

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

**EDINALDO ROGÉRIO DA SILVA MORAES**

**MÉTODO BASEADO EM CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA PARA ANALISAR A ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES  
DE GABA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Belém  
2022

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

**EDINALDO ROGÉRIO DA SILVA MORAES**

**MÉTODO BASEADO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA PARA ANALISAR A ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES  
DE GABA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular

**Orientador:** Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano.

## **EDINALDO ROGÉRIO DA SILVA MORAES**

### **MÉTODO BASEADO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA ANALISAR A ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE GABA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular, a comissão avaliadora será formada pelos seguintes professores:

#### **Orientador:**

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano (presidente)  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

#### **Examinadores:**

##### **Prof. Dra. (membro titular)**

Karen Renata Herculano. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

##### **Prof. Dr. (membro titular)**

Evander de Jesus Oliveira Batista. Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará

##### **Prof. Dr. (membro titular)**

Alan Barroso Araújo Grisólia, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará

##### **Prof. Dra (membro suplente)**

Luana Ketlen Reis Leão da Penha, Professora pesquisadora, Universidade Federal do Pará.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)  
autor(a)

---

M827m Moraes, Edinaldo Rogério da Silva.  
Método baseado em cromatografia líquida de alta  
eficiência para analisar a atividade dos transportadores de  
GABA no sistema nervoso central / Edinaldo Rogério da  
Silva Moraes. — 2022.  
96 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará,  
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém,  
2022.

1. Retina. 2. GAT. 3. Transporte GABA. 4. CLAE. I.  
Título.

---

CDD 612

*Dedico esse trabalho as minhas  
filhas Daniela e Maria Luiza*

## Agradecimentos

A Deus...pela dádiva da vida!

Ao meu orientador, professor Dr. Anderson Herculano pelas oportunidades, compartilhamentos de conhecimentos e amizade. Tudo foi um aprendizado e valeu a pena, chefe!

A minha família (esposa Vânia, filhas Daniela e Maria Luiza), sem as quais a minha vida não teria tanto sentido. Agradeço por todo empenho que vocês fizeram em prol do meu sucesso. Beijijos! Amo vocês!

A minha mãezinha querida Edna Moraes que nunca mediu esforços para me fazer feliz e contribuir para que eu galgasse os melhores caminhos na vida

Aos professores (as) doutores (as) Karen Herculano, que inclusive me garantiu um primeiro emprego, Alan Grisólia, Evander Batista e Luana Ketlen. Vocês deram contribuições incríveis para o enriquecimento deste trabalho, muito obrigado.

A equipe do Laboratório de Neurofarmacologia Experimental que é um grupo de excelência, em especial ao Mateus Silva que batalhou comigo em prol de processos de validação de método.

A Universidade Federal do Pará, ao Instituto de Ciências Biológicas e em especial ao Programa de Pós graduação em Neurociências e Biologia Celular

A todos os meus amigos e a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização dessa tese.

## RESUMO

Os GATs são os principais transportadores de GABA no sistema nervoso central e alterações em sua atividade estão envolvidas em várias doenças neurológicas, incluindo retinopatias. O presente estudo descreve um método eficiente utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por fluorescência para determinação da atividade dos GATs em preparações de retina. Explants de retina foram incubadas em concentrações conhecidas de GABA (50-1000  $\mu\text{M}$ ) por 30 minutos, e os níveis do neurotransmissor derivado de o-ftaldeído (OPA) no meio de incubação foram mensurados. Ao avaliar a diferença entre as concentrações inicial e final de GABA no meio ( $\Delta Gaba = [Gaba]_{t_0} - [Gaba]_{t_{final}}$ ), um mecanismo de captação saturável foi caracterizado ( $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  de 382,4  $\mu\text{M}$  e 34 nmol/mg proteína/minuto, respectivamente). Tal mecanismo foi amplamente dependente do  $\text{Na}^+$  e de temperatura, reiterando que o mecanismo de diminuição da concentração é de fato captado por transportadores de alta afinidade. Somado a isso, nossos resultados também demonstraram que o ácido nipecótico (um substrato dos transportadores GAT) inibiu a captação de GABA em preparações retinianas, demonstrando uma elevada especificidade dessa metodologia. No geral, o presente estudo caracteriza um método alternativo e altamente sensível para avaliar a atividade do GAT no SNC.

Palavras-chave: GAT; captação de GABA; CLAE; Retina; transporte.

## ABSTRACT

The GATs are the membrane proteins responsible for the uptake of GABA in the central nervous system. Alterations in GAT activity are implicated in several neurological diseases, including retinopathies. The present study describes an alternative method to determine GAT activity in tissue preparations of the central nervous system, using high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. The GABA concentration in the medium was determined using the o-phthaldehyde (OPA)-derivation protocol validated by the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA) and the United States Food and Drug Administration (US-FDA). The GAT activity in the retinal preparations was determined through the evaluation of the GABA uptake, which was measured by assessing the difference between the initial and final concentrations of GABA in the incubation medium ( $\Delta Gaba = [Gaba]_{t_0} - [Gaba]_{t_{end}}$ ). The evaluation of the GAT kinetics returned values of  $K_m = 382.5 \pm 32.2 \mu M$  and  $V_{max} = 34 \text{ nmol/mg of protein}$ . The data also demonstrated that the GABA uptake was predominantly  $Na^+$  and temperature-dependent, and was also inhibited by incubation with nipecotic acid, a substrate of GABA transporters. Taken together, these findings confirm that our approach provided a specific measure of GAT activity in retinal tissue. The data presented here thus validate, for the first time, an alternative, simple and sensitive method for the evaluation of GAT activity using high performance chromatography on preparations of the central nervous system.

Keywords: GAT, GABA, uptake, HPLC, Retina, Transport



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Metabolismo do GABA .....	18
<b>Figura 2.</b>	Receptor GABA <sub>A</sub> .....	20
<b>Figura 3.</b>	Receptor GABA <sub>B</sub> .....	21
<b>Figura 4.</b>	Esquema do transportador de GABA.....	23
<b>Figura 5.</b>	Estrutura molecular de diferentes bloqueadores.....	26
<b>Figura 6</b>	Expressão dos GATs no neocórtex.....	31
<b>Figura 7.</b>	Estrutura tridimensional do GAT.....	32
<b>Figura 8.</b>	CLAE.....	40
<b>Figura 9.</b>	Estrutura da retina.....	42
<b>Figura 10.</b>	Fluxograma do procedimento analítico para determinação de GABA por CLAE.....	54
<b>Figura 11.</b>	Seletividade.....	60
<b>Figura 12</b>	Tempo de retenção do GABA e Padrão interno.....	61
<b>Figura 13.</b>	Curva de linearidade.....	62
<b>Figura 14.</b>	Curva de calibração.....	63
<b>Figura 15.</b>	Curva temporal de captação de GABA.....	69
<b>Figura 16.</b>	Curva Cinética de captação de GABA .....	70
<b>Figura 17.</b>	Captação de GABA em meio sem sódio.....	71
<b>Figura 18.</b>	Captação de GABA em função da temperatura .....	73
<b>Figura 19.</b>	Efeito do ácido nipecótico na captação de GABA.....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Nomenclatura dos GATs em função da espécie analisada	22
<b>Tabela 2</b>	IC50 de diferentes drogas sobre a captação de GABA em culturas puras de neurônios e glia	24
<b>Tabela 3</b>	IC50 de diferentes drogas sobre a captação de GABA mediada por diferentes transportadores.	27
<b>Tabela 4</b>	Gradiente de concentração das fases móveis do CLAE	48
<b>Tabela 5</b>	Condições cromatográficas para análise do GABA na matriz extracelular	49
<b>Tabela 6</b>	Limite de detecção e de quantificação de GABA por CLAE	66
<b>Tabela 7</b>	Precisão e recuperação de GABA mensurado por CLAE	67
<b>Tabela 8</b>	Estabilidade da análise de GABA por CLAE	68

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ANOVA:** Análise de Variância

**BSA:** Albumina Sérica Bovina

**CaCl<sub>2</sub>:** Cloreto de Cálcio

**CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**Cl<sup>-</sup>:** Cloreto

**CV:** Coeficiente de Variação

**GABA:** Ácido Gamaaminobutírico

**GABA<sub>a</sub>:** Receptor de GABA<sub>a</sub>

**GABA<sub>b</sub>:** Receptor de GABA<sub>b</sub>

**GABA<sub>c</sub>:** Receptor de GABA<sub>c</sub>

**GABA-T:** GABA Transaminase

**GAD:** Descarboxilase do ácido glutâmico

**GAT 1-4:** Transportadores de GABA 1-4

**HEPES:** ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico

**IC<sub>50</sub>:** Inibidor de Composto

**KCl:** Cloreto de potássio

**K<sub>m</sub>:** Constante de Michaelis-Menten

**LD:** Limite de Detecção

**LQ:** Limite de Quantificação

**Mg:** Magnésio

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloreto de Magnésio

**mV:** Milivolts

**µg:** Micrograma

**µM:** Micromolar

**Na<sup>+</sup>:** Sódio

**NaCl:** Cloreto de sódio

**NaOH:** Hidróxido de Sódio

**nmol:** Nanomol

**OPA:** o-phthaldehyde

**RPM:** Rotações por Minuto

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**TCA:** Ácido Tricloroacético

**T0:** Tempo inicial

**Tfinal:** Tempo Final

**Vmáx:** Velocidade máxima

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1	1.1 Generalidades sobre o sistema GABAérgico e os principais métodos de estudo de medição de GABA no SNC (Sistema Nervoso Central).....	15
1.2	Síntese e degradação de GABA.....	15
1.3	Receptores de GABA.....	17
1.4	Transportadores de GABA.....	20
1.4.1	Propriedades biofísicas dos Transportadores de GABA.....	21
1.4.2	Propriedades farmacológicas dos Transportadores de GABA.....	23
1.4.3	Diferentes subtipos de Transportadores de GABA.....	26
1.5	Importância dos Transportadores de GABA para a fisiologia do SNC.....	32
1.5.1	O papel dos GATs em transtornos neuropsiquiátricos.....	32
1.5.2	A captação de GABA em doenças neurodegenerativas.....	33
1.6	Métodos para avaliar a captação de GABA em preparos do SNC.....	35
1.7	A retina como modelo para ensaios neuroquímicos.....	40
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
2.1	Objetivo Geral.....	43
2.2	Objetivos Específicos.....	43
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
3,1	Explante de Retina de embrião de galinha.....	44
3.2	CLAE.....	44
3.3	Reagentes.....	45
3.4	Padrões.....	45
3.4.1	Soluções Estoque.....	45
3.4.2	Solução Intermediária.....	45
3.4.3	Soluções de Trabalho.....	45
3.4.4	Solução do Padrão Interno.....	45
3.4.5	Soluções de Calibração.....	45
3.4.6	Soluções Controle.....	45
3.5	Condições Cromatográficas.....	46
3.6	Derivatização.....	46
3.6.1	Preparação de OPA.....	46
3.6.2	Derivatização de aminoácidos.....	46
3.7	Processo de Validação do Método.....	50
3.7.1	Parâmetros Analíticos para a Validação do Método.....	50
3.7.2	Tempo de Retenção.....	50

3.7.3	Linearidade.....	50
3.7.4	Curva de Calibração.....	50
3.7.5	Limites de detecção e Limites de Quantificação.....	51
3.7.6	Exatidão .....	51
3.7.7	Precisão .....	51
3.7.8	Ensaio de Recuperação .....	52
3.8	Captção Indireta de GABA por CLAE.....	54
3.8.1	Análise do tempo de retenção antes e após incubação no tecido retiniano (seletividade comparando matrizes de análises com e sem GABA)	54 54
3.8.2	Curso Temporal de Captção de GABA na Retina .....	54
3.8.3	Cinética de Captção de GABA (Km e Vmáx).....	55
3.8.4	Aplicabilidade do Método.....	56
3.8.4.1	Captção de GABA em Função da Presença de Na+ .....	56
3.8.4.2	Captção de GABA em Diferentes Temperaturas.....	56
3.8.4.3	Ensaio de Captção Frente a Um Antagonista do Transporte de GABA...	56
3.9	Dosagem de Proteínas.....	57
3.10	Análise Estatística.....	57
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
4.1	Validação do Método Para Quantificar GABA.....	58
4.1.2	Seletividade.....	58
4.1.3	Tempo de retenção .....	60
4.1.4	Linearidade.....	61
4.1.5	Curva de Calibração.....	61
4.1.6	Limites de Detecção e Quantificação .....	63
4.1.7	Exatidão .....	63
4.1.8	Precisão .....	64
4.1.9	Recuperação .....	64
4.1.10	Estabilidade.....	64
4.2	Curso Temporal de Captção de GABA na Retina .....	69
4.3	Cinética de captção de GABA (Km Vmáx).....	70
4.4	Captção de GABA em função da presença de sódio.....	71
4.5	Captção de GABA em função da temperatura.....	72
<b>5</b>	<b>Captção de GABA na presença do ácido nipecótico .....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>82</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>94</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Generalidades sobre o sistema GABAérgico e os principais métodos de estudo de medição de GABA no SNC (Sistema Nervoso Central)

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor em sinapses inibitórias do Sistema Nervoso Central de vertebrados (BORGES-MARTINS ET AL., 2019; KUBRUSLY ET AL., 2021). Inicialmente identificado no encéfalo de camundongos, o GABA cumpre todos os critérios clássicos de um neurotransmissor, sendo eles: 1) Via de síntese em células neuronais; 2) Mecanismo de liberação vesicular no espaço sináptico; 3) Expressão de receptores capazes de gerar uma resposta no neurônio pós-sináptico; e 4) Mecanismo de terminação da sinalização, sendo, no caso do sistema GABAérgico, os transportadores de alta-afinidade os principais responsáveis pela finalização da neurotransmissão (SPIERING, 2018). A partir desses mecanismos, o GABA exerce o seu efeito inibitório no SNC, regulando o balanço excitação/inibição desse tecido (SELTEN ET AL., 2018).

Nesse contexto, alguns estudos tem demonstrado o monitoramento dos níveis de gaba no SNC, tais como biossensores (raramente), exames de imagens, métodos de cintilação líquida, cromatografia líquida e monitoramento de metabólitos utilizando reações enzimáticas (CASTRO, ET AL., 2014). Os tópicos seguintes discutirão aspectos gerais sobre o metabolismo, os receptores, os transportadores GABAérgicos e os principais métodos utilizados para dosar gaba no SNC.

## 1.2 – A síntese e a degradação de GABA

O GABA é sintetizado a partir da ação enzimática da Descarboxilase do Ácido Glutâmico (E.C no: 4.1.1.15; GAD, do inglês *Glutamic acid decarboxylase*), utilizando o piridoxal fosfato como co-fator para reação (ISHIBASHI ET AL., 2019). Duas isoformas desta enzima foram descritas e caracterizadas de acordo com o seu peso molecular: GAD 65 kDa e a GAD 67 kDa. Apesar da similaridade estrutural, essas duas proteínas cumprem papéis distintos na fisiologia celular, são reguladas por mecanismos diferentes e sua ontogenia é temporalmente distinta (DE MELLO ET AL., 1991). Enquanto a GAD 67 kDa é amplamente

distribuída por todo o corpo celular, a GAD 65 kDa fica restrita ao terminal sináptico, refletindo o papel desta última na produção de GABA para neurotransmissão, enquanto a isoforma 67 produz GABA como um intermediário metabólico para outros processos não relacionados à comunicação celular (DE MELLO ET AL., 1991; TAVAZZANI ET AL., 2014).

Em decorrência disso, a GAD 65 kDa forma um complexo com o transportador vesicular de GABA, acoplando a produção deste neurotransmissor ao seu empacotamento em vesículas sinápticas prontas para a liberação (JIN ET AL., 2003). Além disso, a expressão de GAD 65 ocorre em estágios avançados do desenvolvimento, refletindo a necessidade tardia do SNC em possuir um sistema inibitório, enquanto a isoforma 67 kDa é expressa em períodos iniciais da ontogenia central (DE MELLO ET AL., 1991).

A expressão e atividade da GAD são reguladas de acordo com a necessidade do sistema por atividade inibitória (ALMEIDA ET AL., 2000). Na retina embrionária, a expressão de GAD é negativamente regulada pelo GABA, sendo esse efeito não mimetizado por agonistas de receptores GABAérgicos, mas bloqueado por inibidores da captação de GABA, sugerindo uma ação intracelular do GABA sobre a expressão da enzima. Em contraste, aminoácidos excitatórios (Glutamato e kainato) e doadores de óxido nítrico (NO) aumentam a expressão da GAD no corpo celular, mas não nas camadas plexiformes da retina, sugerindo um mecanismo de regulação por esses sistemas de sinalização que pode ter implicações em condições patológicas marcadas por altos níveis de glutamato e NO (DE MELLO ET AL., 1991; ALMEIDA ET AL., 2000; MAGGESISSI ET AL., 2009).

A degradação de GABA é mediada pela enzima GABA-Transaminase (GABA-T, E.C 2.6.1.19), a qual transamina o GABA + 2-oxoglutarato em succinato semialdeído e glutamato, utilizando a vitamina B6 como co-fator (ISHIBASHI ET AL., 2019), como descrito abaixo:

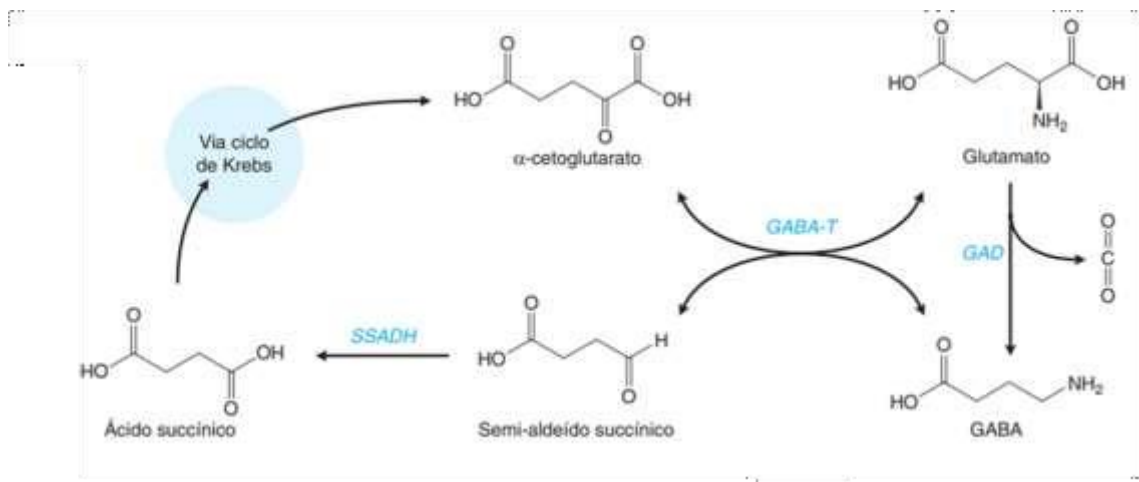


Como demonstrado na fórmula acima, a reação catalisada pela GABA-T é reversível – de modo que em certos organismos onde as condições são



favoráveis, ela é responsável pela *síntese*, e não degradação de GABA (TRITSCH ET AL., 2014).

A GABA-T desempenha um papel neuroprotetor central em quadros isquêmicos. A atividade dessa enzima diminui em situações de privação de oxigênio e glicose devido à queda na atividade do ciclo de Krebs, responsável por produzir o 2-oxoglutarato utilizado como co-substrato da enzima. Desse modo, situações isquêmicas resultam em um aumento nos níveis intracelulares de GABA em decorrência da menor atividade da GABA-T, o que disponibiliza mais GABA a ser liberado para inibir o sistema e, assim, diminuir o custo metabólico necessário para sobrevivência celular. Esse acoplamento da neurotransmissão com o metabolismo demonstra a complexidade da sinalização GABAérgica no sistema nervoso (BRADY E SIEGEL; 2012).



