie com grupos funcionais ou aromáticos das proteínas. A ligação ocorre em dois minutos e esta dura aproximadamente duas horas. Durante o processo, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em comprimento de onda de 595 nm.

Para a dosagem de proteína, separou-se em tubos de 1,5 mL, homogeneizado de 100  $\mu$ L de amostra de tecido em água destilada, a seguir acrescentou-se 100  $\mu$ L de hidróxido de sódio (NaOH) 1N e completados 500  $\mu$ L com água destilada. Para analisar estas amostras, colocou-se, em tubos de ensaio, 50  $\mu$ L destas e adicionou-se 150  $\mu$ L de água destilada. Após isto, adicionou-se 2 mL do reativo de Bradford e deixou-se reagir por dois minutos. De três em três tubos, foram realizadas leituras no espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. Os valores foram obtidos pelo uso de uma curva pré-estabelecida com BSA (albumina sérica bovina) e reativo.

### 3.10 Análises estatísticas

Para a avaliação estatística, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey do programa BIOESTAT 5.0 (\*  $p < 0,05$ ).

Com o auxílio do programa GraphPad Prism, V4.0, a análise de regressão não-linear foi utilizada para determinar as constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Validação do método para quantificar glutamato.

#### 4.1.1 Tempo de retenção

O tempo de retenção dos aminoácidos glu e padrão interno nas condições cromatográficas padronizadas foram de 11 minutos e 14,8 minutos, respectivamente, como demonstrados na Figura 06.

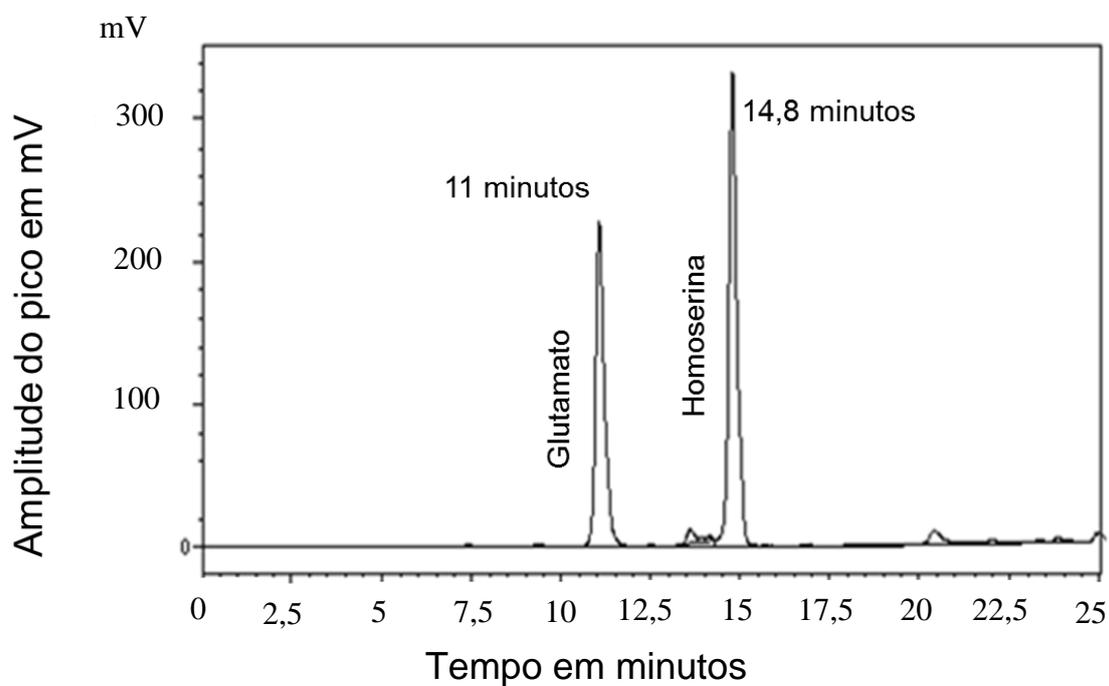


Figura 06: Tempo de retenção do glu e hom nas condições cromatográficas estabelecidas. Amplitude do pico expressa em volts.

### 4.1.2 Linearidade

Utilizando-se as soluções de trabalho observou-se que a resposta do detector foi diretamente proporcional as concentrações de glu de 0,1 µg/mL a 20 µg/mL, com equação da reta  $y = 0,128x + 0,097$  e coeficiente de correlação igual a 0,998. Resultados mostrados na tabela 3. Os valores calculados foram feitos a partir da relação de área do pico, do aminoácido glu e de hom.

Tabela 3: Parâmetros da curva de linearidade. A resposta do detector foi diretamente proporcional nas concentrações do glu de 0,1 µg/mL a 20 µg/mL.

	Coeficiente de correlação	Equação
<u>Glutamato</u>	0,998	$y = 0,128x + 0,097$
Padrão interno		

### 4.1.3 Curva de calibração

A curva de calibração foi realizada a partir das soluções de calibração contendo glu nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µg/mL, posteriormente as relações de área do pico do glu e do padrão interno, foram calculados e projetados no eixo das ordenadas e as concentrações no eixo das abscissas. Curva apresentada na figura 07. Os valores do coeficiente de correlação para a curva de calibração foi de 0,995 e equação da reta  $y = 0,125x + 0,136$ , como mostrado na tabela 4.

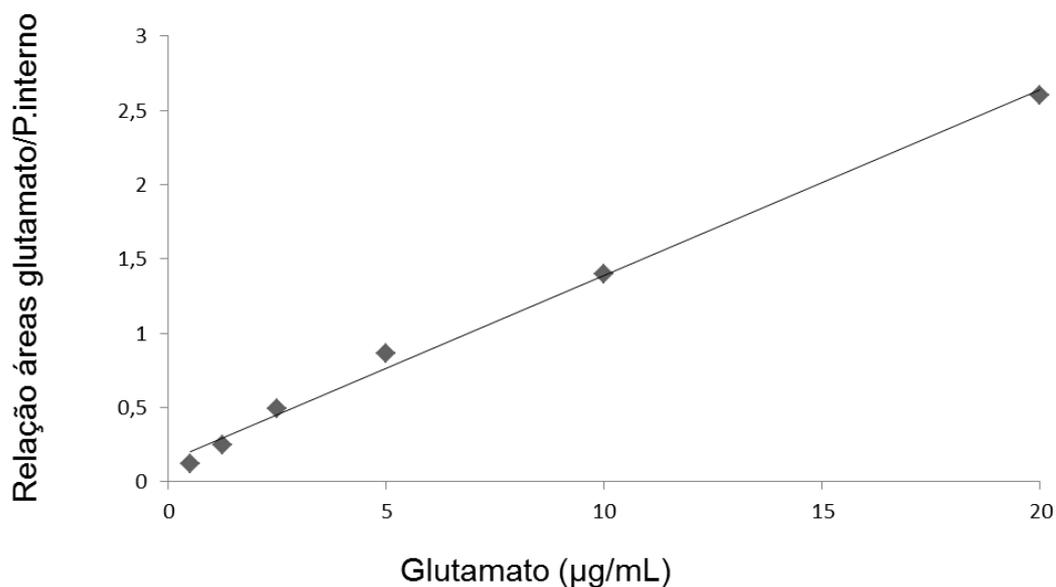


Figura 07: Curva de calibração em solução de Hank. As concentrações variaram de 0,5 a 20 µg/ml. No eixo das ordenadas a relação de área do pico dos padrões de glu e padrão interno e nas abscissas as diferentes concentrações de glu.

