



INTRODUÇÃO

O acidente vascular encefálico isquêmico (AVEI) agudo começa com uma hipoperfusão focal severa, impedindo a síntese de ATP e iniciando uma série de processos neuroquímicos conhecidos como cascata isquêmica, culminando em morte celular [1]. A injúria cerebral se mantém por horas e até dias, expandindo a área de infarto.

A zona de penumbra é vista como o alvo tecidual para terapias de revascularização, visto que, embora tida como tecido viável, é um tecido passível de tornar-se permanentemente infartado. Quando a reperfusão ou circulação colateral se estabelece, essa zona pode recuperar-se. Sem reperfusão, as células cerebrais na zona de penumbra morrerão e a lesão aumentará [2].

Normalmente, o glutamato é removido da fenda sináptica por transportadores (GLAST e GLT-1) encontrados em astrócitos, células gliais responsáveis pelo metabolismo do glutamato e reutilização pelos neurônios [3]. A captação de glutamato por astrócitos previne a excitotoxicidade, fenômeno encontrado em inúmeras patologias cerebrais agudas e crônicas.

Além disso, astrócitos são responsáveis por fornecer substratos energéticos, como lactato, para os neurônios, suprimindo suas elevadas demandas energéticas. Assim, a propagação da área de infarto pode modular disponibilidade de substratos e utilização pelo cérebro.

OBJETIVO

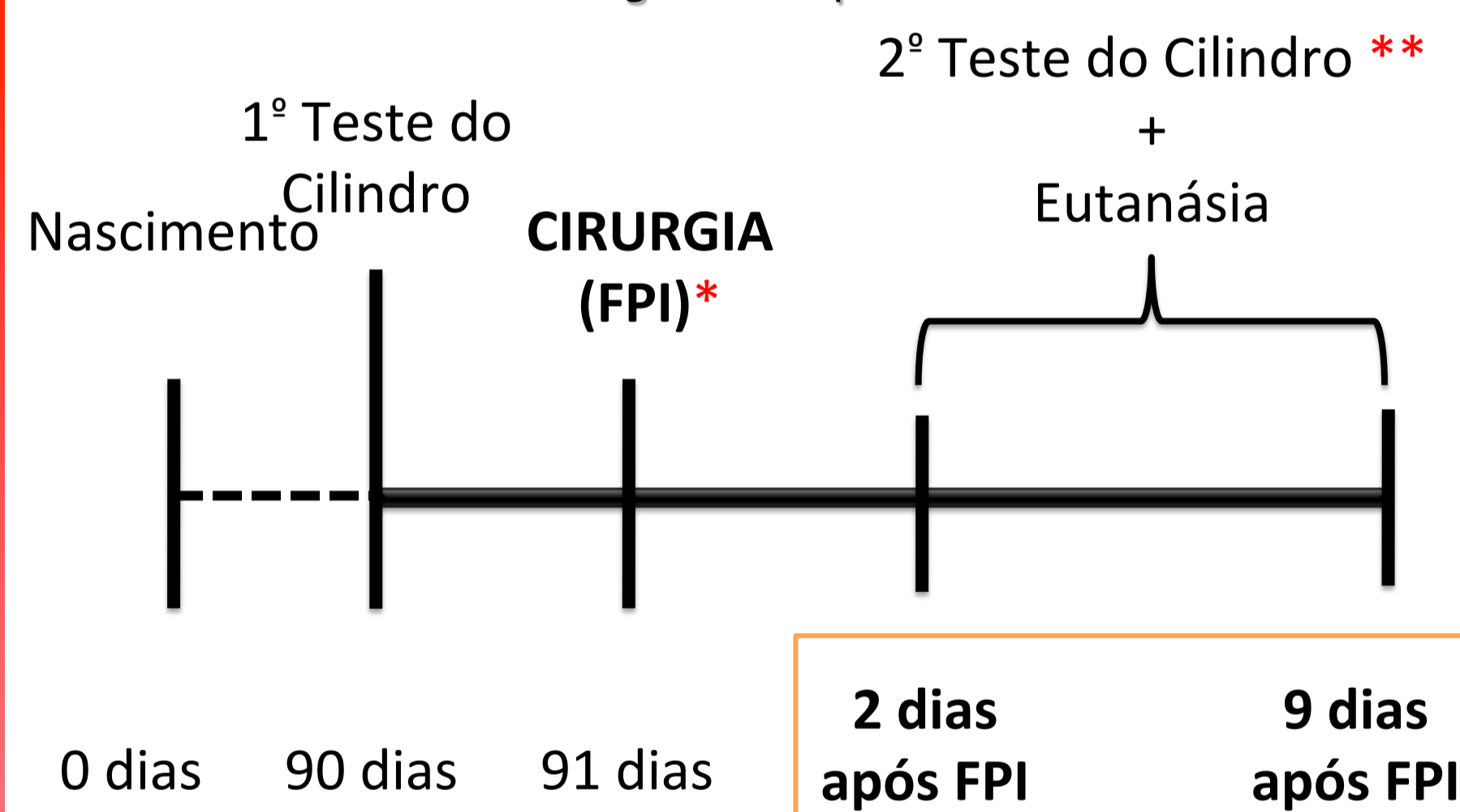
Considerando o papel do metabolismo astrocitário na excitotoxicidade e produção energética, este estudo avalia o efeito da propagação da injúria no metabolismo energético cerebral 2 e 9 dias após isquemia focal permanente (FPI).