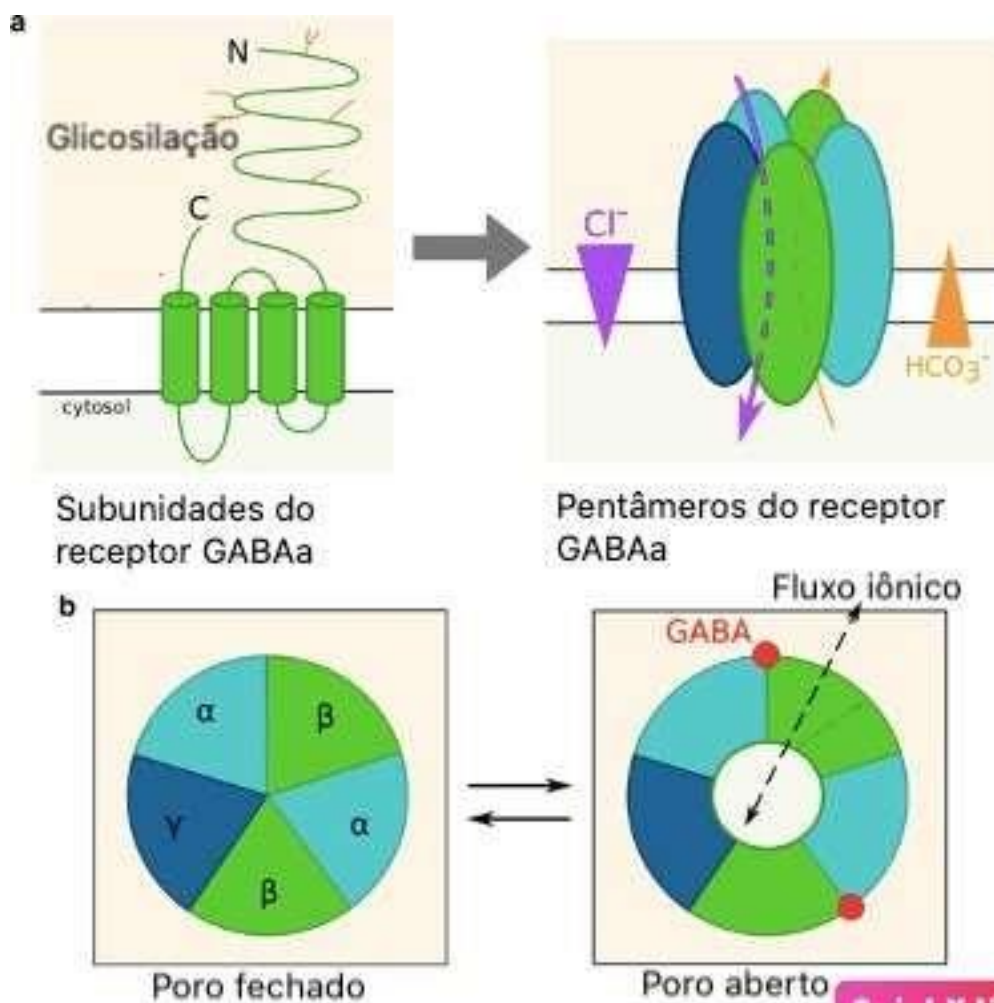
**Figura 1.** Esquema representativo das vias de síntese e degradação de GABA. O GABA é sintetizado a partir da descarboxilação do glutamato a partir da ação da Glutamato Descarboxilase. Na rota de degradação, o GABA sofre uma transaminação da enzima GABA-T que gera semi-aldeído succínico, que pode gerar ácido succínico – um participante do ciclo de Krebs utilizado como precursor de glutamato. Fonte: Victor Thomé, 2019.

### 1.3 – Receptores de GABA

Dois principais receptores de GABA existem no SNC: O receptor GABA<sub>A</sub>, acoplado a um canal iônico permeável a cloreto, e o receptor GABA<sub>B</sub>, acoplado à proteína G<sub>i</sub> (ISHIBASHI ET AL., 2019; GHIT ET AL., 2021; SALLARD ET AL.,

2021). Como será discutido a seguir, os dois receptores atuam por mecanismos diferentes, mas possuem a mesma finalidade: Inibir a atividade celular.

O receptor GABA<sub>A</sub> é considerado o principal receptor GABAérgico no SNC (SALLARD ET AL., 2021). Essa proteína é composta por 5 subunidades (Pentamérico) que se dispõem de modo a formar um poro central permeável a ânions cloreto. O GABA<sub>A</sub> é considerado um dos receptores de maior complexidade no sistema nervoso devido à sua rica farmacologia, que deriva da existência de diferentes sítios de ligação para hormônios (Como esteróides e a melatonina) que modulam a sua atividade (GHIT ET AL., 2021). Ademais, apesar de ser formado por 5 subunidades, hoje são descritas 20 possíveis subunidades para o receptor GABA<sub>A</sub>, nomeadas como:  $\alpha$  (1-6),  $\beta$  (1-3),  $\gamma$  (1-3),  $\delta$ ,  $\epsilon$  (1-3),  $\theta$ ,  $\rho$  (1-3) e  $\pi$  (SIEGEL ET AL., 2012). Cada uma dessas subunidades se agrega para formar canais de cloreto com propriedades biofísicas especializadas para a região onde estão sendo expressas (SALLARD ET AL., 2021). Apesar dessa ampla variedade, os principais subtipos de GABA<sub>A</sub> são formados por duas subunidades alfa, duas betas e uma gama, ou por subunidades  $\rho$  – as quais formam o chamado receptor GABA<sub>C</sub> / GABA<sub>A $\rho$</sub>  exclusivo da retina (POPOVA, 2014).

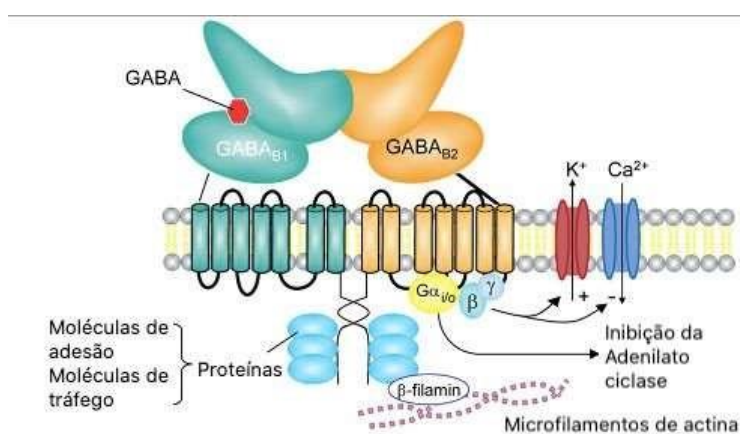


**Figura 2. A)** Esquema da estrutura dos receptores GABAa na membrana e permeabilidade a ânions cloreto, com representação de uma cauda N-terminal rica em glicosilações. **B)** Representação das principais subunidades do receptor GABAa (Alfa, beta e gama) na forma inativa e na forma ativa. Adaptado de Sallard et al., 2021

A ativação do receptor GABAa resulta em um influxo de cloreto que induz uma hiperpolarização transitente no potencial de membrana neuronal e resulta na chamada *inibição fásica* nos neurônios pós-sinápticos (SALLARD ET AL., 2021). O receptor GABAa também é constitutivamente ativado, possuindo uma atividade basal que gera a *inibição tônica* neuronal. A partir desses mecanismos, o GABAa garante uma ação inibitória rápida à atividade neuronal (JOO ET AL., 2014).

Em contrapartida a essa ação rápida mediada pelo GABAa, o receptor GABAb exerce uma ação dita como mais lenta (TERUNUMA, 2018). O receptor GABAb é considerado um receptor dimérico por possuir duas principais

subunidades: R1 e R2, com diferentes isoformas. Além disso, o receptor GABA<sub>B</sub> é acoplado à proteína G<sub>i</sub>, inibindo a adenilato ciclase a partir da sua subunidade  $\alpha$ , e bloqueando canais de cálcio por meio do dímero  $\beta\gamma$ . Diferente dos receptores GABA<sub>A</sub>, os receptores GABA<sub>B</sub> têm um papel pouco elucidado no SNC. No entanto, a sua expressão ubíqua nas diferentes regiões centrais, assim como em células neuronais e células gliais sugerem que ele desempenhe um papel central na fisiologia nervosa (BENARROCH ET AL., 2012; TERUNUMA, 2018).



**Figura 3.** Ilustração representando o receptor GABA<sub>B</sub> e suas duas subunidades acopladas à proteína G, capaz de inibir a atividade da adenilato ciclase e canais de cálcio, além de potencializar a atividade de canais de potássio – favorecendo a hiperpolarização celular. Adaptado de Benarroch, 2012

A ativação de ambos os receptores é regulada pela disponibilidade de GABA para se ligar ao sítio de ação (ISHIBASHI ET AL., 2019). Como será discutido a seguir, esse papel de modulação dos níveis extracelulares de GABA é mediado - principalmente - pelos transportadores de GABA, responsáveis por remover esse neurotransmissor da fenda e, portanto, tendo um papel crucial na sinalização GABAérgica.

#### 1.4 - Os transportadores de GABA

Os transportadores de GABA (GATs) são amplamente expressos no Sistema Nervoso Central (SCIMEMI ET AL., 2014). Essas proteínas pertencem à família de *Solute carriers 6* (SLC6), os quais co-transportam

neurotransmissores junto a íons sódio. Desse modo, diz-se que a captação de GABA é predominantemente dependente de sódio – uma vez que 80 a 95% do transporte dessa molécula depende da presença de  $\text{Na}^+$  extracelular (SCIMEMI ET AL., 2014; LATKA ET AL., 2020).

A nomenclatura dos GATs varia de acordo com a espécie estudada, como consta na tabela abaixo. Enquanto em camundongos eles recebem os nomes de GAT 1, 2, 3 e 4, em humanos a nomenclatura predominante é GAT-1, BGT-1, GAT-2 e GAT-3 (ISHIBASHI ET AL., 2019). Para simplicidade e consistência do manuscrito, o presente trabalho utilizará a nomenclatura de humanos ao longo do texto.

**Tabela 1.** Descrição das diferentes nomenclaturas para os transportadores de GABA, diferenciadas a partir da espécie utilizada (Camundongos ou ratos e humanos).

<i>Espécie</i>	<i>Genes</i>			
	<b><i>SLC6A1</i></b>	<b><i>SLC6A12</i></b>	<b><i>SLC6A13</i></b>	<b><i>SLC6A11</i></b>
<i>Camundongo, ave</i>	GAT-1	GAT-2	GAT-3	GAT-4
<i>Rato, humano</i>	GAT-1	BGT-1	GAT-2	GAT-3

Fonte: Ishibashi et al., 2019.

#### 1.4.1 - Propriedades biofísicas dos transportadores de GABA

Os GATs possuem quatro principais propriedades biofísicas: 1) Eles acoplam o transporte de GABA ao transporte de sódio a favor de seu gradiente eletroquímico, mantido pela bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , 2) Os GATs têm alta afinidade pelo seu substrato, possuindo um  $K_m$  por volta de 10  $\mu\text{M}$  calculado pela constante de Michaelis-Menten, 3) Apesar de íons  $\text{Li}^+$  serem capazes de substituir o  $\text{Na}^+$  em certas condições fisiológicas devido às suas similaridades químicas características do grupo 1A de metais alcalinos, o sítio de transporte de  $\text{Na}^+$  é insensível à presença de  $\text{Li}^+$ , de modo que apenas o sódio suporta o transporte de GABA, 4) O influxo de sódio associado à captação de GABA

sugere que a atividade dos GATs é eletrogênica (IVERSEN E NEAL, 1968; SCIMEMI ET AL., 2014). Ensaios em cultura primária de células gliais demonstraram que os GATs dependem tanto de íons  $\text{Na}^+$  quanto de íons  $\text{Cl}^-$  no ambiente extracelular, o que foi confirmado depois por ensaios com marcadores radioativos demonstrando o influxo de 2 íons  $\text{Na}^+$  e 1 íon  $\text{Cl}^-$ , sugerindo a estequiometria de 1 GABA: 2  $\text{Na}^+$ : 1  $\text{Cl}^-$  (). Apesar da relevância de ânions cloreto sobre a captação de GABA ter sido questionado devido à baixa energia fornecida pelo gradiente do  $\text{Cl}^-$ , experimentos cinéticos sugerem que o cloreto participa de uma etapa do ciclo de operação dos GATs distinta da translocação de GABA, mas que garante uma conformação adequada do transportador para mover esse neurotransmissor através da membrana, de modo a explicar a necessidade por  $\text{Cl}^-$  extracelular (BICHO E GREWER, 2005). A figura 4 demonstra um esquema resumido do processo de transporte de gaba através do GAT.

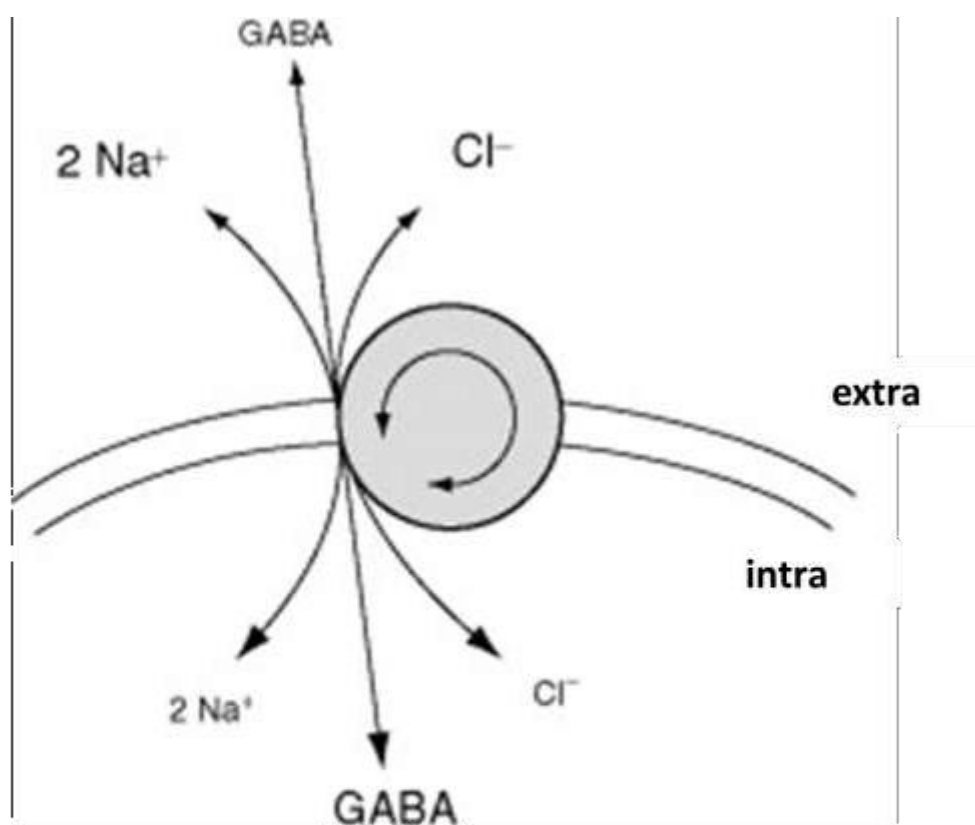


Figura 4- Esquema do transportador de GABA. Durante cada ciclo de transporte, dois íons de sódio, um íon de cloreto e uma molécula de GABA sofrem translocação acoplada  
 Fonte: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/gaba-transporter>. Acessado em 28/11/20

### 1.4.2 - Propriedades farmacológicas dos transportadores de GABA

Evidências de sítios distintos para captação de GABA surgiram a partir de ensaios farmacológicos em cultura purificadas de neurônios e células gliais investigando a capacidade diferencial de bloqueadores da captação de [<sup>3</sup>H]-GABA em inibir o transporte desse neurotransmissor (KROGSGAARD-LARSEN ET AL., 1987). Os achados desses experimentos iniciais sugeriam a existência de sistemas de transporte farmacologicamente distintos entre neurônios e glia. A isoforma neuronal, por exemplo, é virtualmente insensível à presença de beta-alanina extracelular, enquanto a isoforma glial apresenta maior sensibilidade a esse aminoácido. O mesmo ocorre para o ácido nipecótico, que inibe preferencialmente uma das isoformas de maneira estereo-específica.

Tabela 2. Descrição da inibição de um composto (IC 50) dos diferentes substratos dos transportadores de GABA, demonstrando uma seletividade de alguns substratos por isoformas neuronais sobre as isoformas gliais

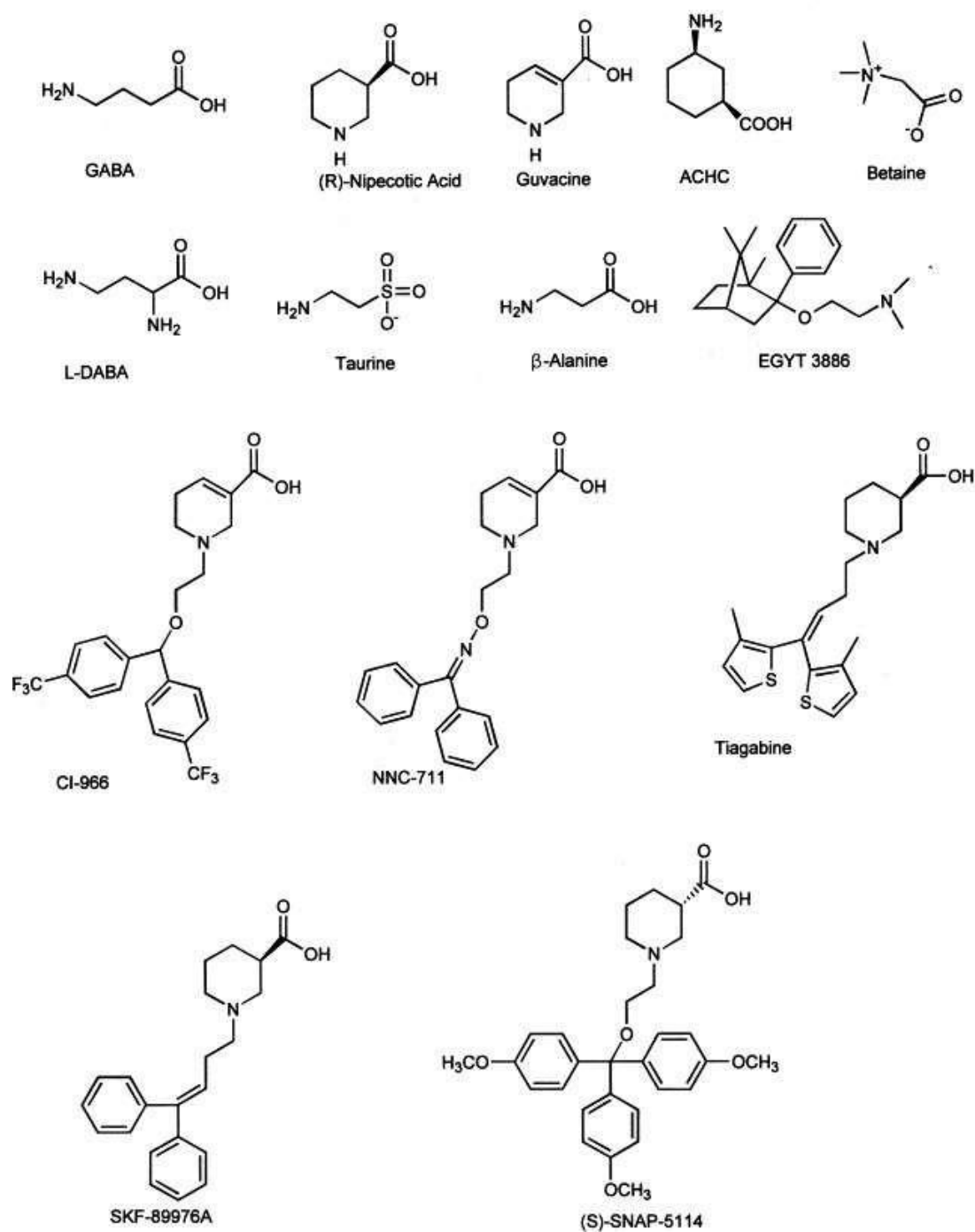
<i>Droga</i>	<i>Neurônios</i>	<i>Glia</i>
<i>GABA</i>	15	3 5
<i>Beta-Alanina</i>	>5000	1000
<i>L-DABA</i>	1000	>5000
<i>ACHC</i>	200	700
<i>R-Ácido nipecótico</i>	70	3 0
<i>S-Ácido nipecótico</i>	500	1000

Fonte: Krogsgaard-Larsen et al., 1987

Na mesma linha de investigação, foi demonstrado que os inibidores da captação de [<sup>3</sup>H]-GABA possuem distintos mecanismos de ação, podendo ser *transportáveis*, isso é, competindo com o GABA pelo sítio de transporte, ou não-transportáveis, bloqueando outro componente do transportador que o impede de translocar as moléculas de GABA (SCIMEMI ET AL., 2014). A figura 4 apresenta a estrutura molecular de diversos inibidores da captação de GABA. Dentre essas moléculas o RS-ácido nipecótico (ANp) se destaca por ser um dos inibidores de GATs de maior potência (SCHTINE ET AL., 2007). Ensaaios em fatias de córtex cerebral de ratos caracterizaram que o [<sup>3</sup>H]-ANp possui um sistema de captação dependente de Na<sup>+</sup> com K<sub>m</sub> de 11 μM que é quase completamente inibido por

bloqueadores da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e por GABA, sugerindo que essas moléculas compartilham o mesmo sítio de transporte (JOHNSTON ET AL., 1976). Em contrapartida, o ANp bloqueia até 50% da captação total de  $[\text{}^3\text{H}]\text{-GABA}$ , fortalecendo a hipótese de essas moléculas compartilharem um mesmo sítio de transporte (JOHNSTON ET AL., 1976; SHTINE ET AL., 2007).





**Figura 5.** Estrutura molecular de diferentes bloqueadores da captação de GABA.

Trabalhos de clonagem dos GATs permitiram uma distinção entre os diferentes subtipos de transportadores, assim como permitiram uma melhor caracterização farmacológica dos diferentes inibidores da captação de [ $^3\text{H}$ ]-GABA, demonstrando a seletividade de certos compostos que permitem isolar e estudar certos sistemas de transporte GABAérgicos.

