

Pré-tratamento com Ceftriaxona modula o metabolismo energético cerebral em ratos submetidos a um modelo experimental de isquemia focal permanente

Apel, R.V.¹; Souza, D.O.¹

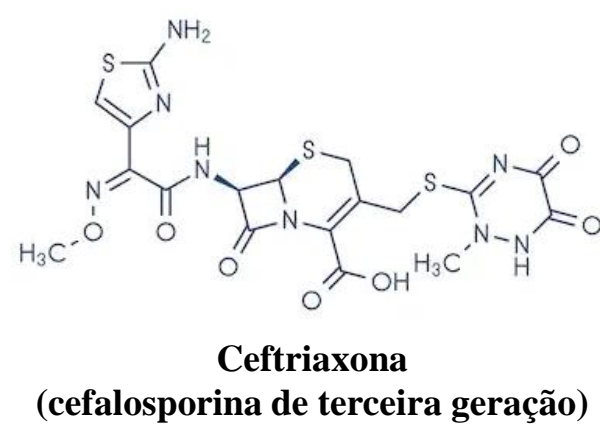
¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, UFRGS
Departamento de Bioquímica/Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Introdução & Objetivo

A isquemia cerebral (IC) é uma das principais causas de mortalidade e deficiência adquirida em humanos. Assim sendo, é necessário investigar as vias que levam à reparação e à recuperação da função cerebral na área atingida.

Um das principais causas da patofisiologia da IC é a perda de homeostase na neurotransmissão glutamatérgica, resultando na superativação dos seus receptores e na morte celular relacionada à excitotoxicidade. A concentração de glutamato extracelular é controlada por transportadores de glutamato, incluindo o transportador de glutamato 1 (GLT-1).

Estudos recentes demonstram que a ceftriaxona (CTX), um antibiótico beta-lactâmico, pode induzir tolerância à isquemia por aumentar a expressão de GLT-1. Entretanto, nenhum estudo avaliou as alterações metabólicas decorrentes da modulação do transporte de glutamato por CTX após a indução de evento isquêmico.

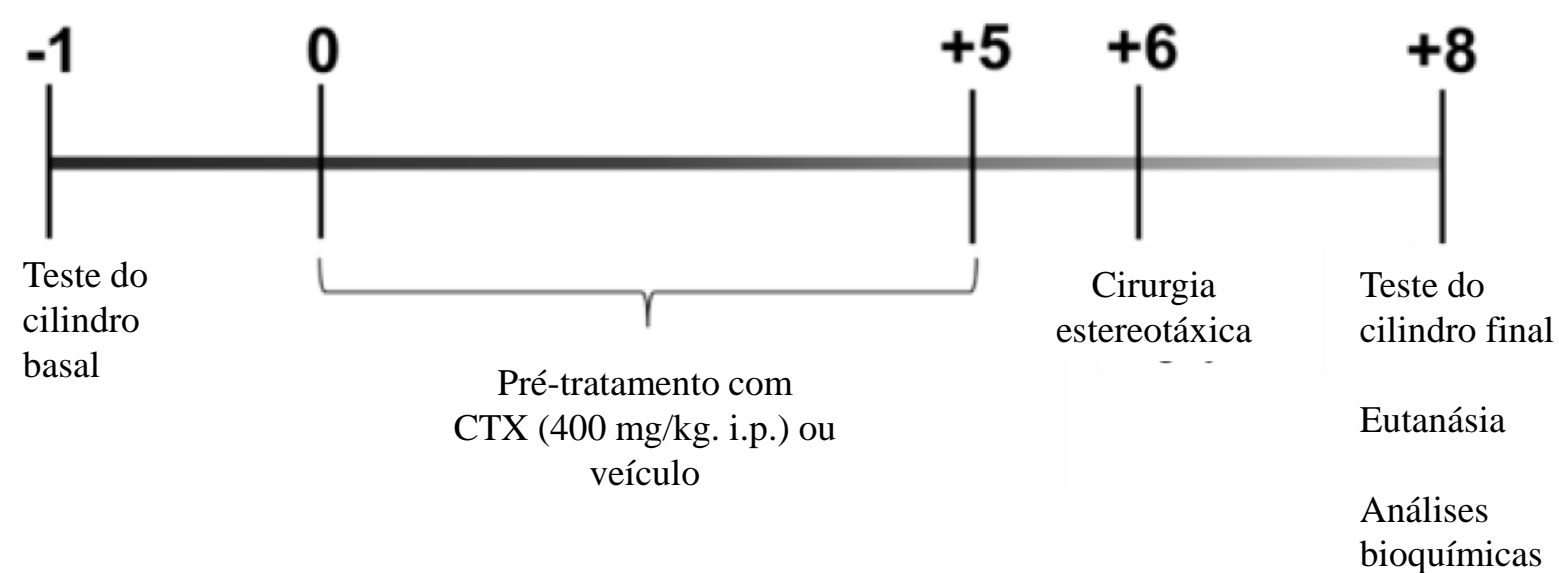


Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações decorrentes de um protocolo de pré-tratamento com CTX em ratos submetidos à isquemia focal permanente (FPI), com enfoque no metabolismo energético