MATERIAIS E MÉTODOS

Ratos Wistar machos adultos (90 dias, 250 – 350 g) foram divididos aleatoriamente em dois grupos: sham (SS) e isquemia (IS). A FPI foi induzida cirurgicamente por termocoagulação do sangue nos vasos principais dos córtices motor e sensoriomotor [5]. Animais do grupo SS foram submetidos apenas à craniotomia.

DESIGN EXPERIMENTAL

Modelo cirúrgico + Tempos analisados



*SS: Animais submetidos somente à craniotomia.
**O teste do cilindro foi usado para avaliar a taxa de simetria do animal. Para o grupo IS, apenas animais com taxas entre 0 e 30% foram usados para experimentos bioquímicos [6].

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Regiões cerebrais analisadas + metodologia

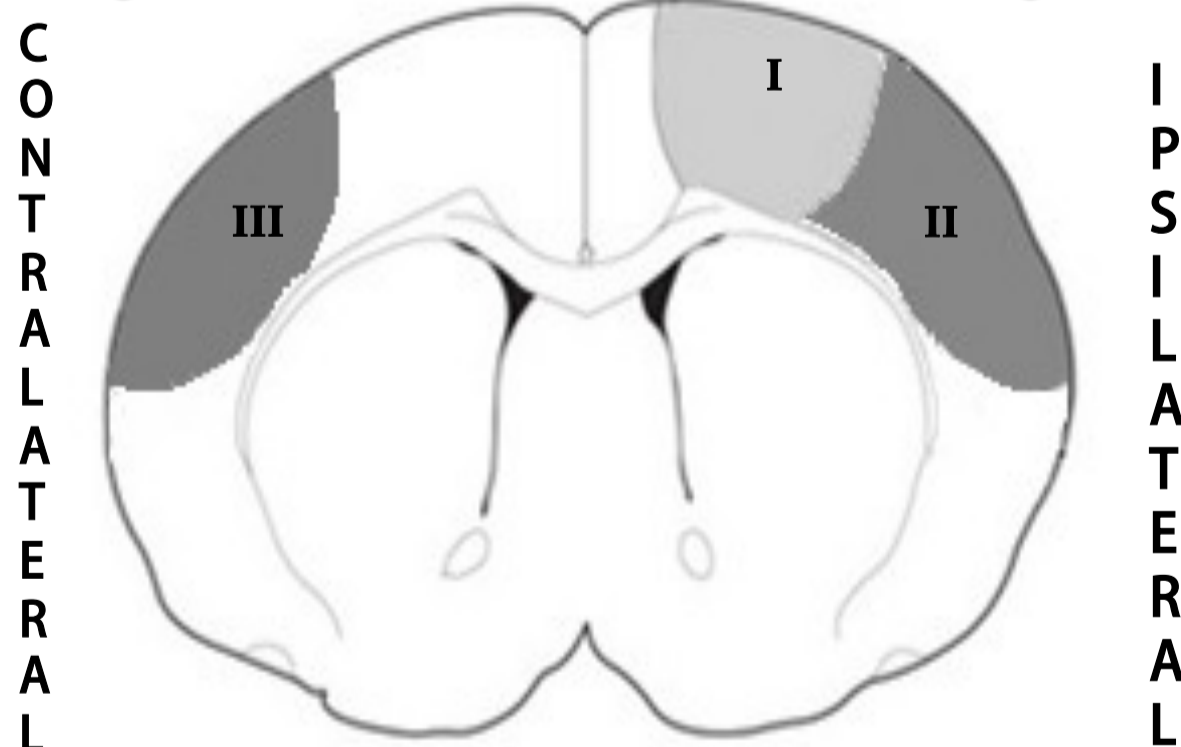


Figura 1.
I – Área de infarto: lesão estrutural;
II – Área adjacente à área de infarto (penumbra);
III – Região equivalente à região II, contralateral.

VOLUME DE INFARTO foi obtido pelo método de coloração do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) [7];

CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO foi realizada em fatias usando lactato-³H [8].

CAPTAÇÃO DE LACTATO foi realizada usando lactato-C¹⁴.

OXIDAÇÕES DE SUBSTRATOS (glutamato e lactato) foram mensuradas pela produção de CO₂ marcado com C¹⁴ num contador de cintilações e expressas como pmol / min / mg de tecido [9].

IMUNOCONTEÚDO dos transportadores GLAST, GLT-1, MCT-2 e MCT-4 foi analisado por Western Blot.