**Tabela 3.** Descrição dos diferentes substratos dos subtipos de GATs e seus respectivos IC50 para cada transportador.

<i>Droga</i>	<i>GAT-1</i>	<i>BGT-1</i>	<i>GAT-2</i>	<i>GAT-3</i>
GABA	30	42	17	33
ACHC	132	107 0	259 00	55100
Guavacina	39	142 0	228	378
Hidroxinipecótico	44	384 0	567	467
(R,S)-Ácido nipecótico	24	235 0	113	159
NNC-711	0.38	357 0	729	349
Hipotaurina	101 0	536	52	73
Beta-Alanina	292 0	110 0	66	110
GES	484 0	480 0	696	915
L-DABA	128	528	300	710
Taurina	323 00	132 00	127 0	2860

Fonte: Borden et al., 1996

### 1.4.3 - Os diferentes subtipos de GATs

#### 1. GAT-1

O GAT-1 foi o primeiro transportador de neurotransmissor a ser clonado. A expressão do gene que codifica esse transportador em oócitos de *Xenopus laevis* corroborou os achados anteriores de estudos *in vitro* e *ex vivo* em preparações nervosas de um sistema de transporte dependente de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> extracelular, com elevada afinidade (K<sub>m</sub> de 7 μM) e transporte saturável (BORDEN ET AL., 1996). Por ter sido o primeiro a ser clonado, a proteína foi nomeada como “GAT-1” (GUASTELLA ET AL., 1990). Ensaios farmacológicos demonstraram que o GAT-1 é altamente sensível ao NNC-711, RS-ácido nipecótico, ACHC e L-DABA, e largamente insensível à beta-alanina, sugerindo que esse é o subtipo expresso por células neuronais por expressar o mesmo perfil farmacológico do sistema de captação neuronal.

A distribuição do GAT-1 e sua localização celular foram posteriormente confirmadas por técnicas de moleculares e de microscopia óptica ou eletrônica. Apesar de ser amplamente expresso no SNC, o GAT-1 possui maior marcação

no cerebelo, gânglios basais, bulbo olfatório e na retina, enquanto o neocórtex, hipocampo e tálamo são moderadamente marcados para o RNAm que codifica essa proteína (DURKIN ET AL., 1995; BORDEN ET AL., 1996; SCIMEMI ET AL., 2014). No entanto, estudos sobre a expressão proteica de GAT-1 encontraram maior expressão desse transportador no hipocampo, neocórtex e bulbo olfatório – demonstrando diferenças na detecção dependendo do método de investigação utilizado (IKEGARI ET AL., 1994). Apesar disso, a distribuição ampla do GAT-1 no SNC é indiscutível e isso o torna o principal transportador de GABA nesse tecido.

Em termos celulares, o GAT-1 é expresso principalmente em terminais sinápticos de células neuronais, corroborando os achados farmacológicos descritos anteriormente (SCIMEMI ET AL., 2014). Essa localização fortalece o seu papel na neurotransmissão GABAérgica – auxiliando na terminação dos *inputs* inibitórios do GABA, assim como na reciclagem dessa molécula para posterior liberação. Além das células neuronais, o GAT-1 também foi detectado – em menor nível - em subpopulações astrócitos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sugerindo um papel para essas células na sinalização GABAérgica (FATTORINI ET AL., 2020).

Na retina de primatas, o GAT-1 é expresso exclusivamente nos terminais sinápticos de neurônios, sendo predominante na Camada Plexiforme Interna – uma região rica em conexões sinápticas (CASINI ET AL., 2006). No entanto, o perfil de localização celular de GATs depende da espécie estudada, como discutido por YAZULLA ET AL., (2010). Enquanto o GAT-1 é predominantemente expresso por neurônios na retina da maioria dos vertebrados, duas exceções são descritas na literatura: Sabe-se que na retina de aves as células de Müller expressam uma isoforma desse transportador (BRINGMANN ET AL., 2013), apesar da funcionalidade desse transportador ser debatida, uma vez que inibidores seletivos de GAT-1 não interferem na captação de [<sup>3</sup>H]-GABA por essas células (SCHITINE ET AL., 2007). Além das aves, foi descrito que as células de Müller da retina de ratos são capazes de captar até 100  $\mu$ M de GABA em 70 ms por ação do GAT-1, sugerindo um sistema glial funcional de captação de GABA nessa espécie mensurado por técnicas de fluorescência acoplada à NADPH (BIEDERMANN ET AL., 2002). O racional por trás dessas diferenças na retina de diferentes espécies não é bem esclarecido, mas podem refletir diferentes metodologias utilizadas para avaliar a captação de GABA.

## 2. BGT-1

Dentre os GATs, o BGT-1 é o menos caracterizado no Sistema Nervoso Central (SCIMEMI ET AL., 2014). Parte da razão por trás disso decorre de sua baixa expressão no SNC, assim como sua baixa afinidade pelo substrato – o que levanta o questionamento sobre a sua relevância para a sinalização GABAérgica. Por outro lado, a ausência de inibidores seletivos para BGT-1 e de anticorpos altamente seletivos para esse carreador limitam os estudos sobre o seu papel no SNC (BORDEN ET AL., 1996).

Sabe-se que a expressão de BGT-1 no SNC é quase exclusiva das leptomeninges, sendo quase nula nas demais regiões encefálicas (ZHOU ET AL., 2012). Ademais, o BGT-1 apresenta maior afinidade pela betaína em comparação ao GABA, um intermediário na via metabólica da homocisteína. No entanto, a betaína está presente em baixíssimos níveis no encéfalo, sendo predominante no fígado (KICKINGER ET AL., 2019), sugerindo uma relevância mais periférica para esse transportador. Apesar disso, já foi caracterizado que condições epilépticas e de hipertonicidade modulam a expressão de BGT-1, abrindo a possibilidade de um papel ainda desconhecido desse transportador em condições patológicas (BORDEN ET AL., 1996).

## 3. GAT-2

A partir de técnicas de clonagem, um novo transportador de GABA foi caracterizado: O GAT-2 (BORDEN ET AL., 1992). Análises da expressão de RNAm identificaram que esse transportador está presente em parte do SNC (Encéfalo e retina), possuindo altíssima afinidade por GABA como demonstrado em estudos *in vitro* (BORDEN ET AL., 1992), com um  $K_m$  de 17  $\mu$ M equiparável ao do GAT-1, sugerindo que esse carreador possui uma alta relevância na fisiologia GABAérgica.

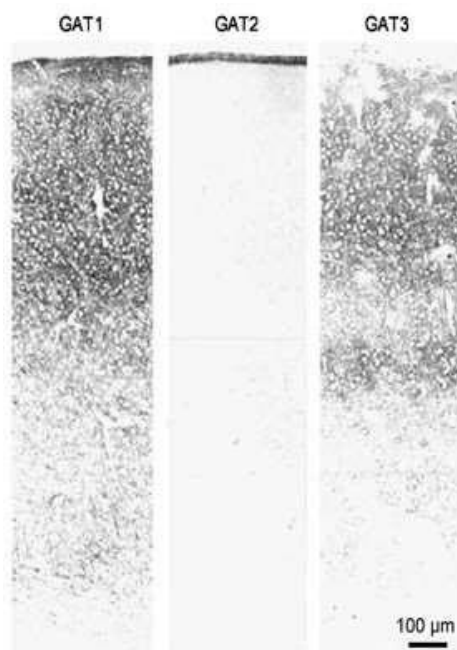
Farmacologicamente, o GAT-2 pode ser distinguido dos demais GATs devido à sua maior afinidade por hipotaurina, taurina, GES e beta-alanina, como consta na Tabela 3, o que permite uma melhor caracterização de seu papel em condições fisiológicas e patológicas, assim como o desenvolvimento de fármacos objetivando modular a sua função. Além da distinção farmacológica, o GAT-2 também possui propriedades biofísicas diferentes dos demais GATs.

Enquanto a remoção de  $\text{Cl}^-$  extracelular reduz para <5% a captação de [ $^3\text{H}$ ]-GABA mediada por GAT-1, o transporte mediado por GAT-2 cai para 43% - sugerindo uma diferente dependência iônica entre esses transportadores (BORDEN ET AL., 1992), o que pode representar um mecanismo do sistema em manter uma captação de GABA em situações onde os níveis extracelulares de ânions cloreto é baixa, como no início do desenvolvimento do SNC.

Na retina de ratos, o GAT-2 é expresso no epitélio pigmentado, como demonstrado por microscopia de fluorescência (HONDA E SAITO, 1995) e na célula de Müller da retina de sapos (YAZULLA ET AL., 2010), sugerindo uma função outrem além da neurotransmissão GABAérgica neuronal. Estudos utilizando *knockout* em camundongos para o gene do GAT-2 detectaram alterações nos níveis plasmáticos de taurina, sugerindo que esse transportador tem um papel relevante no transporte dessa molécula sinalizadora (ZHOU ET AL., 2012).

#### **4. GAT-3**

Junto ao GAT-1, o GAT-3 é um dos subtipos mais expressos no SNC (SCHITINE ET AL., 2015). Apesar de ter uma afinidade por GABA menor em comparação aos demais membros da família, o GAT-3 é amplamente expresso no Sistema Nervoso Central (BORDEN ET AL., 1996), sendo abundante no bulbo olfatório e na retina, seguido dos gânglios basais, septo, tálamo, amígdala, nos colículos e no neocórtex (LEE ET AL., 2015) (Figura 5).



**Figura 6.** Distribuição dos principais GATs no neocórtex visualizadas por imunohistoquímica. Como pode ser visualizado, o GAT-1 é amplamente expresso ao longo das camadas do córtex. O GAT-2, por sua vez, está restrito à primeira camada junto a células epiteliais. O GAT-3 é amplamente distribuído no neocórtex, apesar de qualitativamente apresentar menor marcação em relação ao GAT-1. Fonte: Scimemi et al., 2014

No nível celular, o GAT-3 é tido como um transportador quase exclusivamente glial (MINELLI ET AL., 1996) – sendo expresso em processos astrocíticos, oligodendrócitos e por células de Müller (SCHITINE ET AL., 2007). A localização desses transportadores na região sináptica sugere uma função complementar a do GAT-1 (SCIMEMI ET AL., 2014). Enquanto este último está em contato próximo com a zona ativa da sinapse em comparação ao GAT-3, sugerindo que eles regulam diferentes vias de sinalização do GABA e servem para diferentes propósitos na manutenção dos níveis extracelulares de GABA.

Estudos sobre a regulação da expressão do GAT-3 em retina de aves demonstraram que esse transportador é downregulado a partir de inputs glutamatérgicos que favorecem uma menor captação de GABA, aumentando a disponibilidade extracelular desse neurotransmissor (SCHITINE ET AL., 2015).

Apesar do GAT-3 não estar expresso fisiologicamente na retina de galinha, a sua expressão é acentuada em situações de dano tecidual, sugerindo que esse

transportador participa de algum mecanismo neuroprotetor contra o estresse na retina (SCHITINE ET AL., 2015). Na figura 06 A é demonstrada uma representação tridimensional do modelo de homologia do transportador de GABA humano GAT-1, bem como em B as estruturas do ligante endógeno GABA, ácido R-nipecótico e a droga anticonvulsiva tiagabina.

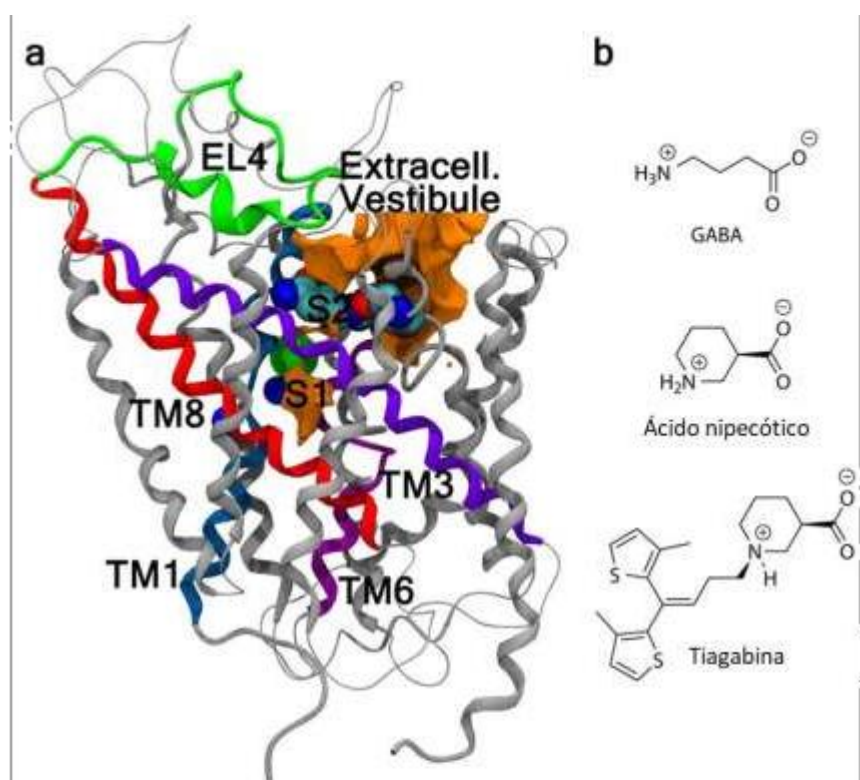


Figura 7 Estruturas tridimensionais do GAT-1 (a) Representação tridimensional do modelo de homologia do transportador de GABA humano GAT-1. As características estruturais mencionadas no texto estão marcadas. S1, o sítio de ligação do substrato; S2, o sítio de ligação secundário/interino; TM1 (TM3, TM6 e TM8), região transmembranar 1 (3, 6 e 8); e EL4, alça extracelular 4. (b) Estruturas do ligante endógeno ácido gama-aminobutírico, GABA, ácido R-nipecótico e a droga anticonvulsiva tiagabina. Modificado (LATICA et al., 2020)

## **1.5 - Importância dos Transportadores de GABA para a fisiologia do SNC**

Os GATs são responsáveis por remover o GABA extracelular e, desse modo, terminar a sinalização GABAérgica – garantindo o ajuste fino dessa comunicação. Ademais, considerando que o SNC de vertebrados possui bilhões de neurônios e ainda mais conexões sinápticas justapostas em um espaço extremamente limitado, a atividade dos GATs é essencial para evitar o extravasamento de GABA da sinapse, garantindo a fidelidade de resposta de um circuito neural. Desse modo, o comprometimento na atividade dos GATs pode causar ou amplificar condições patológicas no sistema nervoso (BORDEN ET AL., 1996). Nesta seção, será brevemente discutido o estado da arte sobre a participação dos carreadores de GABA em condições psiquiátricas e neurodegenerativas.

### **1.5.1 - O papel dos GATs em transtornos neuropsiquiátricos**

Transtornos psiquiátricos são definidos como alterações de pensar, humor e/ou comportamento que comprometem gravemente a qualidade de vida do indivíduo (WARREL ET AL., 2015). Atualmente, os principais transtornos neuropsiquiátricos são os de depressão e os de ansiedade, que acometem 3 e 4% da população, respectivamente (WHO, 2017). Sabe-se que alterações na sinalização GABAérgica fazem parte da fisiopatologia dessas condições.

Diminuições nos níveis extracelulares de GABA em condições de estresse foram descritas em diferentes modelos experimentais (NUSS, 2015; ASSAD ET AL., 2020), o que pode refletir uma queda na liberação ou um aumento na captação desse neurotransmissor. Dentro desse contexto, foi reportado que o estresse crônico induz alterações na expressão de transportadores vesiculares e de membrana de GABA, sugerindo que o transporte dessa molécula de fato participa da patogênese de transtornos relacionados ao estresse (LYDIARD, 2003; MA ET AL., 2016).

Estudos com camundongos *knockout* para GAT-1 demonstraram um fenótipo menos ansioso e menos susceptível ao comportamento tipo-depressivo



em comparação aos controles selvagens (LIU ET AL., 2007), sugerindo que os GATs participam de condições psiquiátricas ao regular a disponibilidade de GABA no ambiente extracelular. Corroborando isso, estudos de caso-controle demonstraram uma associação positiva de polimorfismos no gene que codifica o GAT-1 com a severidade de transtornos de ansiedade (THOERINGER ET AL., 2008).

A relevância da captação de GABA é tamanha para a ansiedade que moduladores farmacológicos do transporte de GABA estão sendo utilizados em ensaios pré-clínicos para o tratamento dessas condições. A tiagabina, um bloqueador do transporte de GABA, apresentou efeito positivo no tratamento de pacientes com distúrbios de pânico (ZWANGER ET AL., 2009), um efeito mais proeminente que ansiolíticos clássicos da classe dos Inibidores da Recaptação de Serotonina, como a paroxetina (CLAUSS ET AL., 2021). Desse modo, a modulação farmacológica do transporte de GABA apresenta-se como uma estratégia interessante no controle dessas condições.

Apesar dessa relevância, pouco se sabe sobre quais as alterações na captação de GABA em transtornos de ansiedade e depressão. Apesar de haver estudos utilizando métodos genéticos e genômicos associando alterações na captação com essas patologias, a literatura carece de trabalhos com ensaios avaliando diretamente a captação de GABA nas diferentes regiões do SNC, assim como quais transportadores estariam por trás das alterações nos níveis extracelulares de GABA. Parte dessa carência deriva de limitações técnicas que falham em avaliar com precisão o transporte de GABA, como será discutido mais a frente.

### **1.5.2 - A captação de GABA em doenças neurodegenerativas**

De acordo com o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, doenças neurodegenerativas são marcadas pela perda de função e morte neuronal excessiva ao longo do tempo (NIH, 2017). Uma das causas mais estudadas dessas doenças é a excitotoxicidade causada pelo excesso de glutamato no ambiente extracelular (LEWERENZ E MAHER, 2015). No estado fisiológico, a ação excitatória do glutamato é contrabalanceada pela inibição provocada pelo GABA – evitando um quadro de hiperexcitabilidade e excitotoxicidade (DO NASCIMENTO ET AL., 1985). Desse modo, é intuitivo

pensar que as doenças neurodegenerativas são marcadas por alterações GABAérgicas que acompanham as alterações glutamatérgicas.

Há quatro principais linhas de investigação demonstrando uma associação entre o sistema GABAérgico e a doença de Alzheimer (DA), considerada a condição neurodegenerativa mais prevalente no mundo: 1) Estudos post-mortem; 2) Estudos ante-mortem; 3) Estudos de imageamento cerebral; 4) Estudos com marcadores GABAérgicos (LANCTOT ET AL., 2004). A primeira categoria é a mais utilizada e demonstrou uma série de alterações nos níveis totais de GABA, assim como alterações na quantidade de receptores de GABA, em especial na região do neocórtex – uma das principais acometidas na doença de Alzheimer (LANCTOT ET AL., 2004). Além disso, o neocórtex de pacientes diagnosticados com essa condição apresenta menores níveis de sítios de captação de GABA, demonstrado por ensaios de binding com o [<sup>3</sup>H]-Ácido nípecótico (SIMPSON ET AL., 1988) – sugerindo alterações não apenas nos receptores, mas na expressão dos transportadores de GABA.

Dentro dessa linha de investigação, foi demonstrado que o perfil de expressão dos GATs é completamente alterado na DA (FUHRER ET AL., 2017), com um aumento significativo nos níveis de BGT-1 no giro denteado do hipocampo, assim como um aumento na expressão de GAT-1 em todas as camadas do neocórtex, acompanhadas por um decréscimo nos níveis de GAT-3 no hipocampo e no córtex entorrinal. Essas alterações abriram o caminho para a ideia de que mudanças no transporte de GABA acompanham a DA, e que talvez haja mecanismos diferenciados de regulação para os diferentes transportadores nessa condição.

Apesar de caracterizado uma mudança na expressão dos GATs, ensaios mensurando o transporte de GABA ainda são escassos na literatura. Apesar de parecer lógico pensar que mudanças na expressão dos transportadores irão repercutir na taxa de transporte, é muito estabelecido que sistemas biológicos são redundantes e geralmente possuem uma série de mecanismos que compensam a perda ou o ganho de funções, de tal modo que a queda nos níveis de um subtipo de transporte pode ser acompanhada pelo aumento na expressão de outro subtipo ou de alterações pós-transcricionais que aumentem a afinidade do sítio de translocação pelo substrato (RITTER, 2020). Desse modo, avaliar o transporte de GABA é essencial para caracterizar o papel da captação deste neurotransmissor na DA.