Tabela 4: parâmetros da curva de calibração em solução de Hank, com respectivos coeficientes de variação e equação da reta

	Coeficiente de correlação	Equação
Glutamato	0,995	$y = 0,125 + 0,136x$
Padrão interno		

#### 4.1.4 Limites de detecção e quantificação

O LD do método foi determinado depois de sucessivas injeções de soluções de trabalho de glu (0,5 µg/mL) e as posteriores injeções com concentrações inferiores a esta. O resultado para o LD foi de 0,025 µg/mL, com um coeficiente de variação de 27%. O LQ foi determinado a partir de soluções de calibração diluídas contendo glu nas concentrações de 0,5; 0,1 e 0,025 µg/mL. O valor para o LQ do método foi de 0,1 µg/mL com coeficiente de variação de 7% e desvio padrão de 0,0099. Os valores estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) com respectivos coeficientes de variações (CV%).

	<b>LD</b>	<b>(CV%)</b>	<b>LQ</b>	<b>(CV%)</b>
<b>Glutamato</b>	<b>0,025 µg/mL</b>	<b>27 %</b>	<b>0,1 µg/mL</b>	<b>7%</b>

#### 4.1.5 Exatidão

Os valores de exatidão intra e interensaios do método obtidos a partir das soluções controle de glu foram determinados pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, valores expressos em percentagem mostrados na tabela 6. Os ensaios foram feitos em quintuplicata durante três dias consecutivos.

#### 4.1.6 Precisão

As soluções controle de glu também foram empregadas para obtenção dos valores da precisão intra e interensaios do método. A precisão foi determinada pelo coeficiente de variação mostrado na tabela 6. Os ensaios foram feitos em quintuplicata durante três dias consecutivos.

Tabela 6: Valores da precisão e exatidão intraensaio e interensaio em três concentrações (baixa, média e alta). Os valores da precisão foram expressos pelo coeficiente de variação (C.V) e a exatidão foi calculada pela razão da média da concentração determinada pelo método e a concentração teórica, multiplicado por 100 (cem). n = número de determinações.

Glutamato µg/mL	Precisão (C.V%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia n=5	Inter-dia n=15	intra-dia	inter-dia
1	5,2	4,5	102	107
10	8,8	3,2	97,6	98,3
20	6,1	4,1	98	98,8

#### 4.1.7 Recuperação

A recuperação do método foi determinada a partir de soluções controle de glu em três diferentes concentrações, baixa, média e alta (1, 10 e 20 µg/mL, respectivamente) após serem expostas a processos de tratamento conforme mostrado na figura 5. Os resultados da recuperação do método são apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Valores obtidos referentes aos ensaios de recuperação do método utilizado. A recuperação foi determinada após serem feitas comparações entre as amostras que não foram tratadas e as que foram tratadas. O coeficiente de variação também foi determinado. n = número de determinações.

<b>Glutamato µg/mL</b>	<b>n</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Coeficiente de variação (%)</b>
<b>1</b>	<b>6</b>	<b>99,2</b>	<b>4,19</b>
<b>10</b>	<b>6</b>	<b>99,8</b>	<b>6,76</b>
<b>20</b>	<b>6</b>	<b>99,6</b>	<b>4,88</b>

#### **4.2 Curso temporal de captação de glu na retina**

A captação de glu ocorreu em diferentes intervalos de tempo. Do tempo inicial 0' (zero minutos) até o intervalo de 5' (cinco minutos), notou-se diminuição da concentração extracelular de glu em torno de 60%. Posteriormente, foi analisada sua concentração em um período de 10' (minutos), quando a captação alcançou seu nível máximo (20 nmol/mg de proteína), seguindo a partir de então uma saturação da captação nos intervalos de tempo de 15', 20', 25' e 30', respectivamente (Figura 08).

#### **4.3 Cinética de captação de glu na retina**

Os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  para o transporte de glu no tecido nervoso foram 8,2 e 9,85 nmol/mg proteína/minuto, respectivamente, resultados mostrados na figura 09.

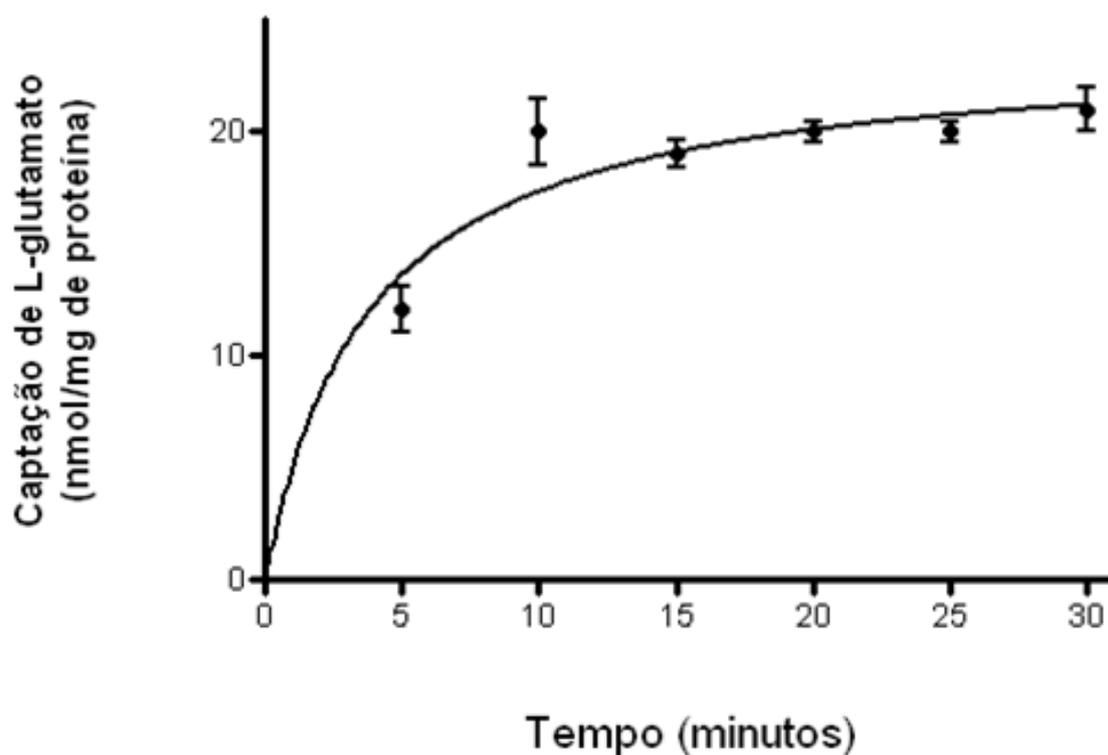


Figura 08: Curva de captação de glu no tecido retiniano a uma concentração de 50  $\mu$ M em diferentes tempos (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30, minutos). Houve diferença estatística entre o tempo 5 e os demais grupos (\* $P < 0,01$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos a partir de 10 minutos. Ensaios realizados em triplicata.

