

Mudança na preferência de substratos energéticos pelo encéfalo de *zebrafish* após crises epiléticas prolongadas induzidas por pentilenotetrazol.

Gabriela Lazzarotto¹, Ben Hur Mussulini¹, Ivi Bristot², Kamila Zenki¹, Renato Dias¹, Fábio Klamt², Diogo Losch de Oliveira¹.
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, Laboratório de neurociência celular e molecular¹, Laboratório de Bioquímica Celular².

INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada por crises epiléticas recorrentes associadas a depleção energética (Folbergrová and Kunz 2012). Porém, essa afirmação não é coerente no que se diz respeito à demanda de ATP necessária para manter uma crise epilética. Embora certas características metabólicas estejam bem estabelecidas, como hipometabolismo da glicose ictal e interictal (Smeland et al., 2013), o papel de outros importantes substratos (glutamato, lactato, glutamina, ácido hidroxibutirato) nas crises epiléticas ainda não está claro. Uma maneira confiável de definir o impacto dessas moléculas na crise epilética é medir o consumo de oxigênio acoplado a produção de ATP das células na presença de cada composto. Isto pode ser realizado utilizando o equipamento Oroboros®. Além do mais, a obtenção dessas respostas é de grande relevância para o desenvolvimento de novos fármacos, já que 30% dos pacientes epiléticos são refratários aos tratamentos atuais. Neste contexto, o modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol (PTZ) em *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto parece ser uma excelente escolha (Mussulini et al., 2013). Porém a literatura carece de uma caracterização precisa do metabolismo cerebral de *zebrafish* adulto. Assim, temos que atingir os seguintes objetivos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o protocolo de respiração basal em amostra de encéfalo de *zebrafish*.
- Detectar o hipometabolismo da glicose a partir da medida do consumo de O₂ acoplado a síntese de ATP durante e depois de uma crise convulsiva prolongada.
- Definir o impacto do glutamato, glutamina, ácido hidroxibutirato e lactato no consumo de O₂ acoplado a síntese de ATP utilizando concentrações fisiológicas e patofisiológicas dos substratos.

MÉTODOS

Foi utilizado encéfalo de *zebrafish* adulto em todos os experimentos. Antes da morte por decapitação, todos os animais foram anestesiados por imersão em triclaína 168 µg/mL. Logo após, o encéfalo foi removido e transferido para 100 µL de uma solução contendo 137 mM NaCl; 0.63mM Na₂HPO₄; 3.0 mM NaHCO₃; 5.36 mM KCl; 0.44 mM KH₂PO₄; 1.26 mM CaCl₂; 0.90 mM MgSO₄; 5.55 mM glicose; e 20 mM HEPES, pH 7.4. A temperatura da solução e do equipamento Oroboros foi de 28 °C. Todos os parâmetros estão de acordo com o Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os controles de homogeneização, pressão mecânica e dissociação foram feitos usando o ensaio de Trypan Blue e confirmados pelo protocolo de integridade de membrana por succinato (10mM). Uma curva de consumo de oxigênio por peso de amostra foi realizada (1 encéfalo = 4mg). Para determinar a concentração da oligomicina (0,5µg/mL – 8µg/mL), do FCCP (0,025 µM – 0,5 µM) e do KCN (0,5mM – 2mM) foram usados 2 encéfalos em cada etapa. Para concluir a sessão de caracterização, 144 animais foram utilizados.

Para determinar o hipometabolismo da glicose associado ao consumo de O₂ acoplado à produção de ATP, os animais foram imersos em PTZ 10mM durante 2,5, 5 e 20 minutos. O mesmo parâmetro foi testado 1 e 3 horas após a crise epilética. Para concluir essa sessão, 48 animais foram utilizados.

O impacto sobre o consumo de O₂ acoplado à produção de ATP dos seguintes substratos foram avaliados sob condição de controle e também após 20 minutos de exposição dos animais ao PTZ 10 mM: Glutamato (glu) 100µM e 1mM; glutamina (gln) 100 e 500 µM; hidroxibutirato (HB) 0.1 e 0.7 mM; lactato (Lac) 1 e 10 mM. Cada concentração representa a quantidade de substrato em um cérebro sem convulsão (normal) e um cérebro depois de uma convulsão prolongada. Para concluir essa sessão 192 animais foram utilizados.