## 1.6 - Métodos para avaliar a captação de GABA em preparos do Sistema Nervoso Central

Alguns métodos têm sido utilizados para estudar mecanismos funcionais no SNC, estes consideram vários aspectos: como comportamento, morfologia, bem como atividade eletrofisiológica e bioquímica. É importante estudar o SNC com métodos e técnicas confiáveis, para entender melhor a atividade do mesmo, durante condições normais e patológicas (CASTRO, ET AL., 2014). Os resultados desses estudos são importantes para desenhar novas estratégias, tratamentos, medicamentosos e conhecer os mecanismos básicos de ação desses (ROY-BYRNE, 2005)

Algumas técnicas para estudar o SNC podem ser realizadas em tempo real e com resolução espacial precisa, como eletroencefalografia (EEG), ressonância magnética (RM), ressonância magnética nuclear de prótons e biossensores, que podem ser usados para estudar comportamentos e atividade fisiológica (CASTRO, ET AL., 2014). Além de tais métodos, as análises bioquímicas demonstram resultados pertinentes para caracterizar mecanismos de transportes no SNC (MORAES ET AL., 2012)

De acordo com Castro, et al., (2014), a técnica de microdiálise cerebral é o método preferido para monitorar vários neurotransmissores e alterações nestes durante a atividade cerebral, que podem estar relacionadas a um determinado comportamento ou função cerebral alterada. Este procedimento obteve grande impacto nos estudos bioquímicos desde que Delgado et al., o introduziram em 1972. Esta técnica é geralmente acoplada a métodos de CLAE. O tipo de neurotransmissor a ser estudado determina o método de separação e o sistema de detecção que pode incluir: densidade óptica, fluorescência, eletroquímica, luminescência e espectroscopia de massa (MS).

Além dos processos descritos acima, Moraes et al., (2012) demonstrou um método no qual não há utilização de microdiálise para avaliar transporte de neurotransmissor. O procedimento utiliza a técnica de CLAE para mensurar tais níveis, porém a coleta é feita de sobrenadantes após exposição de concentrações conhecidas de analito em tecido retiniano íntegro e o cálculo do valor mensurado segue a equação:  $\Delta_{Analito} = [Analito]_{t_0} - [Analito]_{t_{final}}$ , vale ressaltar que o analito de interesse desse estudo foi o gaba.

O GABA é homogêneo e amplamente distribuído no SNC e tem um papel importante na fisiologia cerebral. A medição precisa e acurada do GABA em fluidos biológicos é importante para o estudo da neurofarmacologia, uma vez que alterações em sua concentração são de relevância em muitas patologias neurológicas como; epilepsia, convulsões, esquizofrenia, ansiedade e transtornos bipolares (SHIAH & YATHAM, 1998). Também o sistema GABAérgico é um dos principais alvos dos anestésicos gerais (MIHIC, ET AL., 1997).

Vários métodos de análise foram desenvolvidos com base nos instrumentos disponíveis, na sensibilidade necessária e nas espécies ou tecidos a serem analisados. Os primeiros métodos utilizados foram papel e cromatografia em coluna (CLARK, ET AL., 2007). A presença de GABA in vivo pode ser determinada de três maneiras. A primeira requer uma coleta de amostra realizada através do procedimento de microdiálise, push-pull ou push-pull de baixo fluxo (CASTRO, ET AL., 2014).. A segunda opção consiste na quantificação in vivo e in situ via implantação de microsensores ou microeletrodos; e a terceira opção são as técnicas de imagem não invasivas in vivo, que permitem a detecção de metabólitos em humanos (O'GORMAN, 2011), como a ressonância magnética funcional (fMRI) e a tomografia por emissão de pósitrons (ROBINSON, ET AL., 2008)

A medição direta de GABA no SNC enfrenta vários desafios significativos, uma vez que não é fluorescente nem eletroativo e é difícil de detectar por reações enzimáticas porque não foi encontrada uma oxidase ou hidrogenase. A detecção de GABA por fluorescência e métodos eletroquímicos requer derivatização usando diferentes reagentes com alguns compostos fluorogênicos (REA, ET AL., 2005).

Além destes a captação de GABA é geralmente mensurada utilizando GABA radioativamente marcado com trício – um isótopo de hidrogênio ( $[^3\text{H}]$ -GABA) – ou com carbono 14 ( $[^{14}\text{C}]$ -GABA). O princípio da técnica consiste em incubar, por um certo tempo, a preparação biológica com o GABA marcado e depois quantificar quanto do GABA radioativo entrou nas células (DO NASCIMENTO ET AL., 1985).

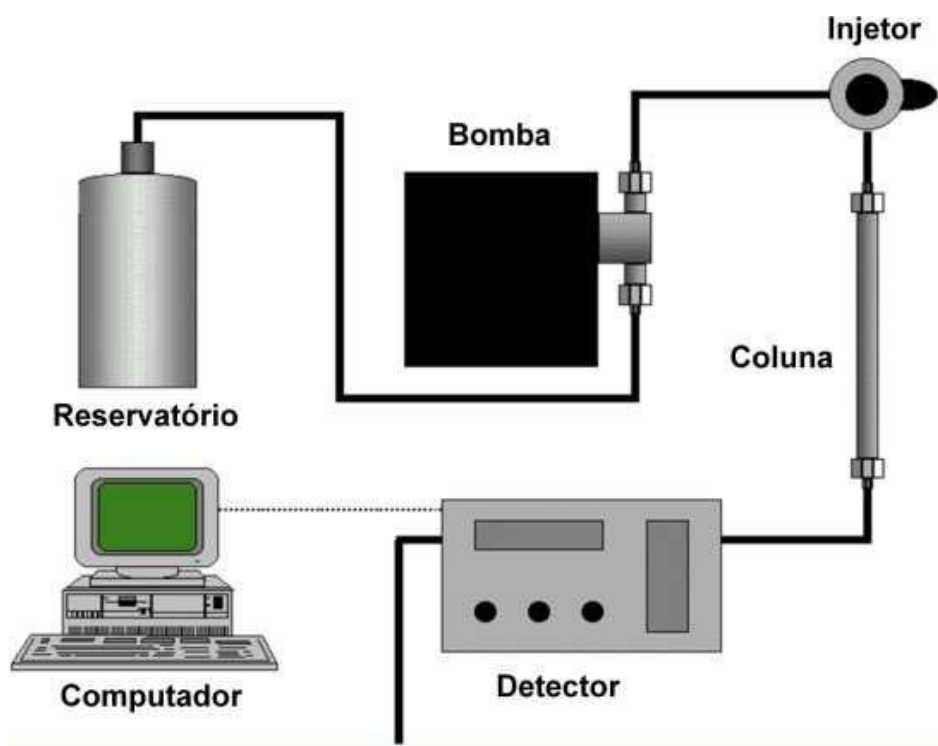
Outro aspecto interessante para a medição direta de GABA são os poucos relatos sobre biossensores do mesmo. Isso provavelmente se deve à baixa sensibilidade e a um limite de detecção insuficiente para determinar o GABA em fluidos fisiológicos (CASTRO, ET AL., 2014)

Dentro desse contexto, técnicas alternativas são utilizadas para avaliar o

transporte de GABA. Dentre essas técnicas, a Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (CLAE) se destaca como uma das principais. A CLAE é um método físico-químico de separação, no qual os constituintes de determinada amostra interagem com um solvente (Fase móvel), que 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 é realizada. Posteriormente tais componentes são identificados e quantificados por distintos sistemas de detecção como, por exemplo, espectrofotômetro UV/Vis, o fluorímetro e detector eletroquímico (MALVIYA, ET AL., 2009)

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).

A



**B**

**Figura 8. A)** Esquema representativo da Cromatografia Líquida de Alta Eficácia, mostrando os diferentes componentes do equipamento: Bomba, injetor, coluna, detector de fluorescência, e um computador com o software para controle das operações. **B)** Foto real do CLAE do Laboratório de Neurofarmacologia Experimental (ICB/UFPa), utilizado ao longo deste trabalho.

No contexto biológico do presente trabalho, a CLAE se apresenta como um método vantajoso devido a: 1) sua capacidade de detectar GABA endógeno, 2) elevada sensibilidade, permitindo dosar neurotransmissores na escala do picomolar; 3) maior estabilidade no armazenamento das amostras. Ademais, trabalhos anteriores já caracterizaram a eficiência da CLAE na determinação da captação de glutamato, demonstrando a utilidade deste método na avaliação do transporte de neurotransmissores (MORAES ET AL., 2011).

Apesar das suas vantagens, não é padronizado um método que a utilize para avaliar a captação de GABA em preparações do tecido nervoso central por meio da CLAE – o que representaria um avanço nos estudos de transporte de GABA em diferentes contextos do SNC. Desse modo, o presente trabalho

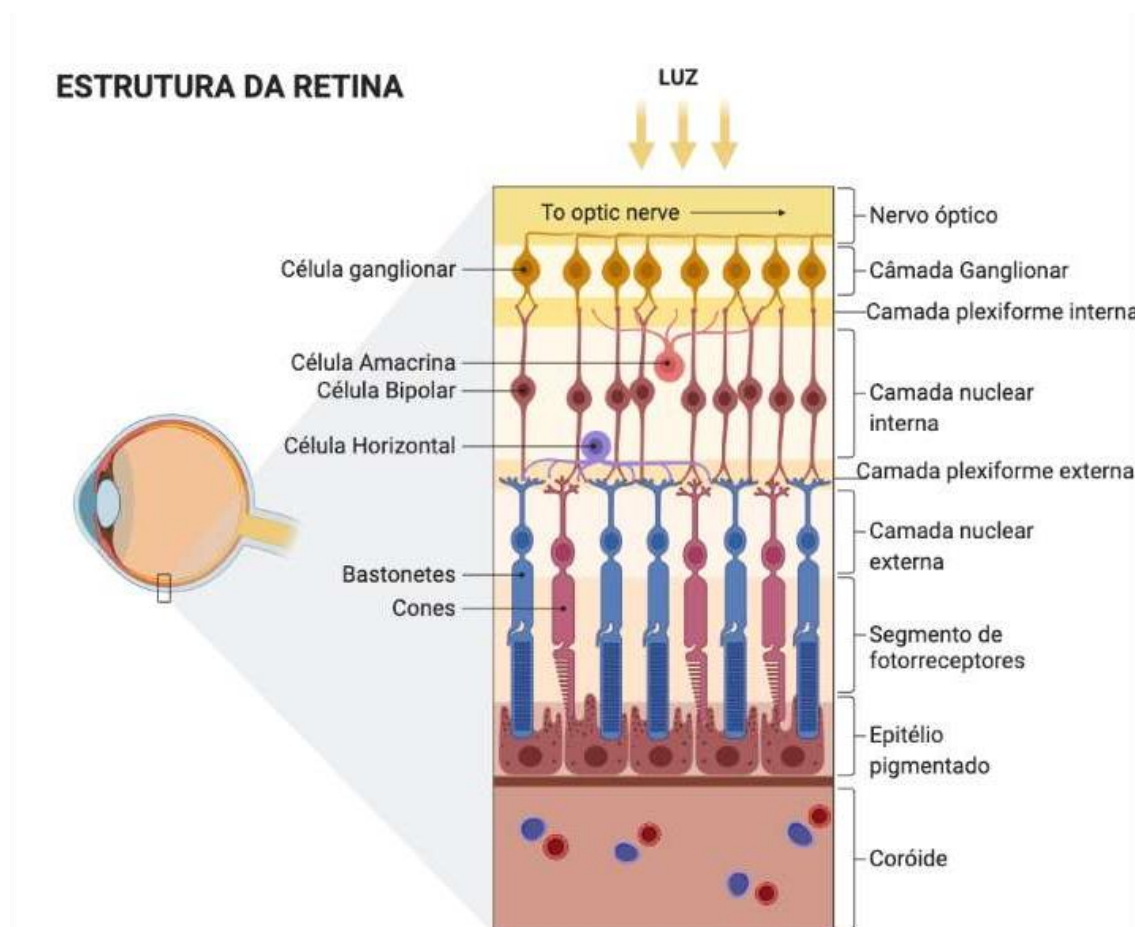
buscou desenvolver um protocolo de avaliação da atividade dos GATs em preparações de retina de embrião de galinha.

### **1.7 – A retina de embrião de galinha como modelo para ensaios neuroquímicos**

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). Na figura 7 está representada uma imagem ilustrativa da organização celular retiniana.





**Figura 9.** Representação das diferentes camadas da retina e dos diferentes tipos celulares que compõem esse tecido. A retina de vertebrados é composta por 6 camadas principais: Camada ganglionar, camada plexiforme interna, camada nuclear interna, camada plexiforme externa, camada nuclear externa, segmento de fotorreceptores. Além disso, junto à retina está o epitélio pigmentado. Imagem original.

Dados morfológicos, metabólicos e eletrofisiológicos indicam que a retina isolada mantém praticamente todas as suas atividades fisiológicas (DE MELO REIS ET AL., 1995; CALAZA E GARDINO, 2010). É um excelente modelo para avaliar a fisiologia e função dos transportadores de aminoácidos (DO NASCIMENTO ET AL., 1985; DE FREITAS ET AL., 2016). O estudo do tecido *in vitro* (assim como acontece com fatias cerebrais) permite ao observador expor as células de retina às 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).

No que tange a captação de GABA, a retina de embrião de galinha apresenta os dois principais GATs do SNC: O GAT-1 e o GAT-3 (SCHTINE ET AL., 2015), além de possuir uma estrutura altamente definida que permite a caracterização de métodos bioquímicos com maior qualidade. Estudos em culturas purificadas de glia de Müller

caracterizam o transporte de GABA por essas células como possuindo as mesmas propriedades biofísicas do transporte observado nas demais regiões do SNC: Dependente de temperatura, dependente de sódio e cloro, e sensível a agentes farmacológicos como o ácido nipecótico (SCHTINE ET AL., 2007). Desse modo, o presente trabalho utilizará a retina como um modelo experimental para caracterizar a cinética de captação de GABA determinada por CLAE.

## 2 - OBJETIVO GERAL

- Desenvolver metodologia analítica para avaliar o transporte de GABA na retina.

### 2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os parâmetros analíticos necessários (linearidade, curva de calibração, tempo de retenção, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade para quantificar o aminoácido GABA na matriz de análise;
- Determinar a concentração de GABA 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 GABA e tempo de exposição;
- Verificar a aplicabilidade do método de captação nas situações, considerando a presença de sódio, diferentes temperaturas e frente um bloqueador do transportador de GABA.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

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

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

Importante ressaltar que devido a escolha deste método optar por não trabalhar com procedimentos de extração de material de análise do conteúdo intracelular, a matriz estudada será a solução de Hank, com concentrações de gaba. Além disso as coletas foram feitas do sobrenadante após exposição ao tecido e avaliadas nos tempos preestabelecidos, de acordo com a equação:  $\Delta Gaba = [Gaba]_{t_0} - [Gaba]_{t_{final}}$

#### 3.2 - CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÁCIA

Utilizou-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, composto por bomba, modelo LC20-AT, detector de fluorescência, modelo RF-10Axl, degaseificador, modelo DGA-20A5, módulo comunicador, modelo CBM-20A acoplado a microcomputador com software de integração *Labsolution*, 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 microsseringa de 50 µL (Hamilton). Para padronização do método de quantificação de GABA, foram adotados os critérios de qualidade estabelecidos pela ANVISA – a fim de garantir a qualidade das análises experimentais (BRASIL, ANVISA, 2017).

### **3.3 - Reagentes**

Foi utilizado metanol grau CLAE (Merck). 2-propanol acetato de sódio, ácido acético, ácido bórico, ácido nípecótico, o-phthaldehyde (OPA), N-acetilcisteína, GABA e L-homoserina foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### **3.4 Padrões**

#### **3.4.1 Soluções estoque**

As soluções estoque de GABA e padrão interno, foram preparadas pela dissolução dos respectivos aminoácidos em água ultra pura para a obtenção das concentrações de 9.7 mM para o GABA e 4.85 mM para a homoserina.

#### **3.4.2 Solução intermediária**

A solução estoque de GABA foi diluída em água ultra pura com o objetivo de se obter a concentração de 0.97 mM

#### **3.4.3 Soluções de trabalho**

Foram efetuadas soluções de trabalho a partir de diluições da solução intermediária em água ultra pura a fim de se obter as seguintes concentrações: 0,97; 4.85; 9.7; 24.25; 48.5; 97 e 194  $\mu$ M.

#### **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 290  $\mu$ M.

#### **3.4.5 Soluções de calibração**

As soluções de calibração foram preparadas a partir de uma solução estoque Hank (GABA na concentração de 4.85 mM), para a obtenção das concentrações de 4.85; 9.7; 24.25; 48.5; 97 e 194  $\mu$ M.

#### **3.4.6 Soluções controle**

Para o preparo das soluções controle, foram feitas alíquotas a partir do GABA na concentração de 4.85 mM e diluído em solução de Hank, a fim de se obter concentrações de 48.5; 97 e 194  $\mu$ M.

### 3.5 Condições cromatográficas

As amostras obtidas foram injetadas, após processo de derivatização descrito posteriormente, em um sistema CLAE apresentando fase móvel com gradiente (Tabela 4) composto por fase A tampão acetado de sódio 50  $\mu$ M, 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 1,0 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 GABA encontra-se exposto na tabela 5.

**Tabela 4.** Descrição dos gradientes das Fases móveis compostas por fase A (Tampão acetado de sódio 50 mM), metanol 5% e propanol 1.25% . pH 5,67. Fase B metanol 70 %, fluxo de 1,0 ml/min, eluição de 25 minutos

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

**Tabela 5.** Descrição dos padrões cromatográficos utilizados para caracterizar a captação de GABA no tecido retiniano: Fases móveis, coluna analítica, fluxo, temperatura, agente derivatizante, tipo de detector, tempo de corrida e analito quantificado.

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
Tipo de Detector	Fluorescência (excitação 340 nm e emissão 460 nm)
Tempo de Corrida	25 minutos
Analito quantificado	GABA



### **3.6 Derivatização**

O processo de derivatização tem por objetivo aumentar a sensibilidade de detecção, sendo assim é um procedimento utilizado em cromatografia. 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 misturou-se 16,3 mg de N-acetilcisteína, 13 mg de OPA e 300 µL de metanol. Nessa reação o OPA ligou-se ao grupamento tiol da cisteína. Após isso, foi mantido o repouso por 30 minutos para formação do complexo “OPA + cisteína.”

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

O complexo “OPA + cisteína” uma vez misturado aos aminoácidos de interesse (GABA ou homoserina) formou o derivado isoindol. Esse foi o composto que emitiu 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 1ª solução, essa 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 5 minutos antes de aplicar no cromatógrafo.

### **3.7 Processo 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 e estabilidade.

#### **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 as condições cromatográficas previamente estabelecidas. A concentração de GABA para determinação do seu tempo de retenção foi obtida a partir da solução intermediária e homoserina 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 por um processo descrito no item 3.6.2, elas foram injetadas no cromatógrafo líquido sob as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 1. Em seguida os valores das relações das áreas do GABA e do padrão interno foram projetados no eixo das ordenadas e as concentrações do analito no eixo das abscissas. A análise de regressão linear foi utilizada para determinar o coeficiente de correlação e a equação de reta. Os ensaios foram em triplicata.

#### **3.7.4 Curva de calibração**

As soluções de calibração após passarem por um processo descrito no item 3.6.2, foram injetadas no cromatógrafo líquido sob as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 4. As relações das áreas de GABA 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 duplicata ou 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 nesse caso foi observado pela diferença do ruído da linha de base (relação sinal-ruído). Após as soluções de trabalho passarem por um processo descrito no item 3.6.2, injetou-se no cromatógrafo líquido sob as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 5. Este procedimento foi determinado a partir das sucessivas soluções diluídas de GABA 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 por um processo descrito no item 3.6.2, elas foram injetadas no cromatógrafo líquido sob as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 1. Para tal avaliação utilizou-se concentrações de GABA superiores e iguais a concentração encontrada no 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 será determinada a partir das soluções controles, que após passar por processo descrito no item 3.6.2, foi injetada no cromatógrafo líquido sob as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 5. Os ensaios foram feitos em triplicata 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

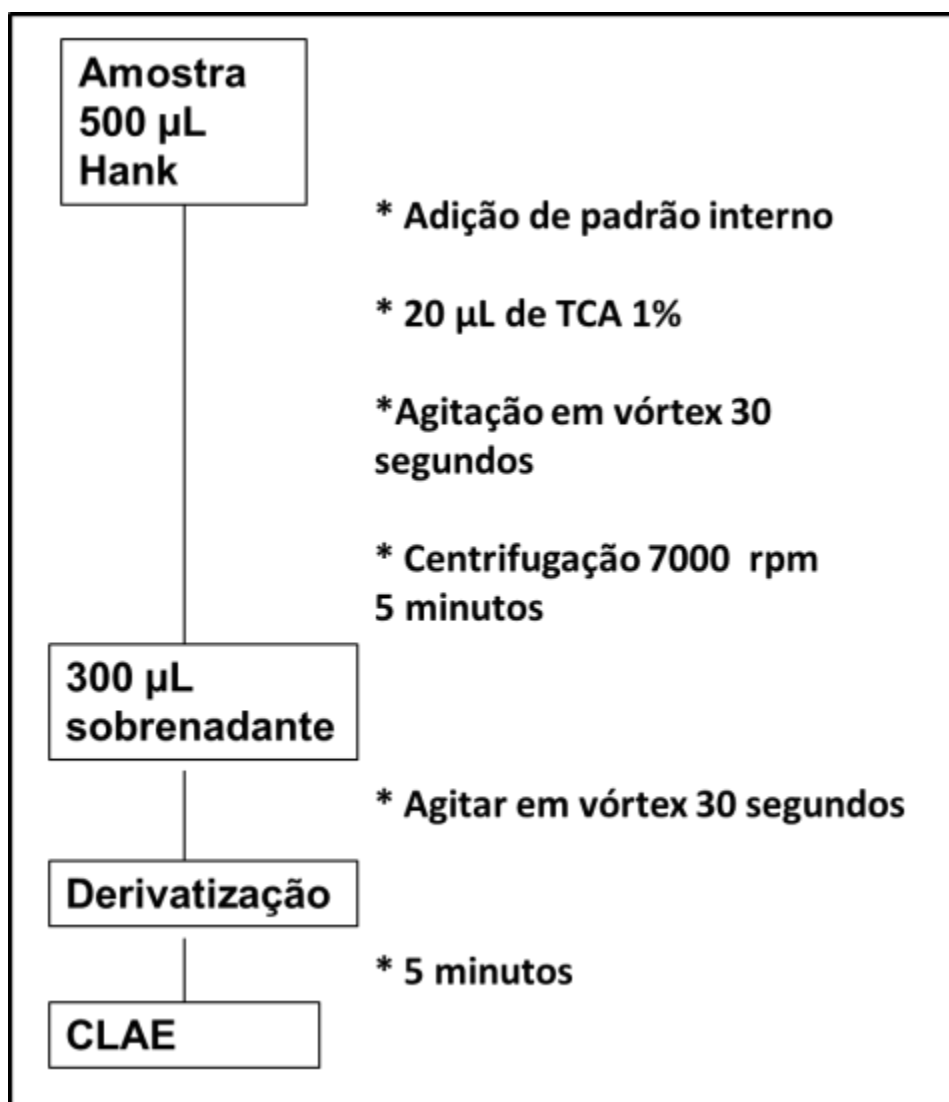
É a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão do método foi avaliada pelo coeficiente de variação intra-ensaio e inter-ensaio, utilizando-se as

soluções controles, após os processos descritos no item 3.6.2 e sob as condições descritas na tabela 5. Os ensaios foram realizados em triplicata durante três dias consecutivos.