RESULTADOS

TESTE DO CILINDRO

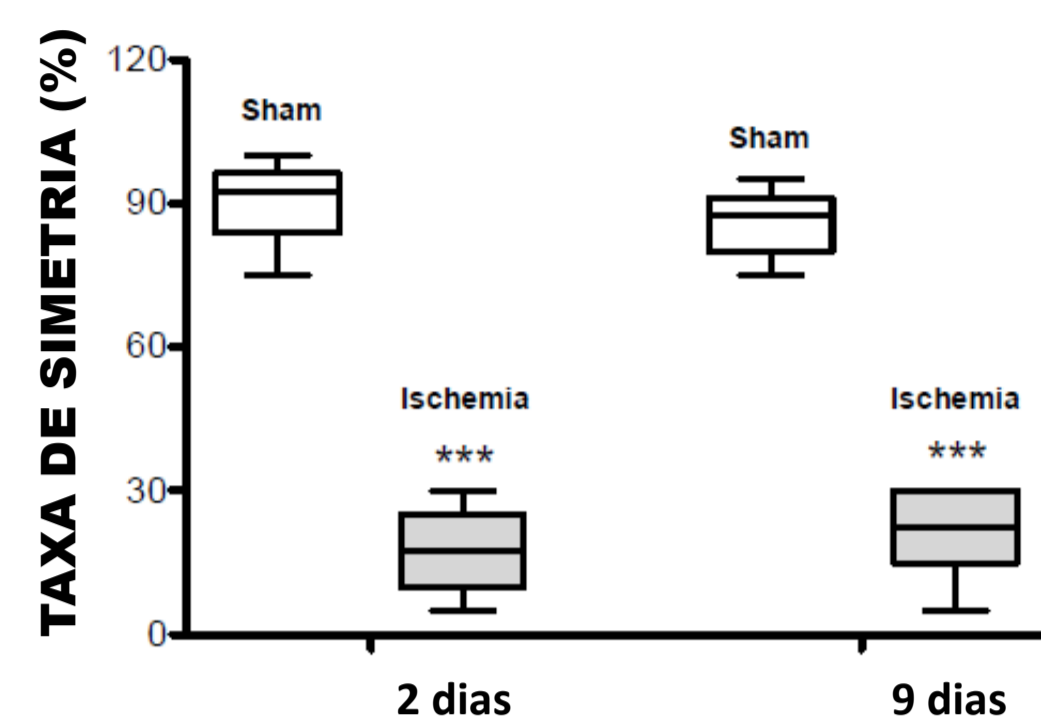


Figura 2. O modelo produz uma disfunção acentuada no membro anterior contralateral, como pode-se observar no teste do cilindro. Não foi observada disfunção do membro anterior no grupo SS.