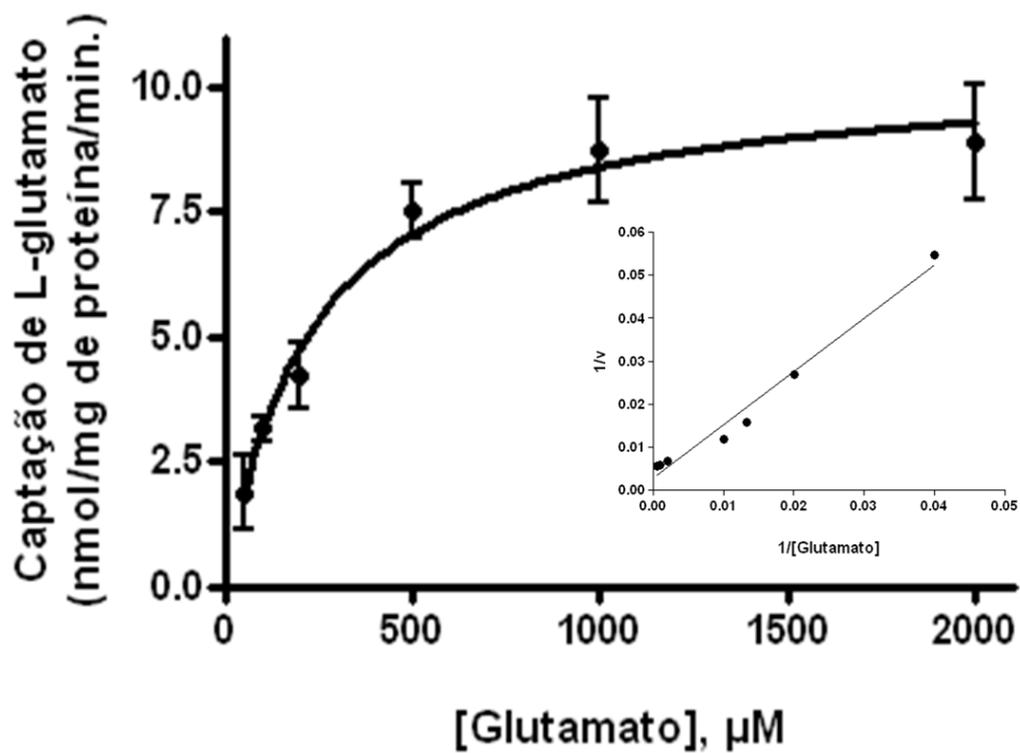


Figura 09: Cinética de captação de glu no tecido nervoso no tempo de dez minutos. Os valores calculados do  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram de 8,2 e 9,85 nmol/mg proteína/minuto, respectivamente. Posteriormente a curva foi transformada para Lineweaver-Burk. Ensaios realizados em triplicata.

## 4.4 Aplicabilidades do método

### 4.4.1 Captação de glu em função do Na<sup>+</sup>

Avaliou-se a captação de glu utilizando-se a concentração de 160  $\mu\text{M}$  em um meio contendo NaCl e outro LiCl após dez minutos de incubação. Os resultados indicam que houve diminuição de captação de aproximadamente 50 % em relação ao controle (solução de Hank com NaCl), quando os tecidos retinianos foram incubados com glutamato em solução de Hank contendo LiCl. Os valores são mostrados na figura 10.

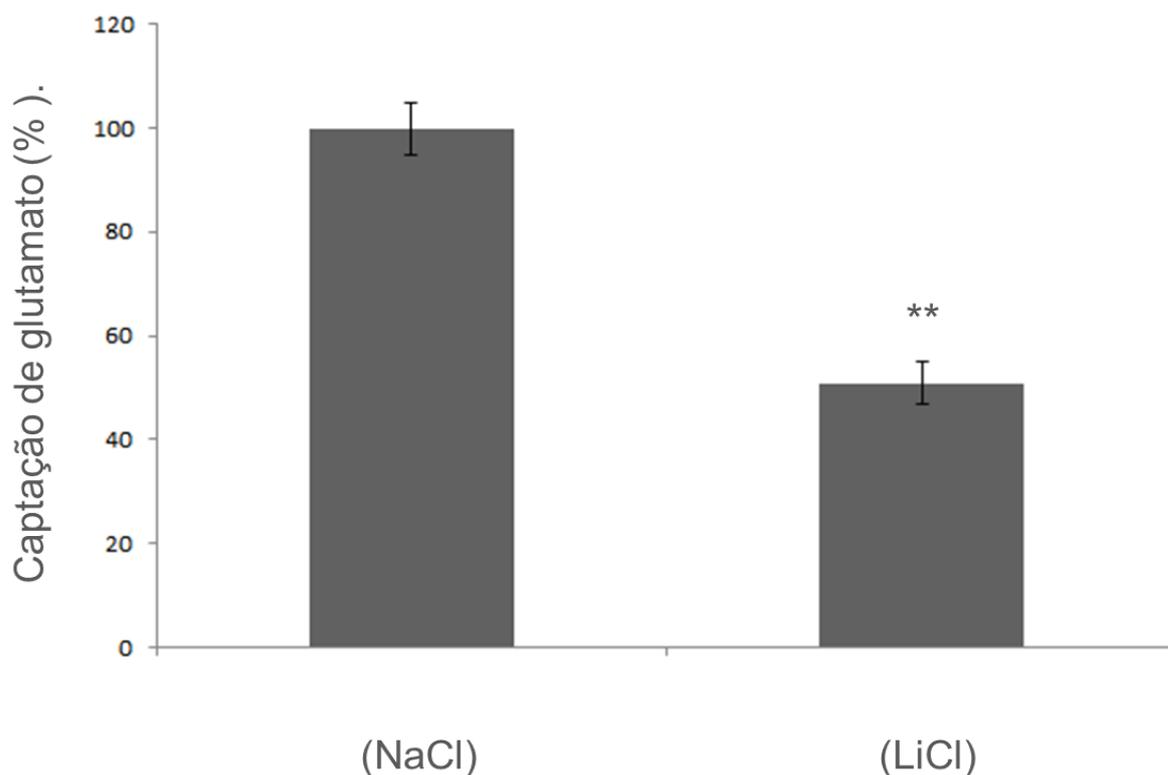


Figura 10: Captação de glu considerando a presença do NaCl. A captação de glu reduziu à aproximadamente 50% quando o tecido foi incubado com glu em solução de Hank livre de NaCl. Ensaios realizados em triplicata. \*\*p < 0,01 (teste Tukey).

#### 4.4.2 Captação de glu em diferentes temperaturas

Os tecidos retinianos incubados em diferentes temperaturas (37°, 8° e 0°C) foram expostos a concentração de glu a 160 µM durante um período de dez minutos. Os valores da captação de glu na temperatura fisiológica de 37 °C indicam o controle e as temperaturas de incubação de 8 e 0, °C, a modulação da captação dependente de temperatura. Os resultados indicaram que ocorreu diminuição da captação de glu conforme menor a temperatura. Os dados estão dispostos na figura 11.