### 3.7.8 Ensaio de recuperação

A recuperação do analito indica o quanto foi perdido durante as diversas etapas ocorridas durante procedimentos de preparo da amostra. A recuperação do presente método foi determinada a partir das soluções controles que foram mensuradas após os diferentes processos de tratamentos descritos no fluxograma apresentado na figura 9, e seguindo os procedimentos do item 3.6.2 e condições estabelecidas na tabela 5. 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 10.** Fluxograma do procedimento analítico para preparação das amostras para detecção de GABA por CLAE. As amostras são tratadas com ácido tricloroacético a 1% para decantar proteína e centrifugadas a 7000 rpms. 300 microlitros do sobrenadante é coletado e derivatizado com OPA por 5 minutos para então ser injetado no CLAE.

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

#### **3.8.1 Análise do tempo de retenção antes e após incubação no tecido retiniano (seletividade comparando matrizes de análises com e sem GABA).**

A verificação da seletividade do método foi determinada de acordo com os procedimentos realizados no item 3.1, porém, antes de realizar tais procedimentos uma solução de gaba diluída em Hank's, na concentração de 50  $\mu$ M foi injetada no cromatógrafo, seguindo os parâmetros exposto na figura 10. A seguir fez-se a incubação de GABA no tecido a uma concentração conhecida (50 $\mu$ M), em um volume total de 500  $\mu$ L para cada poço, 37 °C de temperatura, mantido em estufa de CO<sub>2</sub> por 30 minutos, sendo realizadas as coletas do sobrenadante num volume de 300  $\mu$ L do meio de incubação. Posteriormente, as amostras foram acrescidas do padrão interno, com posterior acréscimo de Ácido Tricloroacético (TCA) a 1% para precipitação de proteínas com posterior centrifugação do material a 7.000 RPM (rotações por minuto) por um período de 5 minutos. Por fim, as colheitas do sobrenadante foram exposta ao CLAE para quantificação de GABA remanescente no meio de incubação. Os resultados são expostos na figura 11

#### **3.8.2 Curso temporal de captação de GABA na retina**

Para a determinação do processo de curso temporal de captação de GABA no tecido nervoso, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 3.1, a seguir fez-se a incubação de GABA no tecido a uma concentração conhecida (100 $\mu$ M), em um volume total de 2 mL para cada poço, 37 °C de temperatura, mantido em estufa de CO<sub>2</sub> por 30 minutos, sendo realizadas coletas de 500  $\mu$ L do meio de incubação a cada 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram acrescidas do padrão interno, com posterior acréscimo de Ácido Tricloroacético (TCA) a 1% para precipitação de proteínas com posterior centrifugação do material a 7.000 RPM (rotações por minuto) por um período de 5 minutos. Por fim, as colheitas de 300  $\mu$ L do sobrenadante foram realizadas para quantificação de GABA remanescente no meio de incubação. A figura 10 mostra o fluxograma do procedimento analítico. Ensaios realizados em triplicata.

### 3.8.3 Cinética de captação de GABA ( $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$ )

Para avaliar a cinética de captação de GABA no tecido retiniano, foi adotado o mesmo procedimento do ítem 3.1 e as mesmas condições descritas em 3.5 e seguindo o mesmo processo de determinação analítica apresentado na figura 9. As retinas dissecadas foram expostas as diferentes concentrações de GABA (50-2000,  $\mu\text{M}$ ) para se obter um ponto de saturação da captação, sendo o tempo de análise aquele em que houver a captação máxima pré-estabelecida. A seguir os valores referentes à constante da cinética enzimática foram determinadas, Michaelis-Mentem ( $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ ), com o auxílio do programa Graphpad Prisma V9.0.

### **3.8.4 Aplicabilidade do método**

#### **3.8.4.1 Captação de GABA em função da presença de sódio**

Com o objetivo de verificar a aplicabilidade da metodologia com relação a captação de GABA em meio contendo sódio ou não, foi determinada a captação do mesmo no tecido nervoso com solução de Hank com  $\text{NaCl}$  (Hank cloreto de sódio) ou  $\text{LiCl}$  (Hank cloreto de lítio). As retinas foram dissecadas conforme descrito no item 3.1 e submetidas às mesmas condições descritas no item 3.5 e seguindo o mesmo processo de determinação analítica apresentado na tabela 5. Realizou-se incubações à concentração conhecida de GABA a  $100 \mu\text{M}$  na retina, no tempo de captação máxima que nesse caso foi de 30 min. Os ensaios foram em triplicata.

#### **3.8.4.2 Captação de GABA em diferentes temperaturas**

Seguindo o mesmo procedimento do item 3.1, foram estabelecidos três grupos de tratamento. No primeiro grupo, o ensaio de captação de GABA foi realizado a temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . O segundo grupo foi exposto a uma temperatura não fisiológica ( $8^\circ\text{C}$ ) e o terceiro grupo o ensaio de captação GABAérgica foi realizada em um ambiente também não fisiológico ( $0^\circ\text{C}$ ). Ensaios realizados em triplicata.

#### **3.8.4.3 Ensaios de captação frente a um antagonista do transporte de GABA**

Seguindo o mesmo procedimento do item 3.1, foi realizada uma curva de captação de GABA frente a um antagonista do transportador GAT, o RS-ácido nipecótico. As retinas foram co-incubadas com GABA ( $100 \mu\text{M}$ ) com ácido nipecótico (2 e 5 mM) 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 cinco 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, foram separados em tubos de 1,5 mL, homogeneizado de 500µL de amostra de tecido em de hidróxido de sódio (NaOH 1N). Após no mínimo 24 horas em temperatura ambiente, as amostras foram pipetadas em microplaca de 96 poços e permitidas para reagir com o corante de Bradford por 5 minutos, onde foram então lidas por leitor de microplaca no comprimento de onda de 595 nm. Os valores de mg de proteína nas amostras foram determinados a partir de uma curva de concentração de albumina bovina séria (0.1, 0.0875, 0.075, 0.05, 0.025, 0.0125, 0 mg/mL) lida concomitantemente às amostras.

### 3.10 Análise estatística

Para a avaliação estatística, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste Tukey do programa BIOESTAT 5.0 (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

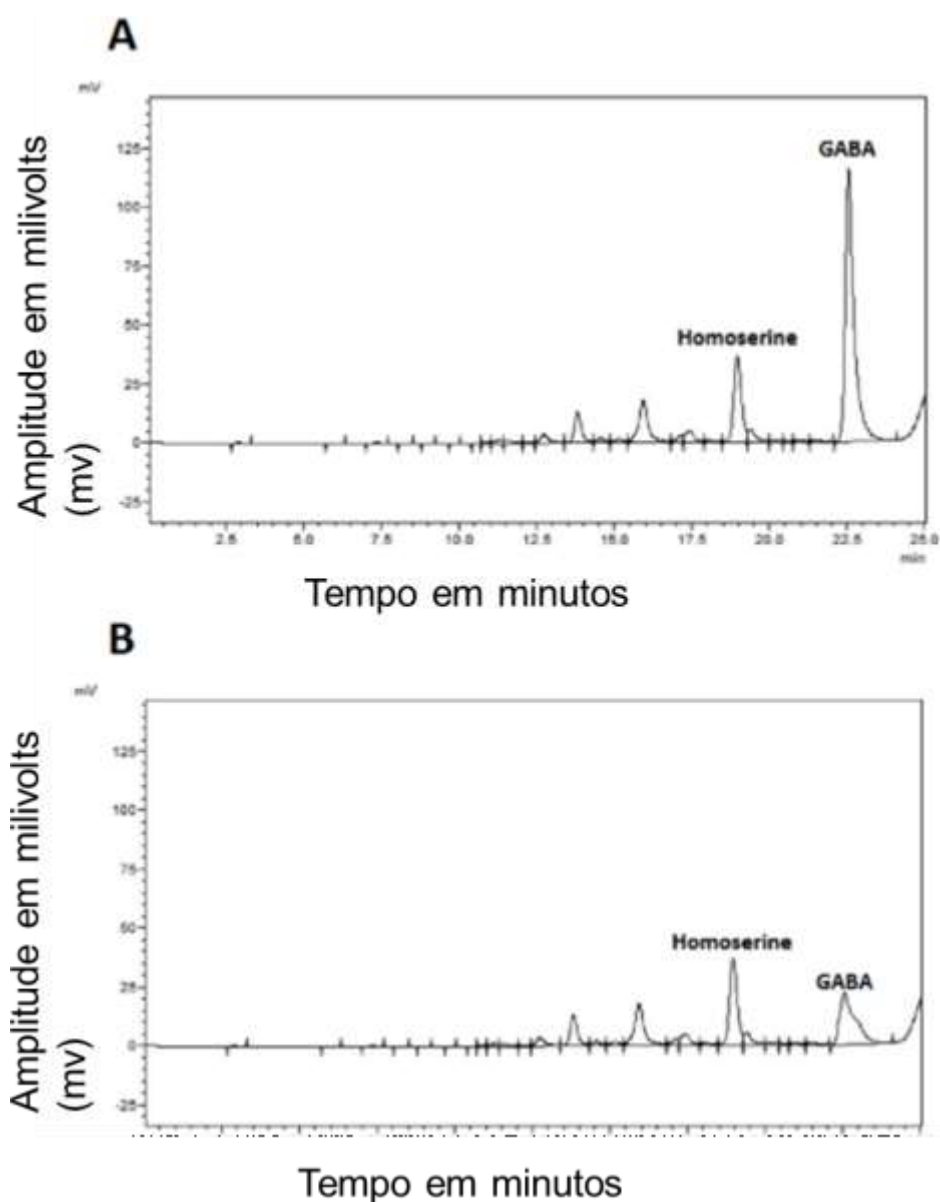
Com o auxílio do programa GraphPad Prism, V9.0, a análise de regressão não-linear foi utilizada para determinar as constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$  e  $V_{máx}$ )

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Validação do método para quantificar GABA.**

#### **4.1.2 Seletividade**

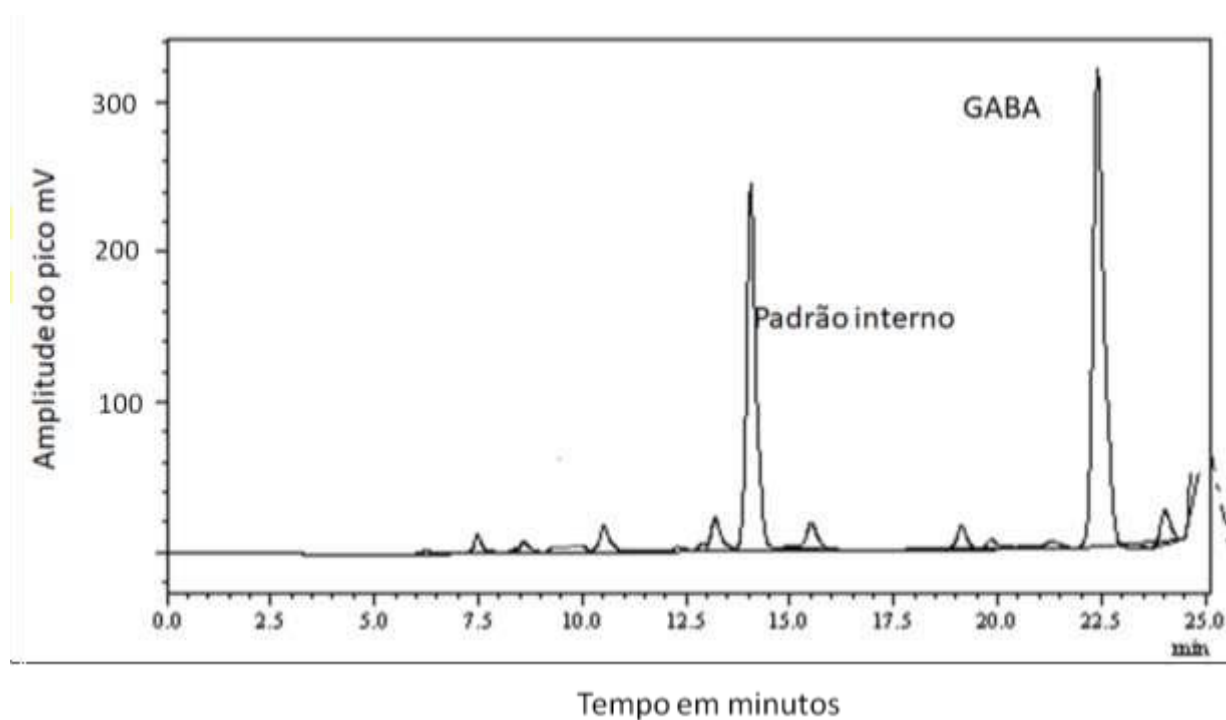
A seletividade do método nas condições cromatográficas estabelecidas demonstra os picos de padrão interno e gaba antes e após incubação no tecido retiniano. Pode-se perceber que antes de ser incubado o pico de gaba aparece numa amplitude maior que em relação aquele que foi exposto por 30 min na retina. Verificou-se que tal diminuição está correlacionada com a captação de gaba.



**Figura 11.** Seletividade do GABA e homoserina medido por detecção de fluorescência por CLAE. (A) Cromatograma representativo mostrando picos de gaba e homoserina antes da incubação no tecido retiniano. (B) Representação do cromatograma mostrando picos de gaba e homoserina após a incubação em tecido retiniano.

### 4.1.3 Tempo de retenção

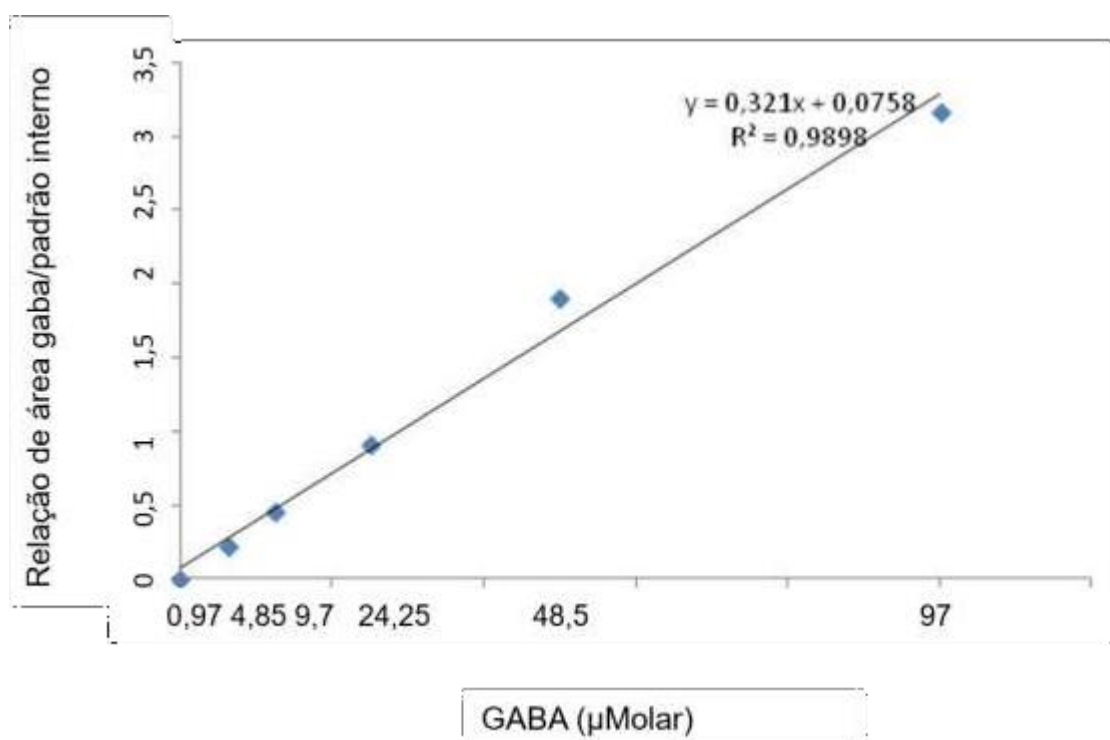
O tempo de retenção dos aminoácidos padrão interno e GABA nas condições cromatográficas padronizadas foi de 14,5 e 22 minutos, respectivamente, como demonstrado na Figura 12.



**Figura 12.** Tempo de retenção em minutos do GABA e padrão interno (Homoserina) nas condições cromatográficas estabelecidas. Amplitude do pico expressa em milivolts.

#### 4.1.4 Linearidade

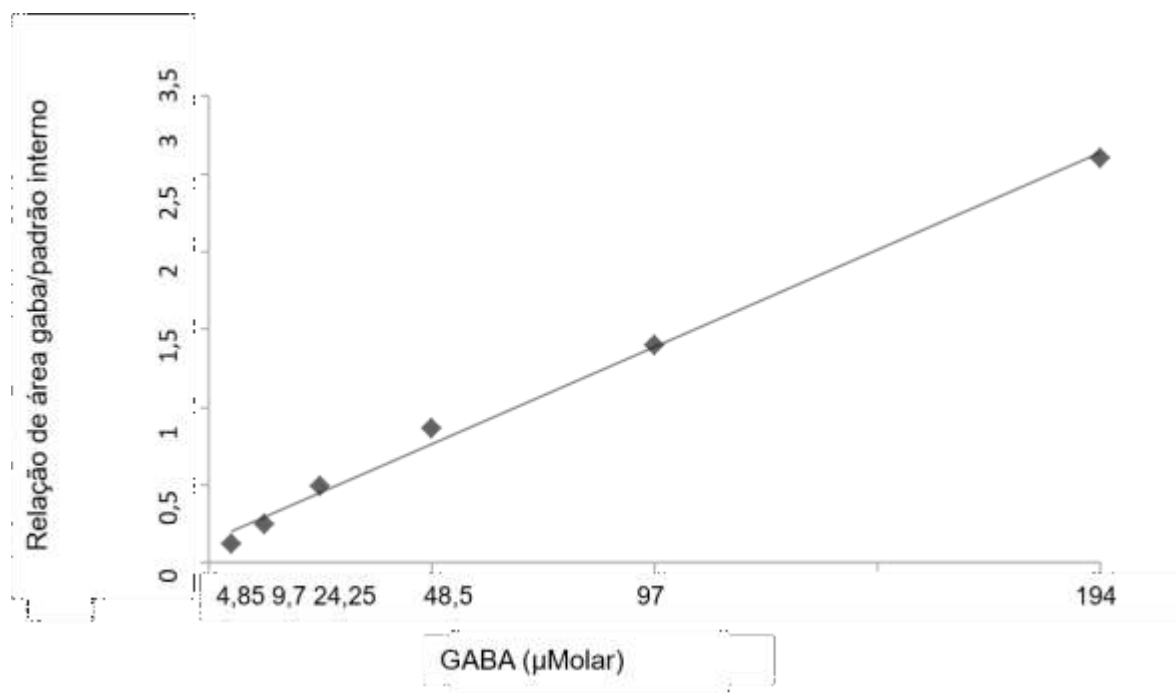
Utilizando-se as soluções de trabalho observou-se que a resposta do detector foi diretamente proporcional as concentrações de GABA de 0,97 a 97  $\mu$ molar, com equação da reta  $y = 0,321x + 0,0758$  e coeficiente de correlação igual a 0,9898. Os valores calculados foram feitos com a relação de área do pico do aminoácido GABA em relação a homoserina.