VOLUME DE INFARTO

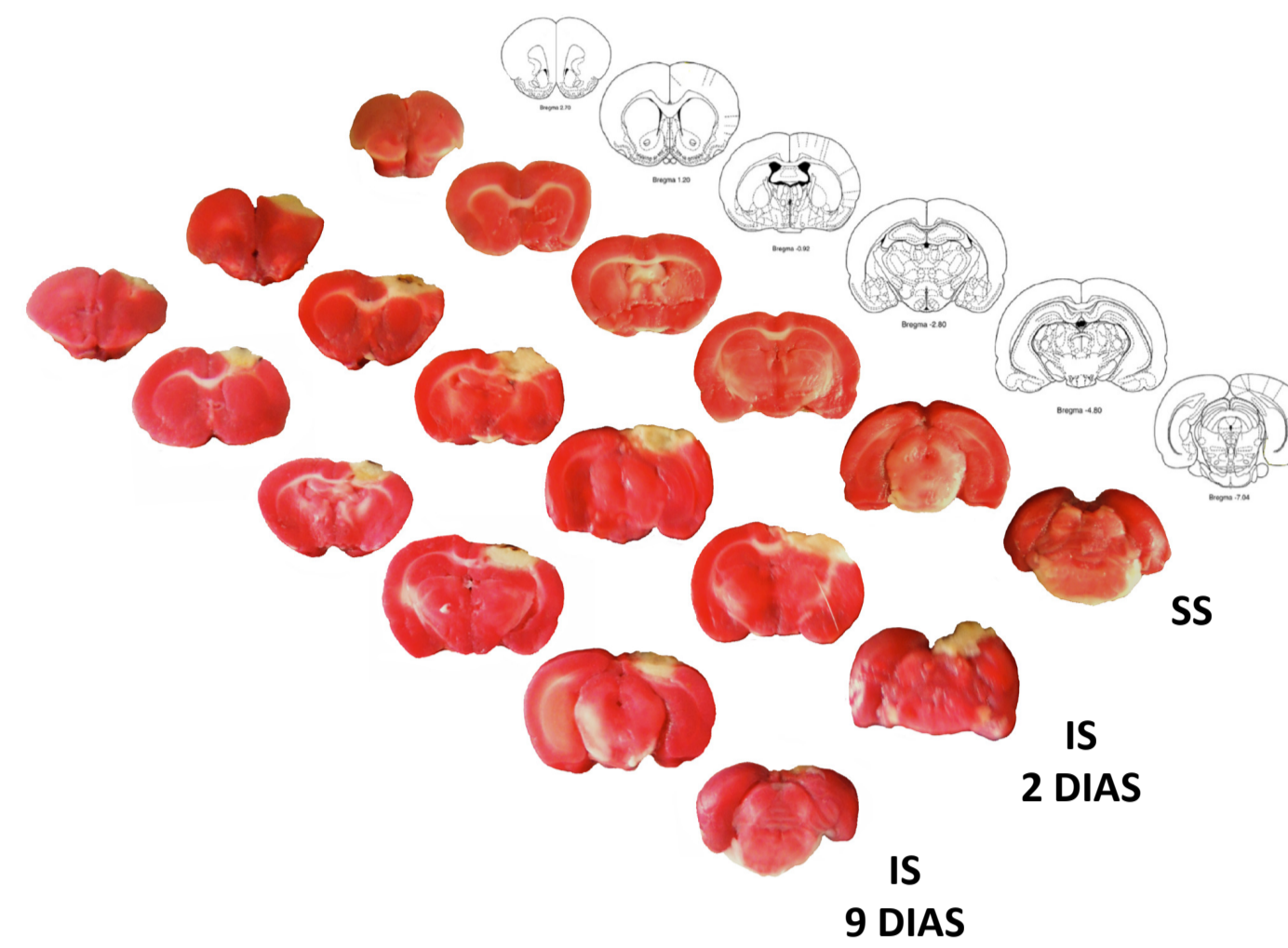


Figura 3. Método de coloração TTC. Brevemente as fatias foram imersas por 30 minutos em uma solução contendo 2% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (Sigma, USA) a 30°C seguido de fixação de um dia para o outro numa solução contendo 4% de paraformaldeído (Sigma, USA). As fatias foram analisadas por Image J software (NIH, USA) e o volume de infarto foi calculado como descrito previamente. Volume de infarto médio = 119,188 mm³.