Métodos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRGS (#31516). Foram utilizados ratos Wistar machos de 90 dias divididos em quatro grupos: sham salina (SS), sham CTX (SCTX), isquemia salina (IS), e isquemia CTX (ICTX). Os animais dos grupos pré-tratados receberam CTX (400mg/kg) por cinco dias previamente à isquemia focal permanente (FPI), enquanto outros receberam apenas veículo (salina). A FPI foi realizada por termocoagulação dos vasos piais dos córtices motor e sensoriomotor, enquanto nos animais sham foi realizada somente craniotomia em equipamento estereotáxico.

Design Experimental



As seguintes análises foram realizadas no hemisfério lesionado - ipsilateral (IP)

Volume de infarto por coloração de TTC;
imunocontéudo de GLT-1 por Western Blot;
Oxidação de substratos marcados radioativamente
Concentração de aminoácidos no líquido por HPLC.

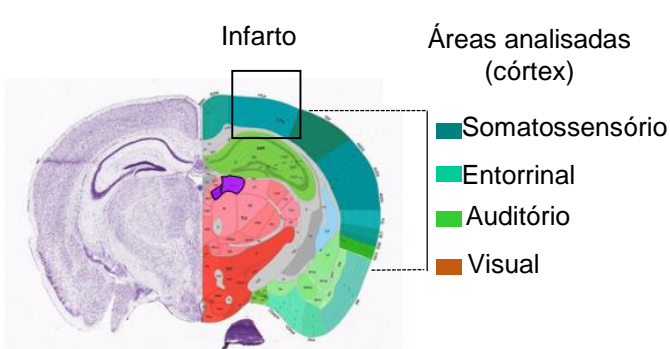


Figura 1. Representação das áreas corticais cerebrais analisadas neste estudo nos experimentos *ex vivo* (imagem adaptada do Allen Brain Atlas).