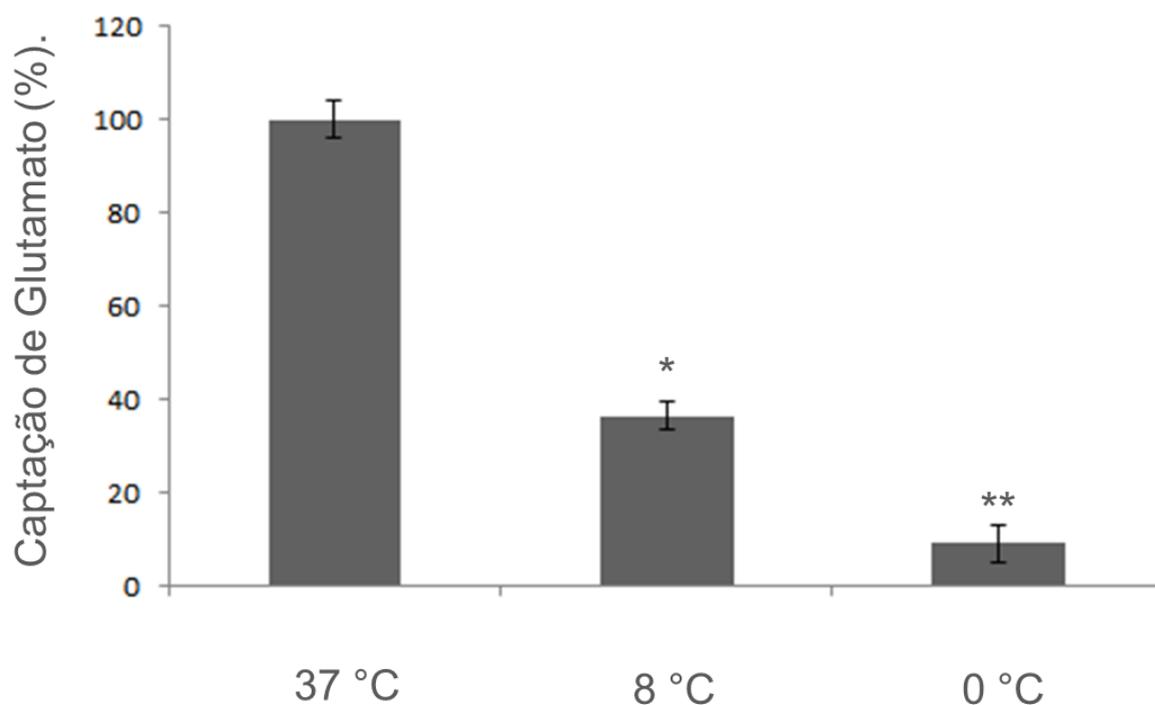


Figura 11: Captação de glu em diferentes temperaturas: 37°, 8° e 4, °C. Os valores obtidos foram redução de mais 50%, e de aproximadamente 90% nas temperaturas de 8 e 0 °C, respectivamente, em relação ao controle. Ensaio foram realizados em triplicata. \*p < 0,05 (ANOVA, teste Tukey).

#### 4.4.3 Modulação da captação de glu por ZnCl

Efetuiu-se a modulação da captação de glu nas diferentes concentrações ( $10^{-9}$ - $10^{-3}$  Molar) de cloreto de zinco (ZnCl). Coincubou-se as retinas com glu na concentração de  $160 \mu\text{M}$  nas diferentes concentrações de ZnCl durante um período de dez minutos. ZnCl nas concentrações de  $10^{-9}$  à  $10^{-7}$  inibiu a captação de glu em aproximadamente 10%, na concentração de  $10^{-6}$  inibiu cerca de 30%, e de  $10^{-5}$  à  $10^{-3}$  a inibição foi acima de 50%. Os dados estão demonstrados na figura 12.

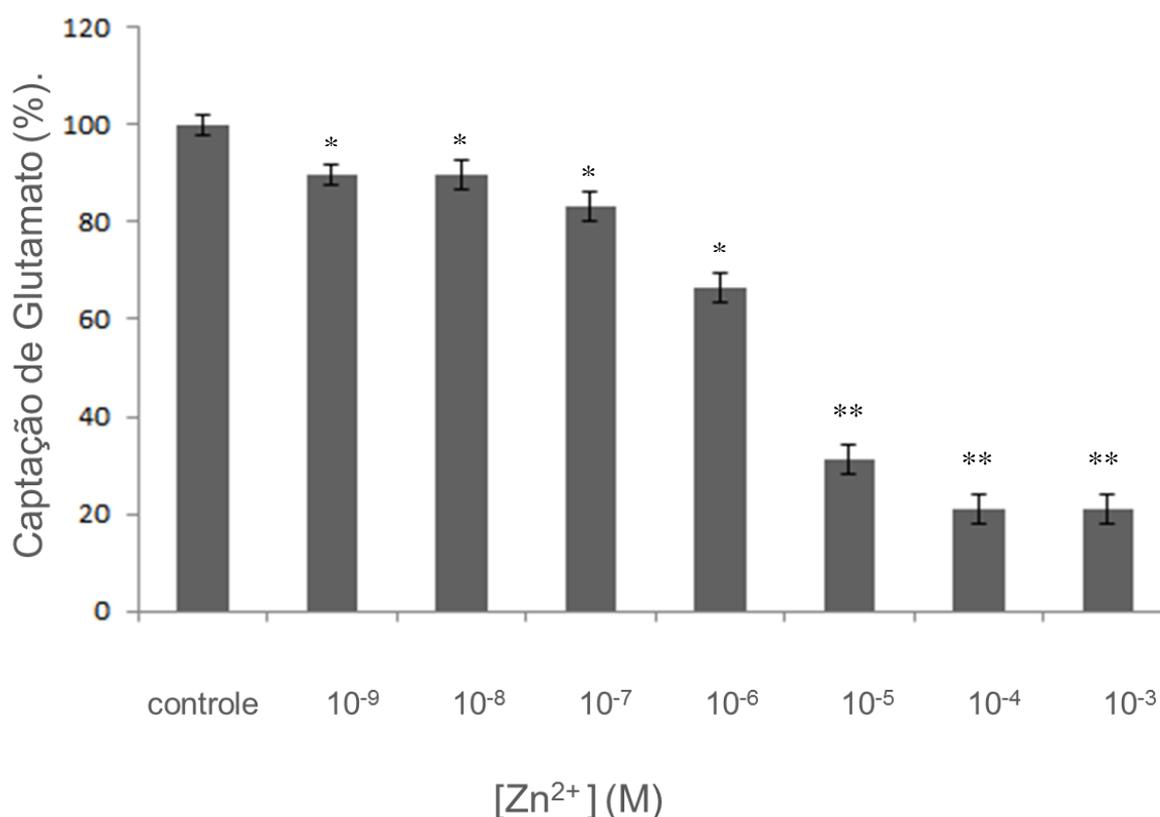


Figura 12: Modulação da captação de glu em diferentes concentrações de ZnCl ( $10^{-9}$ - $10^{-3}$  Molar). A concentração de glu utilizada foi de  $160 \mu\text{M}$  durante um tempo de incubação de dez minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata. \* $p < 0,05$  (ANOVA, Teste Tukey).

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo descreve uma metodologia alternativa utilizando CLAE acoplado a um detector de fluorescência para a determinação dos parâmetros cinéticos da captação de glu no SNC. A técnica de CLAE tem sido amplamente utilizada para determinação da concentração de glu com altos níveis de sensibilidade em diferentes tecidos (CLARKE *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009; WATSON *et al.*, 2006; ZHANGA *et al.*, 2003). No entanto, poucos métodos, seja de natureza semiquantitativa ou quantitativa, foram desenvolvidos para avaliar a captação deste neurotransmissor.

De fato, registros da literatura mostraram que dentre as técnicas utilizadas destacam-se patch clamp (MIM *et al.*, 2005), utilização de biossensores (MCLAMORE *et al.*, 2010), e na maioria dos estudos radiomarcção (TUNNICLIFF, 1975). Neste trabalho, foi proposto um protocolo analítico inovador para a determinação de parâmetros da captação de glu utilizando o tecido retiniano de aves como modelo experimental.

A metodologia apresentada difere dos inúmeros protocolos da literatura pelo fato de não utilizar procedimentos que envolvam avaliação do glu no ambiente intracelular ou utilização de radionuclídeos. Em relação aos protocolos que quantificam os níveis de glu no ambiente intracelular no SNC, uma limitação técnica importante é passível de discussão, isto porque o glu é rapidamente metabolizado a glutamina pelas células da glia, também é utilizado para produção de GSH, além de servir como substrato para diversas vias bioquímicas que o utilizam como combustível para o metabolismo oxidativo. Estes eventos não permitem uma quantificação precisa de glu transportado para a célula, e podem influenciar na caracterização do transporte do neurotransmissor (BRINGMANN *et al.*, 2009).