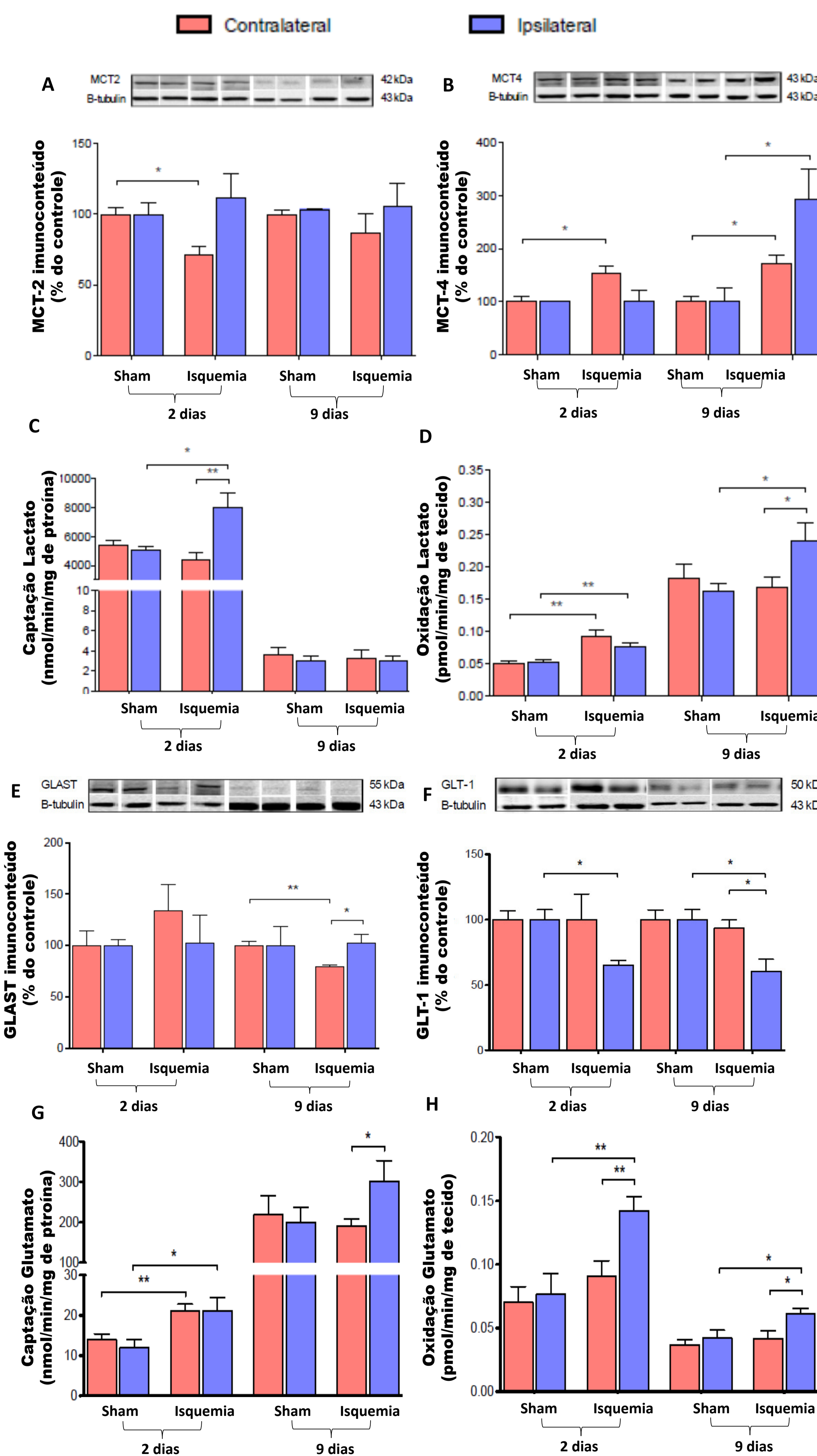


Figura 3. Modelo de FPI alterou a captação e a oxidação de substratos energéticos e o imunocônteuo de seus transportadores. (A) aumento nos níveis proteicos de MCT-2 contralateral em 2 dias; (B) aumento nos níveis proteicos de MCT-4 contralateral em 2 dias e em ambos hemisférios em 9 dias; (C) aumento na captação de lactato em ambos os hemisférios em 2 dias; (D) aumento na oxidação de lactato em ambos os hemisférios em 2 e 9 dias; (E) aumento nos níveis proteicos de GLAST em ambos os hemisférios em 9 dias; (F) aumento nos níveis proteicos de GLT-1 ipsilateral em 2 e 9 dias; (G) aumento na captação de glutamato em ambos os hemisférios em 2 dias; (H) aumento na oxidação de glutamato ipsilateral em 2 e 9 dias.
Teste t, * P < 0,05; ** P < 0,01.

DISCUSSÃO

Considerando os resultados, o modelo de FPI mostrou modular o metabolismo energético, bem como a utilização de lactato e de glutamato como fonte energética em ambos os hemisférios, demonstrando um acoplamento entre o sistema glutamatérgico e a lançadeira de lactato, bem como a participação do hemisfério intacto nas alterações que visam preservar a função cerebral pós-FPI.

O aumento na taxa no metabolismo do glutamato sugere que FPI induziu modulações no sentido de remover glutamato da fenda sináptica para prevenir excitotoxicidade. Ainda, o aumento na disponibilidade de glutamato e o fluxo sanguíneo restrito na zona de penumbra podem estimular sua utilização como fonte de ATP. Além disso, este neurotransmissor é conhecido por ser uma fonte energética astrocitária e pode ser usado para fornecer o ATP necessário para sua própria captação [10].