Apoio financeiro



Resultados

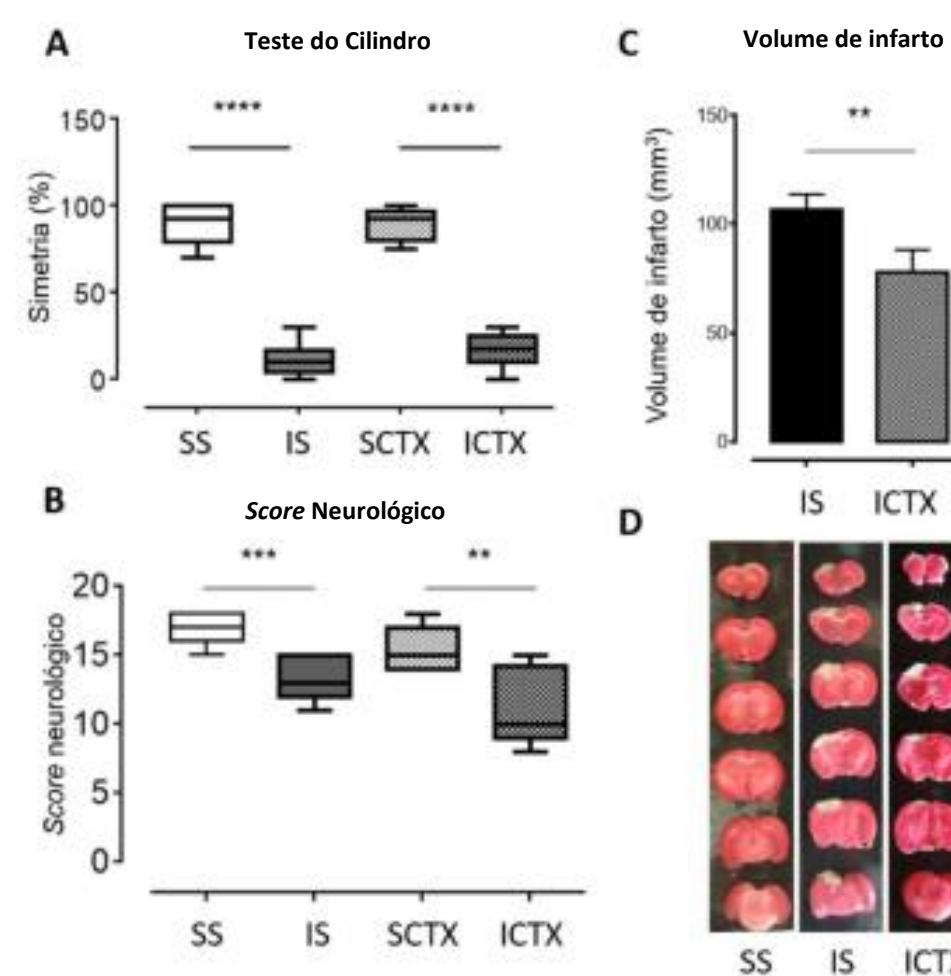


Figura 2. Testes de performance motora e determinação do volume de infarto 2 dias pós-FPI (A) Diferenças na taxa de simetria entre os grupos experimentais; **** $P < 0,0001$ (teste *t*, $n=10$ por grupo); (B) A FPI causou uma diminuição de performance dos animais nos testes de score neurológico. A CTX não preveniu nem melhorou esse déficit motor; *** $P < 0,001$ (teste *t*, $n=10$ por grupo), ** $P < 0,01$ (teste *t*, $n=10$ por grupo); (C) A FPI produziu infarto cortical, o qual se mostrou reduzido nos animais pré-tratados com CTX (grupo ICTX), como demonstrado pela coloração por TTC; ** $P < 0,01$ (teste *t*, $n=7$ por grupo); (D) Representação da coloração por TTC nos grupos IS e ICTX quando comparados ao grupo SS. Resultados expressos por média + S.E.M.

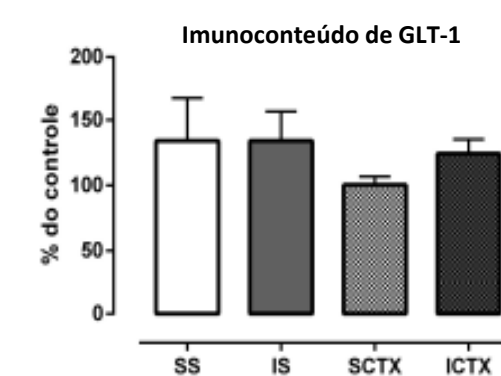


Figura 3. Imunocontéudo de GLT-1. Os resultados do imunocontéudo de GLT-1 não demonstram diferenças significativas entre os diferentes grupos (ANOVA de uma via).

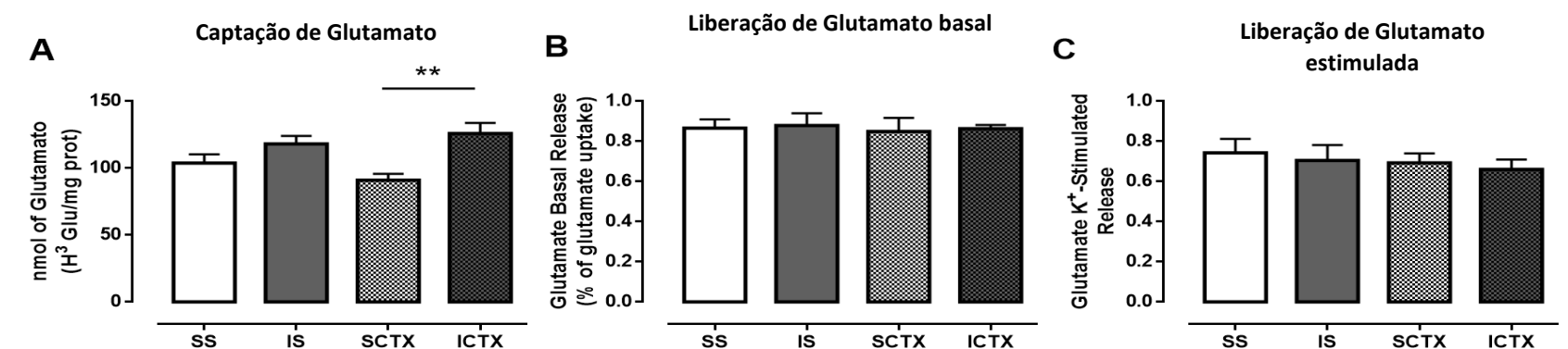


Figura 4. Captação e liberação de ³H]-Glutamato de vesículas sinápticas 2 dias pós-FPI (A) Pré-tratamento com CTX aumenta a captação de ³H]-Glutamato no hemisfério ipsilateral ao submetido a FPI quando comparado com o grupo Sham (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Sidak para múltiplas comparações, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$); (B) liberação padrão de ³H]-Glutamato (relativa ao ³H]-Glutamato captado); (C) liberação de ³H]-Glutamato estimulada por K⁺ não mostrou diferenças entre os grupos. Resultados expressos por Média+S.E.M.