**Figura 13.** Curva de linearidade. As concentrações variaram de 0,97 a 97  $\mu$ molar. No eixo das ordenadas a relação de área do pico do GABA e padrão interno e nas abscissas as diferentes concentrações de GABA em micromolar.

#### 4.1.5 Curva de calibração

A curva de calibração foi realizada a partir das soluções de calibração contendo GABA nas concentrações de 4.85, 9.7, 24.25, 48.5, 97 e 194  $\mu$ molar, posteriormente as relações de área do pico do GABA e do padrão interno, foram calculados e projetados no eixo das ordenadas e as concentrações no eixo das abscissas. Curva apresentada na figura 10. Os valores do coeficiente de correlação para a curva de calibração foi de 0,9898 e equação da reta  $y = 0,125x + 0,136$



**Figura 14.** Curva de calibração em solução de Hank. As concentrações variaram de 4.85 a 194 µmolar. No eixo das ordenadas a relação de área do pico dos padrões de GABA e padrão interno e nas abscissas as diferentes concentrações de GABA.

#### 4.1.6 Limites de detecção e quantificação

O LD do método foi determinado depois de sucessivas injeções de soluções de trabalho de GABA (4.85  $\mu\text{M}$ ) e as posteriores injeções com concentrações inferiores a esta. O resultado para o LD foi de 0,291  $\mu\text{molar}$ , com um coeficiente de variação de 25%. O LQ foi determinado a partir de soluções de calibração diluídas contendo GABA nas concentrações de 4.85; 0.97 e 0.291  $\mu\text{molar}$ . O valor para o LQ do método foi de 0.873  $\mu\text{molar}$  com coeficiente de variação de 5% e desvio padrão de 0,099. Os valores estão apresentados na tabela 06.

#### 4.1.7 Exatidão

Os valores de exatidão intra e inter-ensaios do método obtidos a partir das soluções controles de GABA, foram determinados pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, valores expressos em percentagem mostrados na tabela 07. Os ensaios foram feitos em triplicata durante três dias consecutivos.

#### **4.1.8 Precisão**

As soluções controles de glutamato 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 07. Os ensaios foram feitos em triplicata durante três dias consecutivos.

#### **4.1.9 Recuperação**

A recuperação do método foi determinada a partir de soluções controle de GABA em três diferentes concentrações, baixa, média e alta (9.7, 97 e 194  $\mu$ molar, respectivamente) após serem expostas a processos de tratamento conforme mostrado na figura 8. Os resultados da recuperação do método são apresentados na tabela 07.

#### **4.1.10 Estabilidade**

Os testes de estabilidade em condições ambientes e de congelamento/descongelamento estão expressos na tabela 08 e mostram que o GABA é estável nas condições impostas (mimetizando as reais condições de manuseio e análise das amostras). O teste de estabilidade de GABA foi executado em três concentrações diferentes (baixa, média e alta). Além disso, o processo foi realizado em temperatura ambiente por 24h e estabilidade de congelamento/descongelamento, ciclo de 48 h (estocado a -20 °C).



## Calibração de gaba no tecido retiniano por CLAE-detector de fluorescência

Análito	Padrão interno	Equação <sup>a</sup>	(R <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	Calibração (µmolar)	LD <sup>c</sup> (µmolar)	LQ <sup>d</sup>	TR <sup>e</sup> (min)
Gaba	Homoserina	Y=0,125x + 0,136	0,9898	4,85 a 194	0,291	0,873	22

a Curva de calibração efetuada pela razão entre a área sob o pico correspondente ao gaba e a área correspondente à homoserina. A curva de calibração foi derivada de sete pontos (n = 5).

b Coeficiente de correlação.

c LD se refere ao limite de detecção (µmolar).

d LQ se refere ao limite de quantificação (µmolar).

e Tempo de retenção do gaba.

Tabela 6

Determinação de gaba por CLAE – detector de fluorescência: exatidão, precisão e recuperação em três concentrações diferentes (9.7, 97 e 194  $\mu$ molar, baixa, média e alta, respectivamente).

Gaba	Precisão (CV%) <sup>a</sup>		Exatidão (%) <sup>b</sup>		Recuperação <sup>c</sup>
	Intra ensaio	Inter ensaio	Intra ensaio	Inter ensaio	
Baixo	4.9	5	101	105	99.5
Médio	9	2.2	95	97.5	99.6
Alto	7	3	99	96	99.6

a Para ambos os testes de precisão, os valores foram em percentagem do CV.

b Os valores de precisão foram determinados como a razão entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

c A recuperação foi determinada a partir da solução controle e o resultado foi calculado como a relação entre o valor obtido e o valor adicionado como uma percentagem.

Tabela 7.

Determinação de Gaba por CLAE-detector de fluorescência: resultados de validação na estabilidade

Analito <sup>a</sup>	Estabilidade (%) <sup>b</sup>			Estabilidade de congelamento-descongelamento (%) <sup>c</sup>		
	Baixa	Média	Alta	Baixa	Média	Alta
Gaba	93	109	111	108	95	103

a Concentração de Gaba 9.7, 97 e 194 µmolar.

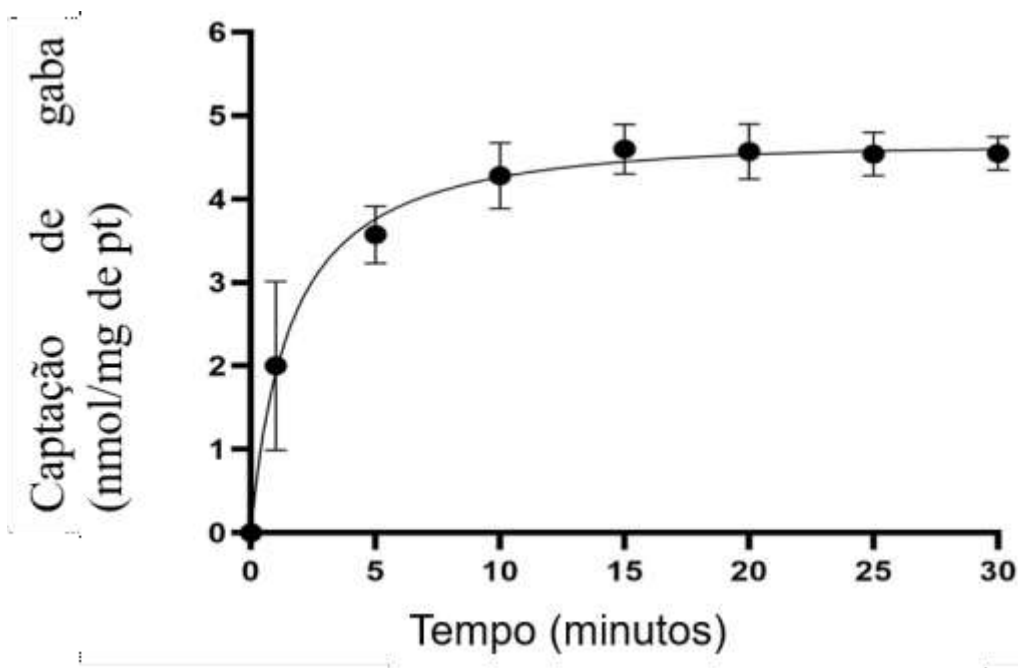
b Estabilidade após 24h em temperatura ambiente.

c Estabilidade após o processo de congelamento e descongelamento (ciclo de 48 h estocado a -20 °C e o analito descongelado em temperature ambiente.

Tabela 8

## 4.2 Curso temporal de captação de GABA na retina

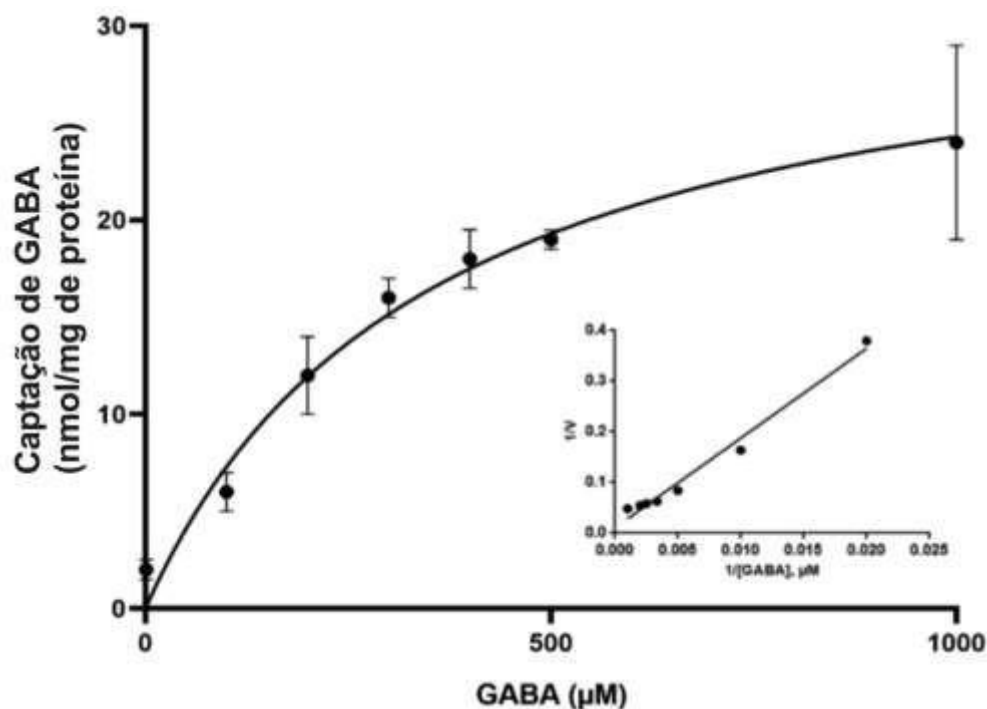
A captação de GABA ocorreu em diferentes intervalos de tempo. Do tempo inicial 0 até o intervalo de 2' e 5', notou-se uma diminuição da concentração extracelular de GABA em torno de 70%. Posteriormente, foi analisada a concentração de GABA um período de 10' e 15' (minutos), quando a captação alcançou seu nível máximo, seguindo a partir de então uma saturação da captação nos intervalos de tempo de 20 e 25 minutos (Figura 13).



**Figura 15.** Curva temporal da captação de GABA. O GABA (100  $\mu$ M) apresentou uma saturação no transporte a partir de 10 minutos de incubação em retina embrionária.

### 4.3 Cinética de captação de GABA na retina (Km e Vmáx)

Os valores de  $K_m$  e  $V_{máx}$  para o transporte de GABA no tecido retiniano foram  $382,4 \mu\text{M}$  e  $34 \text{ nmol/mg proteína/minuto}$ , respectivamente, resultados mostrados na figura 12.

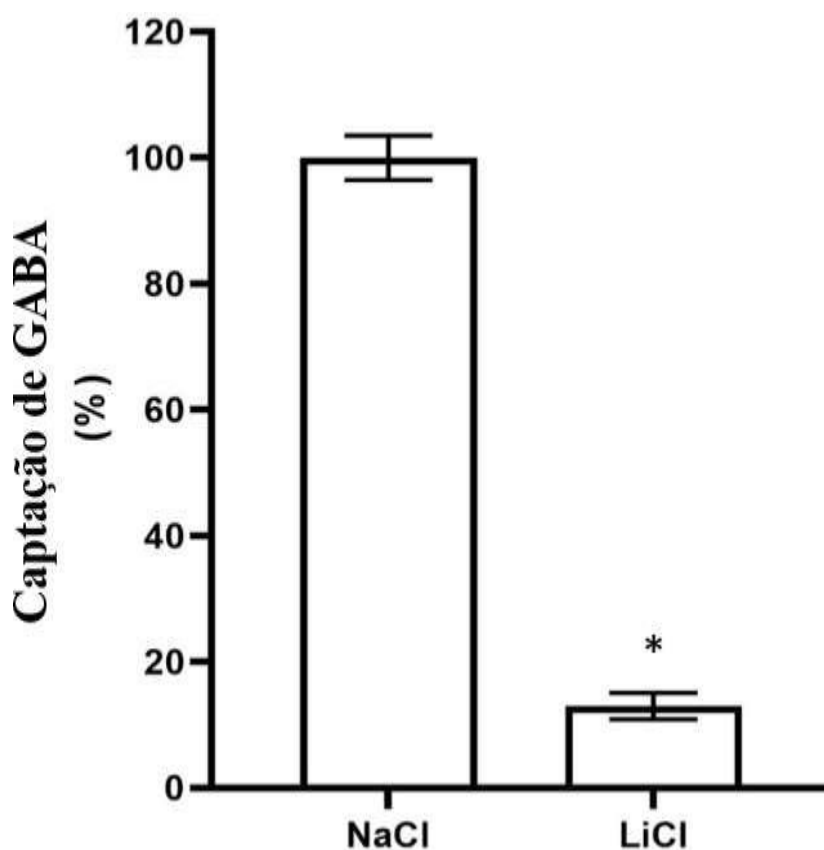


**Figura 16.** Cinética da captação de GABA em tecido retiniano. Os resultados demonstram uma saturação da curva concentração-dependente em explant de retinas E7 expostas a diferentes concentrações de GABA. O inserte se refere ao plot de Lineweaver-Burk e os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  são  $382 \mu\text{M}$  e  $34 \text{ nmol/mg proteína/min}$

#### 4.4 Aplicabilidade do método: Avaliação das propriedades biofísicas do transporte de GABA

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

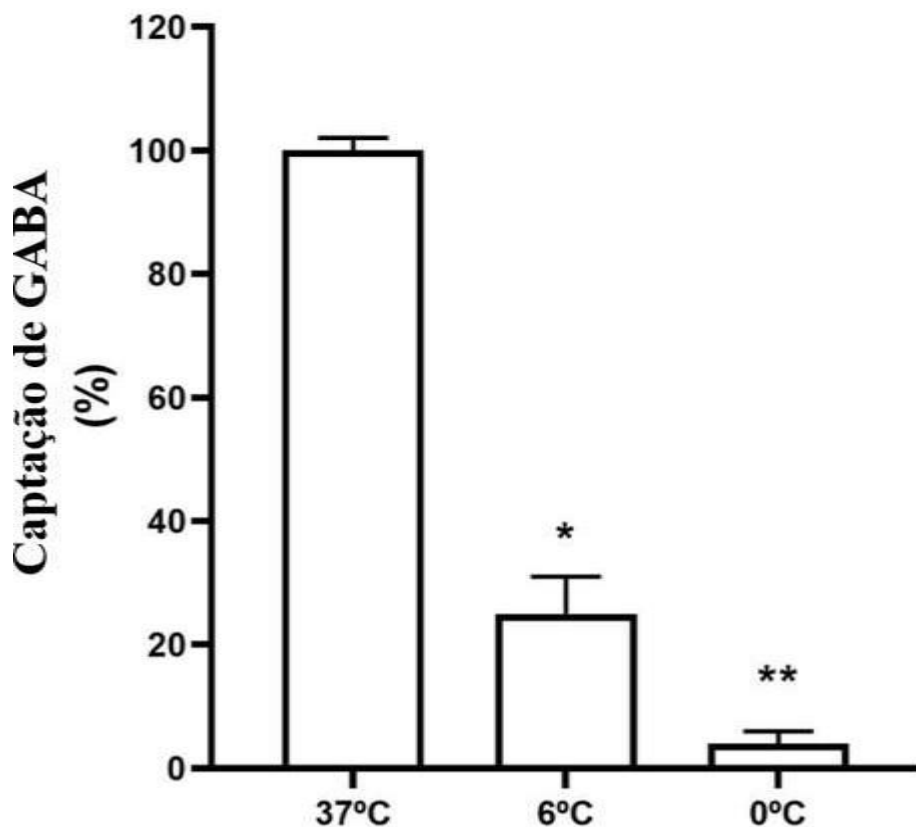
Avaliou-se a captação de GABA utilizando-se a concentração de 100  $\mu$ M desse neurotransmissor em um meio contendo NaCl e outro LiCl após 20 minutos de incubação, os resultados foram expressos em porcentagem do controle e observou-se que a captação foi reduzida na ausência do íon sódio, em aproximadamente 80%. Os valores são mostrados na figura 14.



**Figura 17.** Efeito do meio livre de sódio na captação de GABA em tecido retiniano. Os dados demonstram que a substituição de sódio por lítio no meio de incubação reduz em aproximadamente 80% a captação desse neurotransmissor. Dados expressos em porcentagem do controle. \* $p < 0.01$  (Teste T de Student).

#### **4.4.2 Captação de GABA em diferentes temperaturas**

Os tecidos nervosos incubados em diferentes temperaturas (37°, 8° e 0°, °C) foram expostos a concentração de GABA a 100 µM durante um período de 30 minutos. Os valores demonstram redução de 80 % da captação de GABA em temperatura de 6°C e na temperatura de 0°C, tal mecanismo foi inibido completamente. Resultados expostos na figura 15.

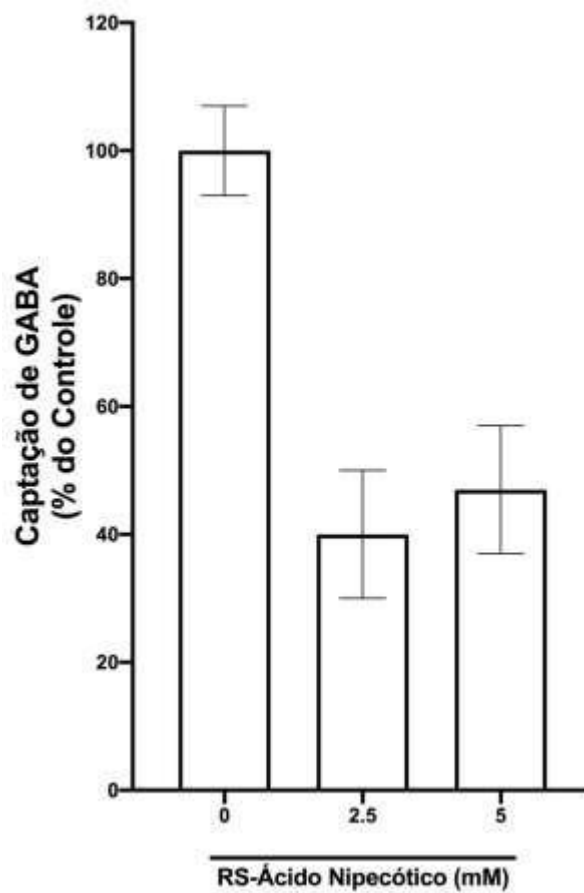


**Figura 18.** Efeito da temperatura do meio de incubação na captação de GABA na retina de embrião de galinha. Os dados demonstram que a incubação do tecido em tampão Hank a 6 ou 0 graus Celsius diminui significativamente a captação de GABA. \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$  vs controle 37°C, ANOVA de 1 via seguido do pós-teste de Tukey.

#### 4.4.3 Modulação da captação de GABA frente ao bloqueador de GATs

Efetou-se uma curva de captação GABAérgica em diferentes concentrações (2.5 e 5 mM) de RS-ácido nipecótico. As retinas foram co-incubadas com GABA na concentração de 100  $\mu\text{M}$  nas diferentes concentrações do bloqueador, durante um período de 30 minutos. Os resultados demonstram uma redução de 60% da captação do neurotransmissor em ambas as concentrações, valores mostrados na figura 19.





**Figura 19.** Efeito do ácido nipecótico, um substrato dos GATs, sobre a captação de GABA. Os dados demonstram que a co-incubação de GABA (100  $\mu$ M) com o RS-ácido nipecótico diminui significativamente o transporte desse neurotransmissor. \* $p < 0.05$  vs Controle; ANOVA de 1 via seguido do pós-teste de Tukey.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo descreve uma metodologia alternativa utilizando CLAE acoplado a um detector de fluorescência para validação de método e determinação dos parâmetros cinéticos da captação de GABA em um tecido retiniano. A técnica de CLAE tem sido amplamente utilizada para determinação da concentração de GABA, com altos níveis de sensibilidade em diferentes fluidos e tecidos biológicos (ROWLEY; MARTIN; MARSDEN, 1995; POLICE; SHANKAR; MURTHY, 2018). No entanto, até a data, poucos métodos semiquantitativos e quantitativos foram desenvolvidos para avaliar a captação de GABA, dentre estes: biossensores (DOUGHTY, et al., 2020), métodos analíticos e radiomarcção (TUNNICLIFF, 1975). No presente estudo, foi proposto um protocolo analítico inovador para a determinação de parâmetros da captação de GABA no tecido retiniano, o qual se difere dos inúmeros protocolos da literatura pelo fato de não se utilizar procedimentos que envolvam extração de GABA do ambiente intracelular.

Métodos alternativos e sensíveis capazes de caracterizar alterações em escala de minutos no padrão normal de captação GABAérgica se tornaram essenciais para pesquisas em neurociências, devido ao fato de inúmeros relatos ratificarem que o GABA representa um importante mediador de proteção contra a toxicidade neuronal no SNC, incluindo a retina (ZEEVALK & NICKLAS, 1997; HOSKING & HILTON, 2002; WANG, et al., 2008;). Somado a isso, estudos neuroquímicos têm fornecido evidências de que mudanças na atividade dos transportadores de GABA estão associados ao desenvolvimento do SNC (LI & XU, 2008).