Sabe-se que o glutamato pode ser convertido a lactato através de um rota metabólica específica [10] e o link entre o metabolismo do glutamato e do lactato pode estar relacionado com o aumento da captação de glutamato no hemisfério contralateral, uma vez que astrócitos podem fornecer aos neurônios lactato derivado de glutamato. O aumento da quantidade de transportadores de glutamato e lactato podem ser parte do mecanismo relacionado à tolerância isquêmica induzida no grupo IS 9 dias pós-FPI.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Em conclusão, estes resultados sugerem que a isquemia induz modulações em astrócitos que podem ser protetoras e podem desempenhar um papel na tolerância isquêmica e na recuperação pós acidente vascular encefálico. Além disso, a lesão por FPI afeta ambos os hemisférios cerebrais, além de que outras vias que conectam ambos os lados do cérebro podem estar envolvidas na tentativa de conter o avanço da região infartada. Maiores análises envolvendo transportadores de glutamato e lactato devem ser realizados para esclarecer os mecanismos relacionados ao dano cerebral isquêmico.

Em resumo, observou-se que a isquemia induz formas reparativas e protetoras de plasticidade que podem desempenhar um papel importante na recuperação e na tolerância pós AVEI.

PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES DO ESTUDO:

- O modelo de FPI afeta ambos os hemisférios, aumentando a captação de glutamato e modulando a utilização de substratos energéticos;
- Para os experimentos futuros, vias que conectam ambos os lados do cérebro devem ser consideradas, visto que elas podem estar envolvidas numa tentativa de conter o avanço da região infartada;
- Mais estudos são necessários para compreender os mecanismos por trás dessas alterações.

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

HEMISFÉRIO CONTRALATERAL		HEMISFÉRIO IPSILATERAL	
2 dias	9 dias	2 dias	9 dias
↑ CAPTAÇÃO GLUTAMATO	↑ GLAST	↑ CAPTAÇÃO GLUTAMATO	↑ CAPTAÇÃO GLUTAMATO (IS)
↑ CAPTAÇÃO LACTATO	↑ MCT-4	↑ OXIDAÇÃO GLUTAMATO	↑ OXIDAÇÃO GLUTAMATO
↑ MCT-4		↑ CAPTAÇÃO LACTATO	↑ GLAST
			↑ MCT-4

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos até agora na propagação do dano isquêmico ao longo do tempo no sistema glutamatérgico e no metabolismo energético.

REFERÊNCIAS

- [1] Phillips JW, O'Leary MH, Estévez AY, Song D, Vonder Heide SJ. Cerebral energy metabolism during severe ischemia of varying duration and following reperfusion. *J Neurochem*. 1996 Oct;67(4):1325-31.
- [2] Scalzo F, Nour M, Liebeskind DS. Data Science of Stroke Imaging and Enlightenment of the Penumbra. *Frontiers in Neurology*. 2015;6:8.
- [3] Voutsinos-Porche B, Borvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY, Magistretti PJ, Pellierin L. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron*. 2003 Jun;33(2):275-86.
- [4] Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int*. 2007 Nov-Dec;51(6-7):333-55.
- [5] Hansen T, Ramos DB, Delgado CA, Souza DG, Almeida RF, Portela LV, Quincozes-Santos A, Souza DO. The potential therapeutic effect of guanosine after cortical focal ischemia in rats. *PLoS One*. 2014 Feb;9(2):e89093.
- [6] Schallert T. Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *2006 Neuro Rx* 3(4):497-504.
- [7] Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. A semi automated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow and Metab*. 1990 Mar;10(2):296-3.
- [8] Thomas AP, Godinho GF, Rodrigues JM, Schwalm FD, Frizzo ME, Moriguchi E, Souza DO, Wolfchuk ST. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech Ageing Dev*. 2004 Jul;125(7):475-81.
- [9] Schmidt B, de Assis AM, Battu CE, Rieger DK, Hansen F, Sordi F, Longoni A, Hoefel AL, Farina M, Gonçalves CA, Souza DO, Perry ML. Effects of glycyl or methylglyoxal on the metabolism of amino acids, lactate, glucose and acetate in the cerebral cortex of young and adult rats. *Brain Res*. 2010 Feb;22:1315-19-24.
- [10] McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Ziegle HR. Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem*. 1996;66:386-393.

SUPOORTE FINANCEIRO