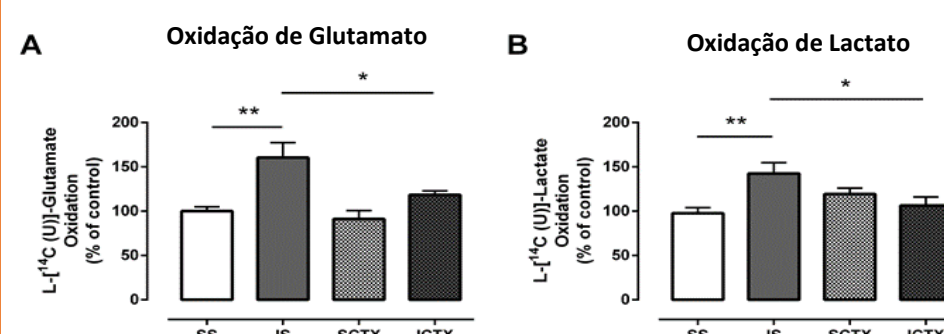


Figura 5. Oxidação dos substratos energéticos em ¹⁴CO₂ 2 dias pós FPI (A) Taxa de oxidação de Glutamato e de (B) lactato entre os grupos experimentais. * $P < 0,05$ (ANOVA de uma via, $n=7$ por grupo); ** $P < 0,01$ (ANOVA de uma via seguida por teste de Tukey pós teste hoc, $n=7$ por grupo).

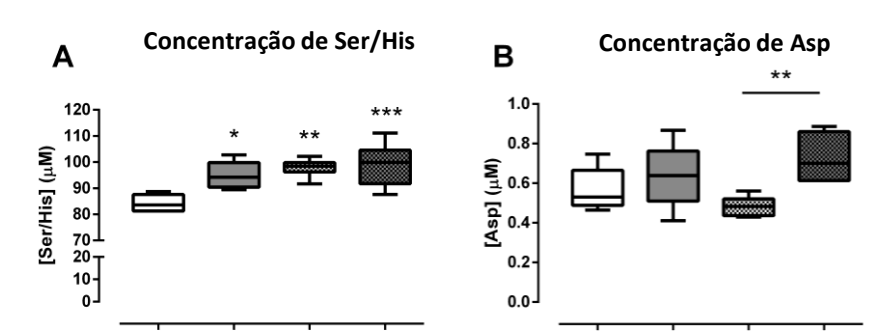


Figura 6. Quantificação de níveis de Aminoácidos em CSF por HPLC. (A) O pico de Ser/His é elevado por efeito do dano causado pela FPI e/ou do pré-tratamento de CTX (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey pós teste hoc para múltiplas comparações, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$); (B) Níveis de Asp estão elevados no grupo ICTX quando comparados aos do grupo SCTX (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey pós teste hoc para múltiplas comparações, ** $P < 0,01$).

Discussão e Conclusão

Observamos que:

- O pré-tratamento com CTX reduziu o volume de infarto causado pela FPI ($P < 0,0001$);
- O imunocontéudo de GLT-1 não foi alterado, entretanto sua diminuição causada pela FPI foi prevenida no grupo (ICTX);
- O pré-tratamento com CTX reduziu a taxa de oxidação de glutamato pós-FPI (ICTX), retornando aos valores basais quando comparado com o grupo não tratado (IS) (fig. 4A). Um efeito igual foi observado com a oxidação de lactato marcado para os mesmos grupos (fig. 4B);
- O aumento estatístico no pico de Ser/His (fig. 4), bem como um aumento no pico de Asp no grupo ICTX em comparação com o SCTX ($P < 0,01$) (fig. 3), apontam para um efeito do pré-tratamento com CTX que vai além da modulação do sistema glutamatérgico, causando alterações que ditam a utilização de substratos energéticos pelas células neurais.

Este foi o primeiro estudo que considerou os efeitos da CTX no metabolismo energético cerebral após dano isquêmico. Maiores investigações são necessárias para elucidar os mecanismos pelos quais a CTX exerce esses efeitos.