De fato, vários trabalhos descrevem que a família dos transportadores de alta afinidade  $\text{Na}^+$ -dependentes estão envolvidos na regulação das concentrações extracelulares de GABA (POUILLE E SCANZIANI, 2001; SCIMEME, 2004). Portanto, técnicas capazes de verificar possíveis alterações na atividade desses transportadores em escala de minutos são importantes para caracterizar eventos que ocorrem nos estágios iniciais de toxicidade do tecido, pois este neurotransmissor é crucial para manter homeostasia, no que se refere ao equilíbrio entre correntes excitatórias e inibitórias (PETROFF, 2002).

Vários trabalhos destacam que a retina é uma extensão do sistema nervoso central e demonstra uma fisiologia e citoarquitetura privilegiada para estudos relacionados aos sistemas de neurotransmissores (KANEKO, 1979;. BELECKY-ADAMS et al, 2008). Além disso, na retina de pinto são expressos os principais transportadores GABAérgicos e algumas injúrias retinianas estão intimamente associadas a alterações na captação do GABA. Assim, esse tipo de tecido nervoso representa um excelente modelo para estudos relacionados a eventos neuroquímicos no sistema nervoso central (WALKER, 1983; DO NASCIMENTO, et al., 2013; SCHITINE; DE MELO; REIS, 2015; POLICE; SHANKARA; MURTHYA, 2018).

Quando comparada às técnicas comumente usadas, algumas vantagens deste protocolo são evidenciadas. Por exemplo, alguns procedimentos que medem os níveis de GABA no ambiente intracelular no SNC, uma limitação técnica importante é passível de discussão, uma vez que as enzimas GABA transaminase catalisam a conversão deste aminoácido e 2-oxoglutarato ( $\alpha$ -cetoglutarato), em semialdeído succínico e glutamato. O

semialdeído succínico é então oxidado em ácido succínico e, como tal, entra no ciclo do ácido cítrico como fonte utilizável de energia. (STUART, 2006.). Além disso, a estabilidade do GABA radioativo é menor quando comparada a do GABA endógeno, dificultando o armazenamento a longo prazo para análise por técnicas de cintilação. Esses eventos não permitem uma quantificação precisa de GABA transportado para a célula, e podem influenciar na caracterização do transporte do neurotransmissor (JAKOBS; JAEKEN; GIBSON, 1993).

Convém destacar que apesar de ser utilizada a retina embrionária de ave como material biológico de estudo, a matriz de análise será a solução de incubação (solução de Hank). Sendo assim, no procedimento experimental, o tecido é exposto a uma concentração conhecida de GABA, sendo que os níveis do neurotransmissor no meio de incubação é medido por CLAE após determinado período de incubação (30 minutos). Pelo fato do GABA não ser degradado no ambiente extracelular (SCHOUSBOE, 2018), a redução da concentração de GABA no meio observado em nossos resultados foi atribuída ao influxo mediado por transportadores do mesmo.

Silva et. al (2009) demonstraram que o método CLAE acoplado a detecção por fluorescência é uma técnica eficiente para a determinação de altas concentrações de GABA e glutamato nas diferentes áreas do SNC. Embora esta metodologia represente um ensaio interessante para medições destes neurotransmissores no tecido, alterações na captação de GABA são primeiramente identificadas na faixa micromolar, que cria a necessidade de um ensaio que permite a exata medição de pequenas diferenças nas concentrações do aminoácido em questão (ZIEMINSKA et al., 2018).

Os resultados apresentados neste trabalho se iniciam com os procedimentos de validação do método. Nota-se que os valores obtidos dos parâmetros necessários estabelecidos pela ANVISA-Brasil para determinação de quantificação analítica (tempo de retenção, curva de linearidade, curva de calibração, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão, ensaios de recuperação e estabilidade), foram bem executados.

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 aminoácidos GABA e do padrão interno homoserina, que foram injetados no cromatógrafo líquido nas concentrações de 10,0  $\mu\text{M}$  e 6,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente, destacam um cromatograma com picos de alta resolução e sem interferentes a uma eluição no tempo de vinte e cinco minutos absolutamente livre de ruídos interferentes significativos da linha de base.

Na avaliação da correlação entre a resposta do detector e a concentração do analito, tanto nas análises de curva 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 0,9898 e 0,9955 respectivamente. Isto demonstra resultados aceitáveis e bem acima dos valores mínimos toleráveis determinados pela ANVISA-Brasil, no intervalo de concentrações de GABA de 4.85 a 194  $\mu\text{gM}$ .

O LD e LQ obtidos neste trabalho foram de 0,291  $\mu\text{M}$  e 0,873  $\mu\text{M}$ , 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 3 vezes maior que o ruído da linha de base e o CV obtido para LQ foi abaixo do critério usual estipulado (10%).

Para o estudo da precisão inter e intra-ensaios apresentados na tabela 07, os valores do CV, que deverão ser iguais ou menores que 15 % (Anvisa-Brasil), desta metodologia foram satisfatórios nos intervalos das concentrações analisadas. Isto demonstra que o método foi preciso.

A determinação da exatidão do método inter e intra -ensaios foram avaliados pela porcentagem da relação da concentração obtida pela concentração teórica. A ANVISA-Brasil determina que esses valores não ultrapassem 15 % do valor nominal. Neste estudo os resultados referentes a exatidão do método foram considerados aceitáveis, ou seja, o método demonstrou-se exato.

Neste estudo, as condições cromatográficas mostraram um elevado nível de recuperação (acima de 99%; Tabela 08) na faixa micromolar que é semelhante ao descrito em trabalhos anteriores (Zhanga et al, 2003;.. Clarke et al, 2007). Estes dados estão próximos do valor de 100% devido a determinação indireta da captação de GABA não ser influenciada por distúrbios do metabolismo celular como frizado anteriormente, bem como pelo fato de não sofrer perda da amostra que geralmente ocorre devido a processos de preparação da matriz.

Antes da determinação dos parâmetros cinéticos da captação de GABA 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', minutos) indicaram que o tempo em que houve maior captação de GABA foi de 10' minutos, estes dados corroboram com o tempo de incubação utilizado por Tunnicliff 1975 e Ward et al., (2005) em seus experimentos.

Sobre os parâmetros cinéticos, os resultados aqui realizados demonstraram que este método proposto exibe uma alta sensibilidade (Figura 12), com valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  de 382  $\mu\text{M}$  e 34nmol/ mg proteína / minuto, respectivamente de acordo com os descrito em estudos anteriores realizados em diferentes áreas do sistema nervoso central, incluindo a retina (SCHOUSBOE E DIVAC, 1979; GEGELASHVILI E SCHOUSBOE, 1998; PALMADA E CENTELLES, 1998; BERETTA ET AL., 2004). Estas determinações são importantes para a compreensão do comportamento do transportador diante as concentrações de GABA na fenda sináptica, as quais são minunciosamente reguladas.

Após ter sido rigorosamente validado seguindo as normas técnicas obrigatórias para determinações analíticas e ser caracterizado os parâmetros cinéticos de captação de GABA, este estudo também se preocupou em avaliar os parâmetros biofísicos e farmacológicos relacionados ao transporte de GABA.

Sabe-se que a captação de GABA é dependente de temperatura (TUNNICLIFF, 1975), então para demonstrar que tal fenômeno neste protocolo proposto esta oscilação fosse observada, foram realizados ensaios referente a variação de temperatura. Os experimentos mostraram claramente que ao incubar o tecido nervoso em três diferentes temperaturas (37°, 8° e 0°, °C)

observou-se uma queda significativa na captação de GABA, sendo praticamente abolida na menor temperatura, caracterizando um sistema de transporte temperatura-dependente.

Além disso, é amplamente descrito que os GATs são transportadores dependentes de sódio (SCIMEMI ET AL., 2014). Para avaliar esse parâmetro, os preparos de retina foram incubados em meio sem sódio, com substituição equimolar por LiCl. Os nossos dados demonstraram uma queda de 80% na captação de GABA, demonstrando que grande parte do transporte desse neurotransmissor é dependente de sódio, como esperado, e aproximadamente 20% representa um sistema independente de sódio pobremente elucidado.

Para ratificar se a aplicabilidade deste estudo continuava sendo eficaz, optou-se por executar a modulação da captação de GABA com inibidores farmacológicos específicos de seu transporte. Observou-se que, ao se utilizar ácido nipecótico, a captação de GABA diminuiu em aproximadamente 50% em relação ao controle, um efeito esperado tendo em vista que o ácido nipecótico é um substrato dos GATs e pode competir com o GABA pelo sítio de translocação (JOHNSTON ET AL., 1976).

Desse modo, os parâmetros aqui analisados ressaltam claramente a aplicabilidade eficiente deste protocolo para estudos em neurociências além de ser proposto uma metodologia eficiente com alta sensibilidade para a quantificação da captação de GABA no tecido nervoso determinada por CLAE. Este abordagem se torna uma ferramenta importante para estudos associados à caracterização de alterações em escala de minutos no transporte de GABA em situações fisiológicas bem como relacionados com injúrias no SNC.



O estudo da captação de GABA em condições patológicas é limitado devido a restrições técnicas que dificultam a avaliação adequada do transporte desse neurotransmissor. Como discutido na introdução, doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas são marcadas por alterações na expressão dos GATs. No entanto, essa alteração não implica necessariamente em alterações na taxa de transporte de GABA do meio extracelular para o meio intracelular. O desenvolvimento de técnicas com alta precisão e eficiência podem melhor caracterizar essas alterações ao perpassar as limitações metabólicas para quantificação intracelular de GABA – as quais geralmente são ainda mais acentuadas em contextos patológicos onde o metabolismo celular foi totalmente alterado. Desse modo, a padronização do nosso método pode representar um avanço significativo na pesquisa aplicada e auxiliar na melhor compreensão de mecanismos fisiopatológicos e as melhores estratégias para contrapô-los.

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que o método desenvolvido é de alta sensibilidade para quantificar GABA no SNC, devido:

A validação dos parâmetros analíticos para determinação de GABA por CLAE demonstrar que o método é reprodutível e satisfatório, atendendo as normas estabelecidas pela ANVISA;

Ser estabelecido um tempo padrão de referência para avaliar a captação de GABA em tecido nervoso;

Ser caracterizada a cinética de captação de GABA no tecido nervoso;

A aplicabilidade do método exibir resultados parecidos aos encontrados na literatura.

## 6 REFERÊNCIAS

AMARA SG, ARRIZA JL. **Neurotransmitter transporters: three distinct gene families** Curr. Opin .Neurobiol. Vol 3, 337-344. 1993.

ALMEIDA, OLGA MARIA M.S. DE et al. **Regulation of glutamic acid decarboxylase of chick and rat retina cells by GABA and excitatory amino acids**. Anais da Academia Brasileira de Ciências [online].v. 72, n. 3 [Accessed 29 May 2022] , pp. 438. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S0001-37652000000300026>>. Epub 05 Oct 2000. ISSN 1678-2690. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652000000300026>. 2000

AMARA SG, KUHAR MJ. **Neurotransmitter transporters: recente progress**. Annu Rev .Neurosci.Vol 16, 73-93. 1993.

ÂNGULO, MC., LE MEUR, K., KOZLOV,AS., CHARPAK, S., AUDINAT, E. **GABA, a forgotten gliotransmitter**. Prog Neurobiol; 86(3):297-303. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.08.002.

BARBERIS, A., PETRINI, E. M., MOZRZYMAS, J. W. **Impact of synaptic neurotransmitter concentration time course on the kinetics and pharmacological modulation of inhibitory synaptic currents**. Front. Cell. Neurosci. 5:6. doi: 10.3389/fncel.2011.00006. 2011.

BARNARD, ERIC. **The molecular architecture of GABAA receptors**. 10.1007/978-3-642-56833-6\_2. 2001

BELEBONI, R.O; RUIJTER, O. G. C; PIZZO, A.B, CASTELLAN-BALDAN, COUTINHO-NETTO, J., SANTOS,W.,COIMBRA, NC. **Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships**. Cellular and molecular neurobiology Vol 24. 707-728. 2004.

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

BERNATH, S., KELLER, R. W., JR, & ZIGMOND, M. J. (1989). **Release of endogenous GABA can occur through Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent processes**. Neurochemistry international, 14(4), 439-445. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(89\)90033-8](https://doi.org/10.1016/0197-0186(89)90033-8)

BICHO, A., & GREWER, C. **Rapid substrate-induced charge movements of the GABA transporter GAT1.** *Biophysical journal*, 89(1), 211-231. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.061002>. 2005.

BORDEN L.A. **GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cell localization.** *Neurochem. Int.* 29 , 335-356. 1996.

BORDEN, L. A., SMITH, K. E., HARTIG, P. R., BRANCHEK, T. A., & WEINSHANK, R. L. **Molecular heterogeneity of the gamma-aminobutyric acid (GABA) transport system. Cloning of two novel high affinity GABA transporters from rat brain.** *The Journal of biological chemistry*, 267(29), 21098-21104. 1992

BORGES-MARTINS, V., FERREIRA, D., SOUTO, A. C., OLIVEIRA NETO, J. G., PEREIRA-FIGUEIREDO, D., DA COSTA CALAZA, K., DE JESUS OLIVEIRA, K., MANHÃES, A. C., DE MELO REIS, R. A., & KUBRUSLY, R. **Caffeine regulates GABA transport via A<sub>1</sub>R blockade and cAMP signaling.** *Neurochemistry international*, 131, 104550. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104550>. 2019

BORMANN, J., **The 'ABC' of GABA receptors.** *Trends Pharmacol Sci.* Jan;21(1):16-9. doi: 10.1016/s0165-6147(99)01413-3. 2000.

BOURNE, J.A., **Intracerebral microdialysis: 30 years as a tool for the neuroscientist.** *Clin exp. PharmacolPhysiol.* 2003; 30:16-24.

BOWERY, N.G., DOBLE, A., HILL, D.R., HUDSON, A.L., SHAW, J.S., TURNBULL, M.J., WARRINGTON, R. **Bicuculline-insensitive GABA receptors on peripheral autonomic nerve terminals,** *European Journal of Pharmacology*, Volume 71, Issue 1, Pages 53-70, ISSN 0014-2999, [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(81\)90386-](https://doi.org/10.1016/0014-2999(81)90386-) 1998.

BRADFORD, M.M.; **“A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”.** *Anal. Biochem.* 72: 248-254. 1976.

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017 . **Guia para validação de métodos analíticos** - Julho, 2017.

BRINGMANN A1, PANNICKE T, GROSCHE J, FRANCKE M, WIEDEMANN P, SKATCHKOV SN, OSBORNE NN, REICHENBACH A. **Müller cells in the healthy and diseased retina.** *Prog. Retin. Eye Res.* Vol 25 (4):397-424. 2006

CALAZA K.C., GARDINO, P.F., DE MELLO, F.G. **Transporter mediated GABA release in the retina: role of excitatory amino acids and dopamine.** *Neurochem. Int.* 49, 769-777. 2006.

CAMPOCHIARO, P., FERKANY, J. W., & COYLE, J. T. (1984). **The dissociation of evoked release of [3H]-GABA and of endogenous GABA from chick retina in vitro.** *Experimental eye research*, 39(3), 299-305. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(84\)90017-4](https://doi.org/10.1016/0014-4835(84)90017-4)

CASTRO, V.H.C., VALENZUELA, C.L.L., SÁNCHEZ, J.C.S., PEÑA, K.P., PÉREZ, S.J.L. IBARRA, O.J. AND VILLAGRÁN, A. **An Update of the Classical and Novel Methods Used for Measuring Fast Neurotransmitters During Normal and Brain Altered Function.** *Curr Neuropharmacol.* 12(6): 490-508. Dec. doi: 10.2174/1570159X13666141223223657. 2014.

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

CLARKE, G., O'MAHONY, S., MALONE, G., DINAN, T.G. **An isocratic high performance liquid chromatography method for the determination of GABA and glutamate in discrete regions of the rodent brain.** *J. Neurosci. Methods.*;160(2):223-230. doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.09.006. 2007.

COLLINS; BRAGA; BONATO. **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 7ª edição - EDITORA DA UNICAMP 1997.

COHEN-KFIR E., W, LEE., ESKANDARI. S., NELSON, N. **Zinc inhibition of gammaaminobutyric acid transporter 4 (GAT4) reveals a link between excitatory and inhibitory neurotransmission.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 6154-6159. 2005.

DELGADO J.M., DEFEUDIS F.V., ROTH R.H., RYUGO D.K., MITRUKA B.M. **Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys .** *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*198(1):9-21. 1972.

DE MELLO, F. G., HOKOÇ, J. N., VENTURA, A. L., & GARDINO, P. F. **Glutamic acid decarboxylase of embryonic avian retina cells in culture: regulation by gamma-aminobutyric acid (GABA).** *Cellular and molecular neurobiology*, 11(5), 485-496. <https://doi.org/10.1007/BF00734811>. 1991

DO NASCIMENTO, J.L.M., DE MELLO, F.G. **Induced release of gamma-aminobutyric acid by a carrier-mediated, high affinity uptake of L-glutamate in cultured chick retina cells.** *J. Neurochem.* 45, 1820-1827. 1985

DOUGHTY, P.T., HOSSAIN, I., GONG, C. **Kayla A. Ponder, Sandipan Pati, Prabhu U. Arumugam & Teresa A. Murray Novel microwire-based**

**biosensor probe for simultaneous real-time measurement of glutamate and GABA dynamics in vitro and in vivo.** *Sci Rep* 10, 12777. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69636-1>. July 2020.

DURKIN, M.M., LAURENCE, K.E.S., BORDEN, A. WEINSHANK, R.L., BRANCHEK, T.A., GUSTAFSON, E.L. **Localization of messenger RNAs encoding three GABA transporters in rat brain: an in situ hybridization study.** *Molecular Brain Research* Volume 33, Issue 1, Pages 7-21. October 1995.

FATTORINI, G., MELONE, M., & CONTI, F. **A Reappraisal of GAT-1 Localization in Neocortex.** *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00009>. 2020

GHIT, A., ASSAL, D., AL-SHAMI, A. S., & HUSSEIN, D. **GABA<sub>A</sub> receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders.** *Journal, genetic engineering & biotechnology*, 19(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00224-0>. 2021

GOODCHILD, M., & NEAL, M. J. **The uptake of 3Hp -aminobutyric acid by the retina.** *British journal of pharmacology*, 47(3), 529-542. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1973.tb08184.x>. 1973.

HAMBURGER, V. HAMILTON, H.L. **A series of normal stages in the development of chick embryo.** *J. Morphol.* 88, 49-92.1951.

HÄUSLER, R.E., LUDEWIG, F., KRUEGER, S. **Amino acids--a life between metabolism and signaling.** *Plant SciDec*; 229:225-237. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.09.011. 2014.

HAYAT, A., JAHANGIR, T.M., , M.Y., ALAMGIR, M., HUSSAIN, Z., ULHAQ, F., MUSHARRAF, S.G. **HPLC determination of gamma amino butyric acid (GABA) and some biogenic amines (BAs) in controlled, germinated, and fermented brown rice bypre-column derivatization.** Volume 64, 56-62. 2015

HOSKING, S. L.; HILTON E. J. R. **Neurotoxic effects of GABA-transaminase inhibitors in the treatment of epilepsy: ocular perfusion and visual performance.** *Ophthalmic & Physiological Optics*. Volume22, Issue 5 Pages 440-447. <https://doi.org/10.1046/j.1475-1313.2002.00063.x>. September 2002

ISHIBASHI, M., EGAWA, K., & FUKUDA, A. **Diverse Actions of Astrocytes in GABAergic Signaling.** *International journal of molecular sciences*, 20(12), 2964. <https://doi.org/10.3390/ijms20122964>. 2019

IVERSEN, L.L. AND NEAL, M.J. **THE UPTAKE OF [<sup>3</sup>H]GABA BY SLICES OF RAT CEREBRAL CORTEX.** *Journal of Neurochemistry*, 15: 1141-1149. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1968.tb06831.x>. 1968.

JAKOBS, C; J JAEKEN; K M GIBSON. **Inherited disorders of GABA metabolism.** *J Inherit Metab Dis.* 1993;16 (4):704-15. doi: 10.1007/BF00711902.

JIN, H., WU, H., OSTERHAUS, G., WEI, J., DAVIS, K., SHA, D., FLOOR, E., HSU, C. C., KOPKE, R. D., & WU, J. Y. **Demonstration of functional coupling between gamma -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4293-4298. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730698100> . 2003

JOO, K., YOON, S. H., RHIE, D. J., & JANG, H. J. **Phasic and Tonic Inhibition are Maintained Respectively by CaMKII and PKA in the Rat Visual Cortex.** *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 18(6), 517-524. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.6.517>. 2014

KAVANAUGH, MP.,ARRIZA, JL., NORTH, RA., AMARA, SG. **Electrogenic uptake of gamma-aminobutyricacidby a cloned transporter expressed in Xenopus oocytes.** *Journal of Biological Chemistry. J.Biol.Chem.* Vol267,22007-22009. 1992

KEHL, S.J, HUGHES, D., MCBURNEY, R.N. **A patch clamp study of gamma-aminobutyricacid (GABA) induced macroscopic currents in rat melanotrophs in cell culture.** *Br. J. Pharmac.* Vol 92, 573-585. 1987

KERR, D.B., ONG, J. **GABA agonists and antagonists.** *Medicinal ResearchReviews.* <https://doi.org/10.1002/med.2610120604>. 1992.