Os métodos que utilizam compostos marcados radioativamente geralmente são passivos de perda de informações, principalmente pelo fenômeno de radiólise, o qual se caracteriza pela degradação do analito em virtude da quebra das ligações químicas de sua estrutura pela excessiva atividade radioativa do isótopo que confere marcação, ou ao fenômeno

*quenching*, que está associado à diminuição da detecção da atividade radioativa, ou pelo decaimento do radioisótopo, ou por impedâncias no meio de análise. Trabalhos anteriores demonstram que estes fenômenos físicos reduzem significativamente a sensibilidade dos experimentos que envolvem compostos radiomarcados estocados por longos períodos (GUINN, 1964; NASCIMENTO FILHO, 1977).

Além disso, a manipulação destes tipos de compostos radioativos aumenta as chances de contaminação do ambiente de trabalho e conseqüentemente a saúde humana, uma vez que alguns isótopos tem meia vida longa, a exemplo do *trítio* ( $H^3$ ) que tem meia vida de 12 anos (BROWN; BADMAN, 1960; GUINN, 1964; NASCIMENTO FILHO, 1977).

Métodos alternativos e sensíveis capazes de caracterizar pequenas alterações no transporte de glu no SNC são essenciais para pesquisas em neurociências, uma vez que este neurotransmissor representa importante mediador da toxicidade no SNC, incluindo a retina (DAY *et al*, 2006; KALLONIATIS; NAPPER, 1996; SUEMORI *et al*, 2006). De fato, vários trabalhos descreveram que a família dos transportadores de alta afinidade  $Na^+$ -dependentes estão envolvidos na regulação das concentrações extracelulares de glu abaixo dos níveis excitotóxicos (AMARA; FONTANA, 2002; O'SHEA, 2002;).

Somado a isto, estudos neuroquímicos têm fornecido evidências que diversos eventos relacionados ao desenvolvimento do SNC são associados a tênues mudanças na atividade dos transportadores glutamatérgicos (DANBOLT, 2001; NORTHINGTON *et al*, 1999). A retina é uma extensão do SNC e demonstra fisiologia e citoarquitetura privilegiada para estudos relacionados aos sistemas de neurotransmissão. Estudos clássicos demonstram que este tecido representa uma estrutura com organização e fisiologia bastante conservadas entre os vertebrados, neste contexto, a utilização de retina aviária como modelo de estudo pode gerar informações relevantes sobre o funcionamento do SNC de mamíferos, incluindo o homem (BELECKY-ADAMS *et al*, 2008; KANEKO, 1979; RAUEN *et al*, 1996).

No que tange ao transporte de glu, assim como na de mamíferos, a retina aviária expressa os principais transportadores glutamatérgicos, o que

justifica a utilização deste modelo em tal estudo (BELECKY-ADAMS *et al.*, 2008; HARADA *et al.*, 1998; RAUEN *et al.*, 1996; SULLIVAN *et al.*, 2006).

É importante destacar que no protocolo experimental deste trabalho, a matriz de análise foi à solução de incubação do tecido retiniano. Sendo assim, no procedimento experimental, o tecido é exposto a uma concentração conhecida de glu, e os níveis do neurotransmissor no meio de incubação são quantificados por CLAE após determinados períodos de incubação. Pelo fato do glu não ser degradado no ambiente extracelular (BALCAR; JOHNSTON, 1972), a redução da concentração de glu no meio observado foi atribuída ao influxo mediado por transportadores do glu presente na membrana das células retinianas.

Silva *et al.*, (2009) demonstraram que a CLAE acoplada a detecção por fluorescência é uma técnica eficiente para a determinação de altas concentrações de glu nas diferentes áreas do SNC. Embora esta metodologia represente um ensaio interessante para medições de glu no tecido, alterações na captação deste são primeiramente identificadas na faixa micromolar, que cria a necessidade de um ensaio que permita a exata medição de pequenas diferenças nas concentrações deste neurotransmissor (MCLAMORE *et al.*, 2010).

De acordo com as recomendações vigentes estabelecidas pela ANVISA-Brasil foram executados antes das avaliações quantitativas os seguintes parâmetros: tempo de retenção, curva de linearidade, curva de calibração, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e ensaios de recuperação. Esse processo caracterizado como validação do método respaldou a quantificação analítica deste trabalho.

Após serem estabelecidas as condições cromatográficas a partir de Silva *et al.*, (2009), porém otimizadas de acordo com as necessidades deste protocolo, os resultados referentes ao tempo de retenção dos padrões de aminoácido glu e do padrão interno homoserina, injetados no cromatógrafo líquido nas concentrações de 10,0 µg/mL e 6,0 µg/mL, respectivamente, apresentaram um cromatograma com picos de alta resolução e sem interferentes a eluição no tempo de vinte e cinco minutos, absolutamente livre de ruídos interferentes significativos da linha de base. A homoserina foi empregada como padrão interno para minimizar eventuais variabilidade da

amostra em decorrência dos procedimentos de preparação e derivatização (BAGLEY; MOGHADDAM, 1997; RAJ *et al.*, 2001).

Na avaliação da correlação entre a resposta do detector e a concentração do analito, tanto nas análises de linearidade quanto da curva de calibração, os resultados demonstraram resposta linear do sistema. Os valores dos coeficientes de correlação da linearidade e curva de calibração foram de 0,998 e 0,995, respectivamente. Isto demonstra resultados aceitáveis e bem acima dos valores mínimos toleráveis determinados pela ANVISA-Brasil, no intervalo de concentrações de 0,1 µg/mL a 20,0 µg/mL.

O LD e LQ obtidos neste trabalho foram de 0,025 µg/mL e 0,1 µg/mL, respectivamente. A ANVISA-Brasil estipula valores toleráveis para o coeficiente de variação, que é uma medida relativa de dispersão, útil para a comparação em termos relativos do grau de concentração em torno da média, de igual ou inferior a 10 % para LQ. Os dados aqui apresentados para LD e LQ foram de 27% e 7%, respectivamente. A concentração obtida para o LD foi três vezes maior que o ruído da linha de base e o CV obtido para LQ foi abaixo do critério usual estipulado.

Para o estudo da precisão inter e intraensaios desta metodologia apresentadas na tabela 5, os valores do CV, que deverão ser iguais ou menores que 15 % (Anvisa-Brasil), foram satisfatórios nos intervalos das concentrações analisadas. Indicando que o método foi preciso.

A exatidão do método inter e intraensaios foram avaliados pela porcentagem da relação da concentração obtida pela concentração teórica. A ANVISA-Brasil determina que estes valores não ultrapassem 15 % do valor nominal. Neste estudo os resultados referentes à exatidão do método, apresentados na tabela 5, foram considerados aceitáveis.

Além disso, as condições cromatográficas mostraram elevado nível de recuperação (acima de 99%; tabela 6) na faixa micromolar que é semelhante ao descrito em trabalhos anteriores (CLARKE *et al.*, 2007; ZHANGA *et al.*, 2003). Estes dados estão próximos do valor de 100 % devido a determinação indireta da captação de glu (com base sobre o consumo de glutamato extracelular) não ser influenciada por distúrbios do metabolismo celular como frisado anteriormente, bem como pelo fato de não sofrer perda da amostra que geralmente ocorre devido a processos de separação e extração do analito.

Antes da determinação dos parâmetros cinéticos da captação de glu no tecido nervoso, se fez necessário normatizar um tempo de incubação, o qual seria utilizado como tempo padrão de referência para todos os experimentos de captação. Os dados apresentados após curva tempo-dependente (5', 10', 15', 20', 25' e 30') indicaram que o tempo em que houve maior captação de glu foi de dez minutos, corroborando com o tempo de incubação utilizado por Tunnicliff 1975 e Ward *et al.*, (2005) em seus experimentos.