KROGSGAARD-LARSEN, P., FALCH, E., LARSSON, O. M., & SCHOUSBOE, A. **GABA uptake inhibitors: relevance to antiepileptic drug research.** *Epilepsy research*, 1(2), 77-93. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(87\)90012-x](https://doi.org/10.1016/0920-1211(87)90012-x). 1987.

KUBRUSLY, R., DA ROSA VALLI, T., FERREIRA, M., DE MOURA, P., BORGES-MARTINS, V., MARTINS, R. S., FERREIRA, D., SATHLER, M. F., DE MELO REIS, R. A., FERREIRA, G. C., MANHÃES, A. C., & DOS SANTOS PEREIRA, M. **Caffeine Improves GABA Transport in the Striatum of Spontaneously Hypertensive Rats (SHR).** *Neurotoxicity research*, 39(6), 1946-1958. <https://doi.org/10.1007/s12640-021-00423-0>. 2021.

LANCTÔT, K. L., HERRMANN, N., MAZZOTTA, P., KHAN, L. R., & INGBER, N. **GABAergic function in Alzheimer's disease: evidence for dysfunction and potential as a therapeutic target for the treatment of behavioural and psychological symptoms of dementia.** *Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie*, 49(7), 439-453. <https://doi.org/10.1177/070674370404900705>. 2004

ŁĄTKA, K., JOŃCZYK, J., & BAJDA, M.  **$\gamma$ -Aminobutyric acid transporters as relevant biological target: Their function, structure, inhibitors and role in the therapy of different diseases.** *International journal of biological macromolecules*, S0141-8130(20)32987-1. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.126>. 2020.

LEE, T. S., BJØRNSSEN, L. P., PAZ, C., KIM, J. H., SPENCER, S. S., SPENCER, D. D., EID, T., & DE LANEROLLE, N. C. **GAT1 and GAT3 expression are differently localized in the human epileptogenic hippocampus.** *Acta neuropathologica*, 111(4), 351-363. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-0017-9>. 2006.

LEWERENZ, J., & MAHER, P. **Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence?.** *Frontiers in neuroscience*, 9, 469. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00469>. 2015.

LI, K., XU, E. **The role and the mechanism of  $\gamma$ -aminobutyric acid during central nervous system development.** *Neurosci. Bull.* 24, 195 <https://doi.org/10.1007/s12264-008-0109-3>. 2008.

LU,C.C.,HILGEMANN, D.W. **GAT1 (GABA:Na/Cl) cotransport function: steady state studies in giant Xenopus oocyte membrane patches.***J.Gen.Physiol.* Vol114,429-44. 1999.

LYDIARD R. B. **The role of GABA in anxiety disorders.** *The Journal of clinical psychiatry*, 64 Suppl 3, 21-27. 2003.

MA, K., XU, A., CUI, S., SUN, M. R., XUE, Y. C., & WANG, J. H. **Impaired GABA synthesis, uptake and release are associated with depression-like behaviors induced by chronic mild stress.** *Translational psychiatry*, 6(10), e910. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.181>. 2016

MAGGESISSI, R. S., GARDINO, P. F., GUIMARÃES-SOUZA, E. M., PAES-DE-CARVALHO, R., SILVA, R. B., & CALAZA, K. C. **Modulation of GABA release by nitric oxide in the chick retina: different effects of nitric oxide depending on the cell population.** *Vision research*, 49(20), 2494-2502. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2009.08.004>. 2009

MALVIYA, R., BANSAL, V., PAL, O., SHARMA, P.K. **High performance liquid chromatography: A short review.** *Journal of Global Pharma Technology*, 2(5): 22-26. ISSN 0975 – 8542. 2010

MICHAEL, P., KAVANAUGH, S., JEFFREY, L., ARRIZA, R., ALAN N.,AMARA, S.G. **Electrogenic Uptake of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid by a Cloned Transporter Expressed in Xenopus Oocytes.** *The Journal Of Biological Chemistry*. Vol. 267. 22007-22009, 1992

MIHIC, S.J., YE, Q., WICK, M.J., KOLTCHINE, V.V., KRASOWSKI, M.D., FINN, S.E., MASCIA, M.P., VALENZUELA, C.F., HANSON, K.K., GREENBLATT E.P., HARRIS R.A., HARRISON, N.L. **Sites of alcohol and volatile anaesthetic**



**action on GABA(A) and glycine receptors.** *Nature.*; 389(6649):385-389. doi: 10.1038/38738. 1997.

MINGFEI, D., HUANG, Y., GUO, T., LI-PENG, S., GUAN, B. **Mesoporous nanospheres functionalized optical microfiber biosensor for low concentration neurotransmitter detection.***Optics Express.* Vol. 24. 27152-27159. 2016

MINELLI, A., DEBIASI, S., BRECHA, N. C., ZUCCARELLO, L. V., & CONTI, F. (1996). **GAT-3, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to astrocytic processes, and it is not confined to the vicinity of GABAergic synapses in the cerebral cortex.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(19), 6255-6264. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-19-06255.1996>

MORAES, E.R.S., GRISOLIA A.B., OLIVEIRA K.R., PICANÇO-DINIZ D.L., CRESPO-LÓPEZ M.E., MAXIMINO C., BATISTA EDE.J., HERCULANO A.M. **Determination of glutamate uptake by high performance liquid chromatography (hplc) in preparations of retinal tissue.** *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* Vol 907:1-6. 2012.

NELSON, N. **The family of Na/Cl neurotransmitter transporters.** *Neurochem.*Vol 71,1785-180. 1998.

NETTO J, DOS SANTOS WF, COIMBRA NC **Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships.** *Cell Mol Neurobiol.* Vol24, 707-28. 2004.

NUSS P. **Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation.** *Neuropsychiatric disease and treatment*, 11, 165-175. <https://doi.org/10.2147/NDT.S58841>. 2015.

O'GORMAN R.L. **In Vivo Detection of GABA and Glutamate With MEGAPRESS: Reproducibility and Gender Effects.** *J. Magn. Reson. Imaging.*;33:1262-1267. 2011.

OLSEN, R.W., SHUICHI, M.B., SMITH, G., DOUGLAS, L.D., TOBIN, A.J. **GABAA -Benzodiazepine Receptors: Demonstration of Pharmacological Subtypes in the Brain.** In: Kito S., Segawa T., Olsen R.W. (eds) **Neuroreceptor Mechanisms in Brain.** *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 287. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5907-4\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5907-4_30). 1991.

PARROT S., SAUVINET V., RIBAN V., DEPAULIS A., RENAUD B., DENOROY L. **High temporal resolution for in vivo monitoring of neurotransmitters in awake epileptic rats using brain microdialysis and capillary**

**electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.** *J. Neurosci. Methods.* 140(1-2):29-38. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.03.025. 2004.

PEARL, P.L., HARTKA, T.L., CABALZA, J.L., TAYLOR, J. GIBSON, M. **Inherited Disorders of GABA metabolism.** *Future Neurol.* 631-636. 2006

PETROFF, O.A.C., Book Review: **GABA and Glutamate in the Human Brain.** Review Article Find in PubMed. <https://doi.org/10.1177/107385840223851>. volume: 8 issue: 6, page(s): 562-573 Issue published: December 1, 2002

POPOVA E. **Ionotropic GABA Receptors and Distal Retinal ON and OFF Responses.** *Scientifica*, 149187. <https://doi.org/10.1155/2014/149187>. 2014.

POW, DV. **Visualising the activity of the cystine–glutamate antiporter in glial cell using antibodies to amino adipic acid, a selectively transported substrate.** *Glia* 34:27-38. 2001.

REA, K., CREMERS, T I F H., WESTERINK, B H C. **HPLC conditions are critical for the detection of GABA by microdialysis.** *J Neurochem.* 94(3):672-9. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03218.x. Epub 2005 Jun 30.

RITTER, J. **Rang and Dale's pharmacology** (Ninth edition.). Edinburgh: Elsevier. 2020.

ROBINSON D.L., HERMANS A., SEIPEL A.T., WIGHTMAN R.M. Monitoring rapid chemical communication in the brain. *Chem. Rev.*;108(7):2554-2584. doi: 10.1021/cr068081q. 2008

ROWLEY, H.L; MARTIN, K.F; MARSDEN, C.A. **Decreased GABA release following tonic-clonic seizures is associated with an increase in extracellular glutamate in rat hippocampus in vivo,** *Neuroscience.* Volume 68, Issue 2415-422, ISSN 0306-4522, [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00159-G](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00159-G)., December, 1995.

ROY-BYRNE, P.P., CRASKE, M.G., STEIN, M.B., SULLIVAN, G., BYSTRITSKY, A., KATON, W., GOLINELLI, D AND SHERBOURNE, C.D. **A Randomized Effectiveness Trial of Cognitive-Behavioral Therapy and Medication for Primary Care Panic Disorder.** *Arch Gen Psychiatry.* 62:290-298. 2005.

ROZANOVA, Z.A. **Absorption kinetics of C14-GABA and its vitamin B conjugates in isolated bovine retina.** *Fiziol Zh.* Vol 47(4):63-6. 2001.

SALLARD, E., LETOURNEUR, D., & LEGENDRE, P. **Electrophysiology of ionotropic GABA receptors.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 78(13), 5341-5370. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03846-2>. 2021

SCHITINE, C.S, DE MELLO, F.G, REIS, R.A. **Neurochemical plasticity of Müller cells after retinal injury: overexpression of GAT-3 may potentiate excitotoxicity.** *Neural Regen Res.* Available from: <http://www.nrronline.org/text.asp?2015/10/9/1376/165224>. 2015.

SCHITINE, C.S., KUBRUSLY, R.C.C., DE MELO REIS, R.A., YAMASAKI, E.M., FIALHO DE MELLO, M.C., DE MELLO, F.G. **GABA Uptake by Purified Avian Müller Glia Cells in Culture.** *Neurotoxicity Research*, VOL. 12(2). pp. 145-153. 2007.

SCIMEMI, A. **Structure, function, and plasticity of GABA transporters.** *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Vol 8. 161. 2014

SCHOUSBOE, A. **Metabolic signaling in the brain and the role of astrocytes in control of glutamate and GABA neurotransmission.** *NeurosciLett*. S0304-3940(18)30044-2. 2018

SELTEN, M., VAN BOKHOVEN, H., & NADIF KASRI, N. **Inhibitory control of the excitatory/inhibitory balance in psychiatric disorders.** *F1000Research*, 7, 23. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12155.1>. 2018

SHIAH, I.S., YATHAM, L.N. **GABA function in mood disorders: an update and critical review.** *Life Sci.*; 63(15):1289-1303. doi: 10.1016/S0024-3205(98)00241-0. 1998.

SIGEL, E., & STEINMANN, M. E. **Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors.** *The Journal of biological chemistry*, 287(48), 40224-40231. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.386664>. 2012

SILVA, D.M.F., FERRAZ, V.P., RIBEIRO, A.M. **Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain.** *Journal of Neuroscience Methods* 177. 289-293. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.10.011. November 2009.

SPIERING M. J. **The discovery of GABA in the brain.** *The Journal of biological chemistry*, 293(49), 19159-19160. <https://doi.org/10.1074/jbc.CL118.00659>. 2018

STUART A. FORMAN, JANET CHOU, GARY R. STRICHARTZ E ENG H. LO **Princípios de Farmacologia do Sistema Nervoso Central Farmacologia da Neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica.** Introdução Caso Neurotransmissão. 2006.

STONE, R.A; LIU, J; SUGIMOTO, R; CAPEHART, C; ZHU, X; PENDRAK, K. **GABA, Experimental Myopia, and Ocular Growth in Chick.** *Investigative*

Ophthalmology & Visual Science, Vol.44, 3933-3946.  
doi:<https://doi.org/10.1167/iovs.02-0774>. September 2003.

TAVAZZANI, E., TRITTO, S., SPAIARDI, P., BOTTA, L., MANCA, M., PRIGIONI, I., MASETTO, S., & RUSSO, G. (2014). **Glutamic acid decarboxylase 67 expression by a distinct population of mouse vestibular supporting cells.** *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 428.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00428>

TERUNUMA M. **Diversity of structure and function of GABA<sub>B</sub> receptors: a complexity of GABA<sub>B</sub>-mediated signaling.** *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 94(10), 390-411.  
<https://doi.org/10.2183/pjab.94.026>. 2018

TRITSCH, N. X., OH, W. J., GU, C., & SABATINI, B. L. **Midbrain dopamine neurons sustain inhibitory transmission using plasma membrane uptake of GABA, not synthesis.** *eLife*, 3, e01936. <https://doi.org/10.7554/eLife.01936>. 2014.

WALKER, J. E. **Glutamate, GABA, and CNS disease: A review.** *Neurochemical Research*, 8(4), 521-550. doi:10.1007/bf00965107. 1983.

WANG, G., WANG, R., FERRIS, B. SALIT, J., STRULOVICI-BAREL, Y., NEIL, R., CRYSTAL, R.G. **Smoking-mediated up-regulation of GAD67 expression in the human airway epithelium.** *Respiratory Research*. 11:150. 2010

WATANABE, M., MAEMURA, K., KANBARA, K., TAMAYAMA, T., HAYASAKI, H. **GABA and GABA Receptors in the Central Nervous System and Other Organs** *International Review of Cytology*. Vol 213, 1-47; 2002.

YAHARA, T., TACHIKAWA, M., AKANUMA, S., HOSOY, K. **Hypertonicity enhances GABA uptake by cultured rat retinal capillary endothelial cells.** *Drug Metab Pharmacokinet*. 25(6):611-5. 2010.

YANG, J., MATHUR, P. **Usher syndrome: hearing loss, retinal degeneration and associated abnormalities.** *Biochim Biophys Acta*. 1852 (3): 406-420. 2015.

ZHAO, J.W., DU, J.L., LI, J.S., YANG, X.L., **Expression of GABA transporters on bullfrog retinal Müller cells.** *Glia* 31, 104-117. 2000.

ZEEVALK, G.D.; NICKLAS, W. J. **Activity at the GABA transporter contributes to acute cellular swelling produced by metabolic impairment in retina,** *Vision Research*, Volume 37, Issue 24, Pages 3463-3470, ISSN 0042-6989, [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(97\)00184-3](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(97)00184-3). December, 1997.

ZIEMINSKA, E., TOCZYLOWSKA, B., DIAMANDAKIS, D., HILGIER, W., FILIPKOWSKI, R.K., POLOWY, R., ORZEL, J., GORKA, M., LAZAREWICZ, J.W. **Glutamate, Glutamine and GABA Levels in Rat Brain Measured Using MRS, HPLC and NMR Methods in Study of Two Models of Autism.** *Front. Mol. Neurosci.*, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00418>. November 2018.

## 6 PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

### 6.1 SBNEC 2014



#### Validação do método de detecção de níveis extracelulares de GABA por HPLC em tecido retiniano.

<sup>1</sup>Edinaldo Rogério da Silva Moraes; <sup>1</sup>Alan Barroso Araújo Grisólia; <sup>1</sup>Tiago de Lima Pereira; <sup>1</sup>Karen Renata Matos Oliveira; <sup>1</sup>Evander de Jesus Oliveira Batista; <sup>2</sup>Domingos Luiz Wanderley Picango-Diniz; <sup>1</sup>Anderson Manoel Herculano.



<sup>1</sup>ICB - UFPA, <sup>2</sup> - UFOPA.

#### INTRODUÇÃO

A avaliação dos níveis de GABA no sistema nervoso central (SNC) é de fundamental importância para diversos estudos em neurociências. Vários artigos publicaram métodos para determinar concentrações desses neurotransmissor em fluidos biológicos, contudo poucos são voltados para determinação da quantidade de GABA endógeno liberado em tecido retiniano.

#### OBJETIVO

Validar um método por HPLC para detecção de níveis basais e estimulados de GABA em tecido retiniano íntegro.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

##### VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA QUANTIFICAR AMINOÁCIDOS:

GABA	Coefficiente de correlação	Equação
Calibração	0,995	$Y = 0,125X + 0,136$

##### PRECISÃO

Porcentagem de Recuperação (µg/mL)	Coeficiente de variação	
0,5	96%	5%
2,5	92%	3%
10	94%	5%

##### EXATIDÃO

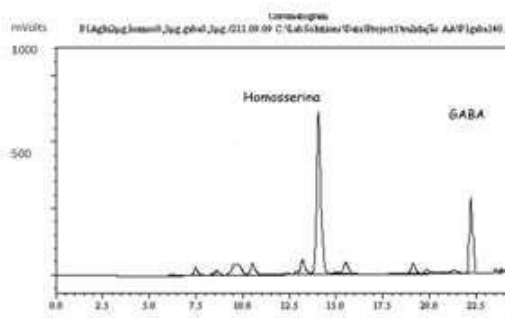
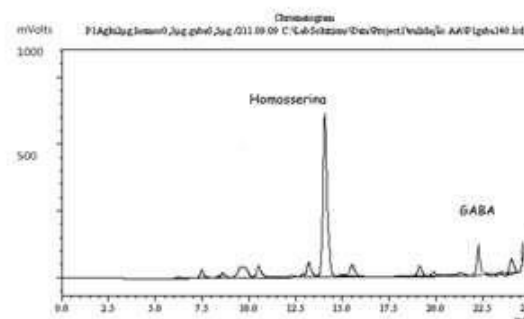
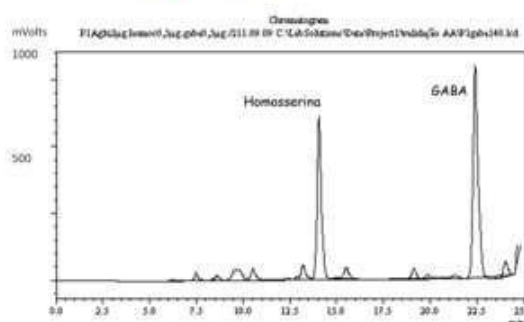
Concentração: de 2µg/mL	Recuperação (%) e CV (%)
1 Dia	95% : 4%
1 Semana	96% : 6%

##### PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL IN VITRO DE EXPLANTE EM CÉLULAS RETINIANAS DE EMBRIÃO DE GALINHA (E7 OU E8)



incubação por 15 minutos com Hank's  
 1  
 Liberação de gaba por HPLC  
 Dosagem de proteína (bradford)  
 Análise estatística (Anova e teste Tukey)

#### RESULTADOS



## 6.2 SBNEC 2017



SBNeC  
40 ANOS

# XL REUNIÃO ANUAL DA SBNeC

**Certificado**

Certificamos que

**EDINALDO ROGERIO DA SILVA MORAES**

apresentou o resumo "06.070, CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE CAPTAÇÃO DE GABA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL e autor(es) EDINALDO ROGÉRIO DA SILVA MORAES, ALAN BARROSO ARAÚJO GRISÓLIA, KAREN RENATA MATOS OLIVEIRA, DOMINGOS LUIZ WANDERLEY PICANÇO DINIZ, EVANDER DE JESUS OLIVEIRA BATISTA, ANDERSON MANOEL HERCULANO" na forma de painel na **XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC**, realizada no Campus da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), em Araraquara, SP, no período de 26 a 29 de julho de 2017.

  
Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza  
Presidente da SBNeC



IBRO  
CAPES  
CNPq  
FAPESP  
unesp



### 6.3 – Artigo publicado na revista *Neurochemistry international* (Qualis A2).

#### Journal Pre-proof

High performance liquid chromatography-based method to analyze activity of GABA transporters in central nervous system

Edinaldo Rogério da Silva Moraes, Mateus Santos-Silva, Alan Araújo Grisólia, Danielle Valente Braga, Luana Ketlen Reis Leão, Carlomagno Pacheco Bahia, Suellen Alessandra Soares de Moraes, Adelaide Fonseca Passos, Evander de Jesus Oliveira Batista, Anderson Manoel Herculano, Karen Renata Herculano Matos Oliveira



PII: S0197-0186(22)00084-5

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105359>

Reference: NCI 105359

To appear in: *Neurochemistry International*

Received Date: 30 April 2021

Revised Date: 7 May 2022

Accepted Date: 8 May 2022

Please cite this article as: Rogério da Silva Moraes, E., Santos-Silva, M., Grisólia, Alan Araújo, Braga, D.V., Reis Leão, L.K., Bahia, C.P., Soares de Moraes, S.A., Passos, A.F., de Jesus Oliveira Batista, E., Herculano, A.M., Matos Oliveira, K.R.H., High performance liquid chromatography-based method to analyze activity of GABA transporters in central nervous system, *Neurochemistry International* (2022), doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105359>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2022 Published by Elsevier Ltd.