Sobre os parâmetros cinéticos, obteve-se valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  (8,2 e 9,8 nmol/ mg proteína / minuto, respectivamente) de acordo com os descrito em estudos anteriores realizados em diferentes áreas do sistema nervoso central, (BERETTA *et al.*, 2004; GEGELASHVILI; SCHOUSBOE, 1998; PALMADA; CENTELLES, 1998; SCHOUSBOE; DIVAC, 1979). Estas determinações são importantes para a compreensão do comportamento do transportador diante das concentrações de glu na fenda sináptica, as quais são minunciosamente reguladas (DANBOLT, 2002).

Após ter sido rigorosamente validado seguindo as normas técnicas obrigatórias para determinações analíticas e ser caracterizado os parâmetros cinéticos de captação de glu, este estudo também avaliou determinações aplicáveis de acordo com trabalhos prévios.

Na literatura se evidenciam dois sistemas distintos de transporte de glutamato, sendo um  $Na^+$ -dependente (PALACIN *et al.*, 1998; YASUSHI *et al.*, 2004) e outro dependente de cloreto e  $Na^+$ -independente (BANNAI, 1986; SATO *et al.*, 2002); avaliou-se a participação dos distintos sistemas pelo método proposto neste trabalho. Nota-se que os valores apresentados (112  $\mu M$  de captação para o sistema contendo  $Na^+$ , e 55  $\mu M$  de captação para o sistema sem  $Na^+$ ) estão de acordo com os resultados apresentados por Oliveira, *et al.*, (2010), ou seja, uma redução de cerca de 50% da captação de glu num sistema livre de  $Na^+$  (\*p < 0,05).

Outro fato relevante foi a observação da captação de glu frente a variações de temperatura. Sabe-se que a captação deste neurotransmissor é afetada por tal oscilação (TUNNICLIFF, 1975), então para demonstrar que o protocolo proposto reproduzia a quantificação analítica com alta sensibilidade e precisão tal fenômeno, foram realizados ensaios de captação de glu em três diferentes temperaturas. Os experimentos mostraram claramente que ao

incubar o tecido nervoso a 37°, 8° e 0°, °C, os valores de captação foram de 42,5; 24,8 e 4  $\mu\text{M}$  (\*p < 0,05), respectivamente. Portanto, a captação temperatura-dependente foi caracterizada por este método.

Para ratificar se a aplicabilidade deste estudo continuava sendo eficaz, optou-se por executar a modulação da captação de glu com inibidores farmacológicos específicos de seu transporte. Ao se utilizar cloreto de zinco (ZnCl), os resultados observados destacaram modulação da captação de glu dependente de concentração de ZnCl. Os dados expressos em percentagem do controle indicaram que os grupos incubados com concentrações do bloqueador variando entre  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  molar, reduziram a captação de glu (\*p < 0,05 ANOVA, e Teste Tukey), enquanto que os grupos com concentrações que variaram de  $10^{-5}$ - $10^{-3}$  molar diminuíram a captação com nível de significância de \*p < 0,01 (ANOVA, e Teste Tukey).

A modulação da captação de glu por este agente bloqueador pode ocorrer de duas maneiras: pela conjugação do ZnCl com o glu ou pela inibição da captação de glu via GLAST pelo ZnCl, segundo descrito por Spiridon *et al.*, (1998), este dado corrobora com os mostrados nas condições experimentais descritas por Gabrielsson *et al.*, (1986) os quais determinam que altas doses de zinco bloqueia a captação de glu, bem como aqueles demonstrados por Spiridon *et al.*, (1998), os quais determinaram o transporte de glu modulados por ZnCl.

Todos os parâmetros aqui analisados ressaltam claramente a aplicabilidade eficiente deste protocolo para estudos em neurociências, além de ser proposta uma metodologia simples e eficiente com alta sensibilidade para a quantificação da captação de glu no SNC determinada por CLAE. Esta abordagem se torna uma ferramenta importante para estudos associados à caracterização de alterações em escala de minutos no transporte de glutamato em situações fisiológicas, bem como relacionados com injúrias no SNC.

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a quantificação de glu no tecido retiniano pelo cálculo da diferença entre a concentração inicial e final na matriz de análise, foi bem estabelecida, pois:

A validação dos parâmetros analíticos para determinação de glu por CLAE demonstrou ser um método reprodutível e satisfatório, atendendo as normas estabelecidas pela ANVISA;

Foi estabelecido um tempo padrão de referência para avaliar a captação de glu em tecido nervoso;

Foi caracterizada a cinética de captação de glu no tecido nervoso;

A modulação do transporte de glu por bloqueadores específicos demonstrou aplicabilidade satisfatória.

## REFERÊNCIAS

ALFREDSSON, G., WIESEL, F.A., LINDBERG, M. Glutamate and glutamine in cerebrospinal fluid and serum from healthy volunteers-analytical aspects. **J. Chromatogr**, 378-384. 1988.

AMARA, S.G., FONTANA, A.C.K. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. **Neurochemistry International** 41, 313–318. 2002.

AMBATI, J., CHALAM, K.V., CHAWLA, D.K., D'ANGIO, C.T., GUILLET, E.G., ROSE, S.J., VANDERLINDE, R.E., AMBATI, B.K. Elevated g-aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. **Arch. Ophthalmol.** 115, 1161–1166. 1997.

ARRIZA J.L., ELIASOF S., KAVANAUGH M.P., AMARA S.G. **Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 4155-4160. 1997.

BAGLEY, J., MOGHADDAM, B. Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects of pretreatment with saline or diazepam. **Neuroscience** 77, 65–73, 1997.

BALCAR, V.J., JOHNSTON, G.A.R. The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. **J. Neurochem.**, 2657–2666. 1972.

BARNSTABLE, C.J. Glutamate and GABA in retinal circuitry. **Curr. Opin. Neurobiol**, 657 – 662. 1993.

BELECKY-ADAMS T.L., HAYNES T., WILSON J.M., RIO-TSONIS K.D. **The chick as a model for retina development and regeneration.** In Tsonis PA, editor. Animal models in eye research. Academic Press: Amsterdam, 102-19. 2008.

BITTIGAU, P., IKONOMIDOU, C., Glutamate in neurologic diseases. **J. Child Neurol.** 471–485. 1997.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal Biochem.** 248-254. 1976.

BRASIL. ANVISA. **Agência nacional de vigilância sanitária.** Resolução RE Nº 899, DE 29/05/2003.

BROWN, W.O., BADMAN, H. G. Liquid-scintillation counting of <sup>14</sup>C-labelled animal tissues at high efficiency. **Biochem. J.** 78, 571. 1961.

BURMEISTER, J.J., GERHARDT, G.A. Self referencing ceramic based multisite microelectrodes for the detection and elimination of interferences from the measurement of l-glutamate and other analytes. **Anal Chem.** 1037–42. 2001

CENTURIÃO, F.B., CORTE, C.L.D., PAIXÃO, M.W., BRAGA, A.L., ZENI, G., EMANUELLI, T., ROCHA, J.B.T. Effect of ebselen and organochalcogenides on excitotoxicity induced by glutamate in isolated chick retina. **Brain Research** 146–152. 2004.

CHEN, A., LUNTE, C.E. Microdialysis sampling coupled on-line to fast microbore liquid chromatography. **J Chromatogr. A.** 29–35. 1995.

CHOI, D.W. Calcium - mediated neurotoxicity e diseases of the nervon system. **Neuron.** 623 – 634. 1988.

COLLINS, C.H., BRAGA, G., BONATO, P. **Fundamentos de cromatografia.** Editora Unicamp. Volume 1º, 465p, 2006.

COPENHAGEN, D.R., JAHR, C.E. Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors. **Nature.** 536–543. 1989.

DANBOLT, C.N. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.** 1–105. 2001.

DANBOLT, C.N. CHAUDHRY, F.A., DEHNES, Y., LEHRE, K.P., LEVY, L.M., ULLENSVANG, K., STORM-MATHISEN, J. Properties and localization of glutamate transporters. **Prog. Brain Res.** 116, 23–43. 1998.

DAY, B. K., POMERLEAU, F., BURMEISTER, J. J., HUETTL, P., GERHARDT, G. A., Microelectrode array studies of basal and potassium-evoked release of L-

glutamate in the anesthetized rat brain. **Journal of Neurochemistry**. 1626–1635. 2006.

DEHNES, Y., CHAUDHRY, F.A., ULLENSVANG, K., LEHRE, K.P., STORM-MATHISEN, J., DANBOLT, N.C. The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. **J. Neurosci**. 3606–3619. 1998.

DEUTH, A. Y., M.J., BLOOM, F.E., LANDIS, S.C., ROBERTS, J.L. & SQUIRE, L.R. **Neurotransmitter**. Em: fundamental neuroscience, eds. Zigmond Academic press. San Diego. 1999.

DEUTSCH, S.I., MASTROPAOLO, J., ROSSE, R.B. Neurodevelopmental consequences of early exposure to phencyclidine and related drugs. **Clin. Neuropharmacol**. 320–332. 1998.

DEVALL, A.J., BLAKE, R., LANGMAN, N., SMITH, C.G.S., RICHARDS, D.A., WHITEHEAD, K.J. Monolithic column-based reversed-phase liquid chromatography separation for amino acid assay in microdialysates and cerebral spinal fluid. *J Chromatogr B*. 848 (2):323–8. 2007.

EIJSDEN, P.V., BEHAR, K.L., MASON, G.F., BRAUN, K.P.J., GRAAF, R.A. In Vivo neurochemical profiling of rat brain by  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy: cerebral energetics and glutamatergic/GABAergic neurotransmission. **Journal of Neurochemistry**. 24–33. 2010.

ELIASOF, S., WERBLIN, F. Characterization of the glutamate transporter in retinal cones of the tiger salamander. **J. Neurosci**. 402–411. 1993.

ERECIŃSKA M., SILVER I.A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. **Prog. Neurobiol**. 245–296. 1990.

FURUTA, A.; ROTHSTEIN, J.D.; MARTIN, L.J. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. **J Neurosci**. 83, 63-75. 1997.

GABRIELSSON, B., ROBSON, T., NORRIS, D., CHUNG, S. H. Effects of divalent metal ions on the uptake of glutamate and GABA from synaptosomal fractions. **Brain Research** 384, 218–223. 1986.

GADEA, A., LÓPEZ, E., LÓPEZ-COLOMÉ, A.M. Glutamate-Induced Inhibition of D-Aspartate Uptake in Müller Glia from the Retina. **Neurochemical Research**.273–279.1999.

GAGLIARDI, R.J. **Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists**. Arquivos de Neuro-Psiquiatria.583–8.2000.

GOLDSMITH, R. F., E.A.R.L, J.W., CUNNINGHAM, A.M. Determination of  $\gamma$ -Aminobutyric acid and other amino acids in cerebrospinal fluid of pediatric patients by reversed-phase liquid chromatography. **Clin. Chem**. 1736-1740. 1987.

GOLAN, D.E., TASHJIAN, A.H., ARMSTRONG, E.J. **Princípios de farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia**. Editora Guanabara Koogan. Segundaedição, 887p, 2009.

GRONLI, J., FISKE, E., MURISON, R., BJORVATN, B., SORENSEN, E., URSIN, R. Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats. A microdialysis study in an animal model of depression. **Behav Brain Res**. 42–51. 2007.

HAMBURGER, V. HAMILTON, H.L. "A series of normal stages in the development of the chick embryo". **J. Morph**.49–92. 1951.

HARRIS, R.K. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy - **A Physicochemical View**. Longman Scientific & Technical -Essex –England. 1993.

HARRIS, M.E., CARNEY, J.M., COLE, P.S., HENSLEY, K., HOWARD, B.J.,MARTIN, L., BUMMER, P., WANG, Y.N., PEDIGO, N.W., BUTTERFIELD, D.A. Beta-amyloid peptide-derived, oxygen-dependent freeradicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implicationsfor Alzheimer's disease. **Neuroreport** 6, 1875–1879.1995.

HUME, R.I., ROLE, L.W., FISCHBACH,G.D. Acetylcholine release from growth cones detected with patches of acetylcholine receptor-rich membranes. **Nature**.305:632–4. 1983.

IKONOMIDOU, C., MOSINGER, J.L., SALLES, K.S., LABRUYERE, J., OLNEY, J.W. Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric ischemic damage

parallels sensitivity to N-methyl-aspartate neurotoxicity. **J. Neurosci.** 2809–2818. 1989.

IZUMI, Y., KIRBY, C.O., BENZ, A.M., OLNEY, J.W., ZORUMSKI, C.F. Müller cellswelling, glutamate uptake, and excitotoxic neurodegeneration in the isolated rat retina. **Glia** 25, 379–389. 1999.

KANAI, Y., HEDIGER, M.A., Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. **Nature**. 467–471. 1992.

KANAI, Y., STELZNER, M., NUSSBERGER, S., KHAWAJA, S., HEBERT, S.C., SMITH, C.P., HEDIGER, M.A. The neuronal and epithelial human high affinity glutamate transporter — insights into structure and mechanism of transport. **J. Biol. Chem.** 20599–20606. 1994.

KATO, S., NEGISHI, K., MAWATARI, K., KUO, C.H. A mechanism for glutamate toxicity in the C6 glioma cells involving inhibition of cystine uptake leading to glutathione depletion. **Neuroscience**. 48(4):903–14. 1992.

KIM, S.C., VIRELLA, A., BRAUNBERG, R.C., ROSS, I.A., MATTHEWS, R.N., Kinetic analysis of glutamate transport by the miniswine choroid plexus in vitro. **Brain Research**. 59–64. 1996.

KOMURO, H., RAKIC, P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. **Science**. 95–97. 1993.

LAMANTIA, A.S. The usual suspects: GABA and glutamate may regulate proliferation in the neocortex. **Neuron**. 1223–1225. 1995.

LEHRE, K.P., DANBOLT, N.C. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. **J. Neurosci.** 8751–8757. 1998.

LIPTON, S.A., ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. **The New Eng J Med**. 613–622. 1994.

LIVESEY, F.J., CEPKO C. L. Vertebrate neural cell-fate determination: Lessons from the retina. **Nature Reviews Neuroscience**. 109–118. 2001.

LOGAN, W.J., SNYDER, S.H. High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissues. **Brain** 413–431. 1972.

MARAGAKIS, N.J., ROTHSTEIN, J.D. Mechanisms of disease: astrocytes in Neurodegenerative disease. **Nat. Clin. Pract Neurol.** 679-89. 2006.

MCDONALD, J.W., JOHNSTON, M.V. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. **Brain Res.** 41–70. 1990.

MCLAMORE, E.S., MOHANTY, S., SHI, J., CLAUSSEN, J., JEDLICKA, S.S., RICKUS, J.L., PORTERFIELD, D.M. A self-referencing glutamate biosensor for measuring real time neuronal glutamate flux. **Journal of Neuroscience Methods.** 14–22. 2010.

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

MONGE-ACUÑA, A.A., FORNAGUERA-TRÍAS, J.A. high performance liquid chromatography method with electrochemical detection of gamma-aminobutyric acid, glutamate and glutamine in rat brain homogenates. **Journal of Neuroscience Methods.** 176–181. 2009.

MONTIEL, T., CAMACHO, A., ESTRADA-SÁNCHEZ, A.M., MASSIEU, L. Differential effects of the substrate inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC) and the non-substrate inhibitor DL-threo-beta-benzyloxypartate (DL-TBOA) of glutamate transporters on neuronal damage and extracellular amino acid levels in rat brain in vivo. **Neurosci.** 667-78. 2005.

NASCIMENTO FILHO, V. F.: **Métodos de determinação de eficiência de detecção em cintilação líquida e efeito Cerenkov.** Boletim Didático nº020, 35 p., Piracicaba, SP, CENA.1977.

NASKAR, R., VORWERK, C.K., DREYER, E.B. Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 41, 1940–1944. 2000.

NEDERGAARD, M., TAKANO, T., HANSEN, A. J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. **Nature Rev. Neurosci.** 748-755, 2002.

NIWA, O., HORIUCHI, T., TORIMITSU, K. Continuous monitoring of l-glutamate released from cultured nerve cells by an online sensor coupled with microcapillary sampling. **Biosens Bioelectron.** 311–9. 1997.

NORTHINGTON, F.J., TRAYSTMAN, R.J., KOEHLER, R.C., MARTIN, L.J. GLT1, glial glutamate transporter, is transiently expressed in neurons and develops astrocyte specificity only after midgestation in the ovine fetal brain. **J. Neurobiol.** 39, 515–526. 1999.

NOWAK, J.Z. The isolated retina as a model of the CNS in pharmacology. **Trends pharm.** 80 – 82. 1988.

OCHIAI, H., HIGA, K., HISHIYAMA, N., HISAMATSU, S., FUJISE, H. Characterization of several amino acid transports and glutamine metabolism in MOLT4 human T4 leukemia cells. **Clin. Lab. Haem.** 399–404. 2006.

OLDENZIEL, W.H., VAN DER ZEYDEN, M., DIJKSTRA, G., GHIJSEN, W.E.J.M, KARST, H., CREMERS, T.I.H.F. Monitoring extracellular glutamate in hippocampal slices with a microsensor. **J Neurosci Methods** 160:37–44. 2007.

OLIVEIRA, K.R.M., HERCULANO, A.M., CRESPO-LÓPEZ, M.E., DO NASCIMENTO, J.L.M. Pharmacological characterization of glutamate Na<sup>+</sup>-independent transport in retinal cell cultures: Implications in the glutathione metabolism. **Neurochemistry International**, 59–66. 2010.

OLNEY, J.W. **Neurotoxicity of excitatory amino acids**. EM: Kainic acid as a tool in neurobiology. 1978.

OZAWA, S., KAMIYA, H., TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.** 581–618. 1998.

PALMADA, M., CENTELLES, J.J. Excitatory amino acid neurotransmission. pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. **Frontiers in Bioscience**, d701-718. 1998.

PERLOV E., PHILIPSEN A., HESSLINGER B., BUECHERT M., AHRENDTS J., FEIGE B. Reduced cingulate glutamate/glutamine-to-creatine ratios in adult patients with attention deficit/hyperactivity disorder—a magnet resonance spectroscopy study. **J Psychiatr.** 41:934–41. 2007.

PINES G, DANBOLT N.C., BJORAS M., ZHANG Y., BENDAHAN A., EIDE L., KOEPEL H., STORM-MATHISEN J., SEEBERG E., KANNER B.I. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. **Nature** 360, 464-467. 1992.

POW, D.V., BARNETT, N.L. Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. **Neurosci.Lett.** 280, 21–24, 2000.

RABACCHI, S., BAILLY, Y., DELHAYE-BOUCHAUD, N., MARIANI, J. Involvement of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. **Science.** 1823–1825. 1992.

RAJ, D., LANGFORD, M., KRUEGER, S., SHELTON, M., WELBOURNE, T. Regulatory responses to an oral D-glutamate load: formation of D-pyrrolidone carboxylic acid in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280: 214–220, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C., Validação Em Métodos Cromatográficos E Eletroforéticos. **Quim. Nova.** Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.

RICKUS, J.L., TOBIN, A.J., ZINK, J.I., DUNN, B. Photochemical enzyme co-factor regeneration: towards continuous glutamate monitoring with a sol-gel optical biosensor. **Mater Res Soc Symp Proc.** 662:155–61. 2001.

ROTHMAN, S.M., OLNEY, J.W. Excitotoxicity and NMDA receptor. **Trends Neurosci.** 10, 299-302. 1987.

RUHRMANN, J., KRAMER, R. Mechanism of Glutamate Uptake in *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bacteriology.** 7579-7584. 1992.

SEAL, R.P., AMARA, S.G. Excitatory amino acid transporters: a family in flux. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 39, 431–456. 1999.

SHAH AJ, DE BIASI V, TAYLOR SG, ROBERTS C, HEMMATI P, MUNTUN R, et al. Development of a protocol for the automated analysis of amino acids in brain tissue samples and microdialysates. **J Chromatogr B: Biomed Sci Appl** 735:133–40. 1999.

SILBER, A.M., ROJAS, R.L.G., URIAS, U., COLLI, W. ALVES, M.J.M. Biochemical characterization of the glutamate transport in Trypanosomacruzi. **International Journal for Parasitology** 36:157–163. 2006.

SARTHY, V.P., PIGNATARO, I., PANNICKE, TWEICK, M., REICHENBACH, A., HARADA, T., TANAKA, K., MARC, R. Glutamate Transport by Retinal Muller Cells in Glutamate/Aspartate Transporter-Knockout Mice. **Glia** 49:184–196. 2005.

SPINK, D.C., SWANN, J.W., SNEAD, O.C., WANIEWSKI, R.A., MARTIN, D.L. Analysis of aspartate and glutamate in human cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with automated precolumnderivatization. **Analytical Biochemistry**. 158. 79-86. 1986.

SPIRIDON, M., KAMM, D., BILLUPS, B., MOBBS, P., ATTWELL, D. Modulation by zinc of the glutamate transporters in glial cells and cones isolated from the tiger salamander retina. **Journal of Physiology**. 363—376. 1998.

STORCK, T., SCHULTE, S., HOFMANN, K.W.S. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. **Neurobiology**. 10955-10959. 1992.

SZATKOWSKI, M. AND ATTWELL, D. Triggering and execution of neuronal death in brain ischemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. **Trends Neurosci**. 17, 359–365. 1994.

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**. 1699-702. 1997.

TUNNICLIFF, G. Glutamate uptake by chick retina. **Biochem. J**. 297-299. 1975.

VALLANO, M.L. Developmental aspects of NMDA receptor function. **Crit. Rev. Neurobiol**. 12, 177–204. 1998.

WARD, M.M., JOBLING, A. I., KALLONIATIS, M., FLETCHER, E. L. Glutamate uptake in retinal glial cells during diabetes. **Diabetologia**, 48: 351-360. 2005.

WATSON, C.J., VENTON, B.J., KENNEDY, R.T. In vivo measurements of neurotransmitters by microdialysis sampling. **Anal Chem**. 1391–9. 2006.

WILSON, J.M.B., SHAW C.A. Late appearance of glutamate transporter defects in a murine model of ALS–parkinsonism dementia complex. **Neurochemistry International**. 1067–1077. 2007.

YE, Z.C., SONTHEIMER, H. Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. **Cancer Res.** 59, 4383–4391. 1999.

ERANGUE, N., KAVANAUGH, M.P. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. **Nature** 383, 634–637. 1996.