RESULTADOS – PRIMEIRO OBJETIVO ESPECÍFICO

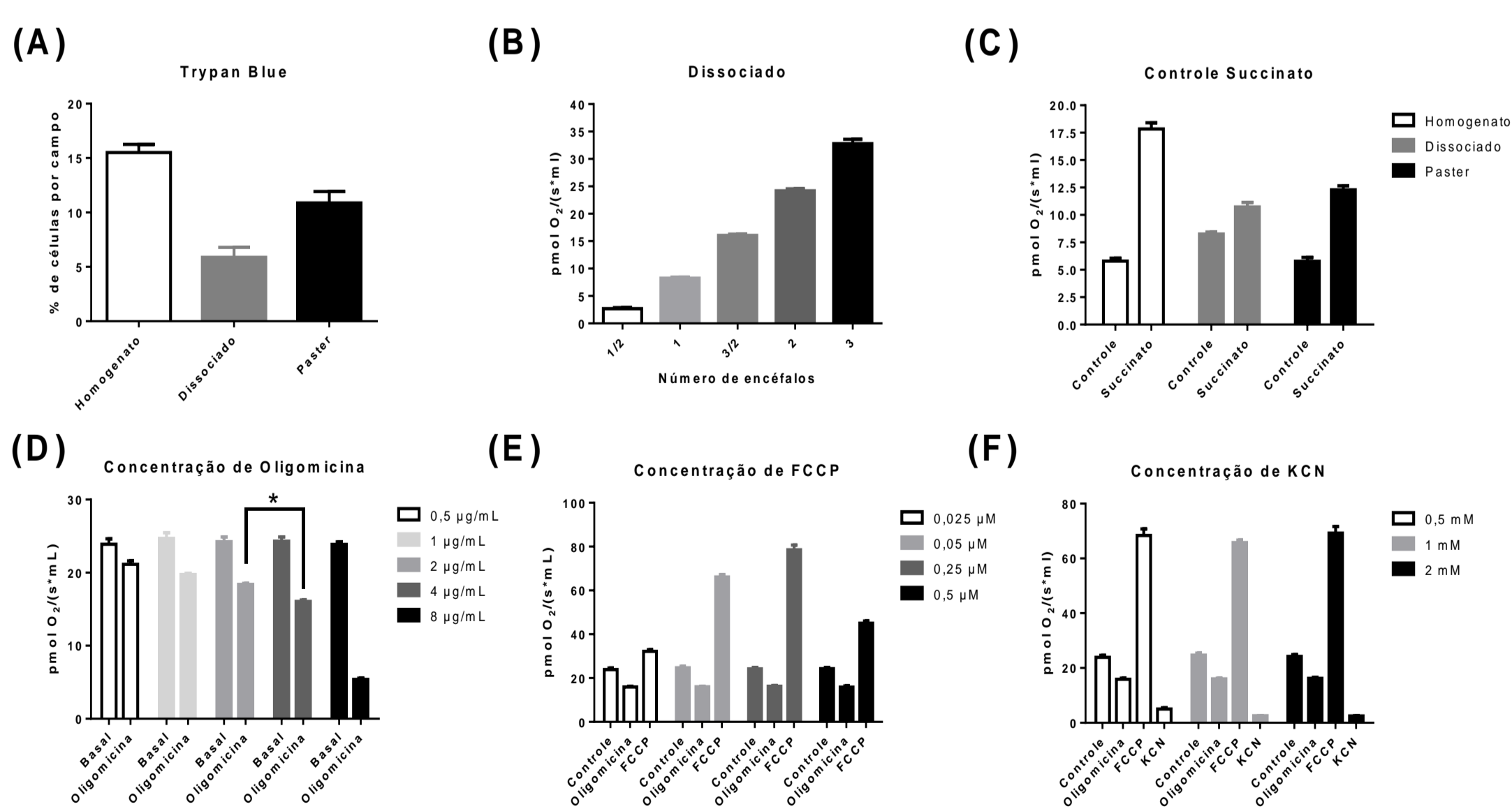


Figura 1: Caracterização do protocolo de respiração basal em amostra de encéfalo de *zebrafish*. Uma suave pressão mecânica no tecido levou a uma menor marcação por Trypan Blue (A) e a uma menor variação no consumo de pmol O₂/(s*mL) depois da administração do succinato (B). O segundo passo foi realizar uma curva de consumo de oxigênio por peso (1 cérebro ± 4mg). Foi detectada uma curva linear de 1/2 a 3 cérebros (C). O terceiro passo foi definir as melhores concentrações de Oligomicina (D), FCCP (E) e (KCN). As concentrações selecionadas foram: 4µg/mL, 0,25µM e 10mM, respectivamente. Os dados estão representados como média ± S.E.M e foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. O símbolo * representa diferença estatística (p<0.05). Nos parâmetros A,B e C, utilizou-se n=4. Nos parâmetros D,E e F, utilizou-se n=8.

RESULTADOS – SEGUNDO OBJETIVO ESPECÍFICO

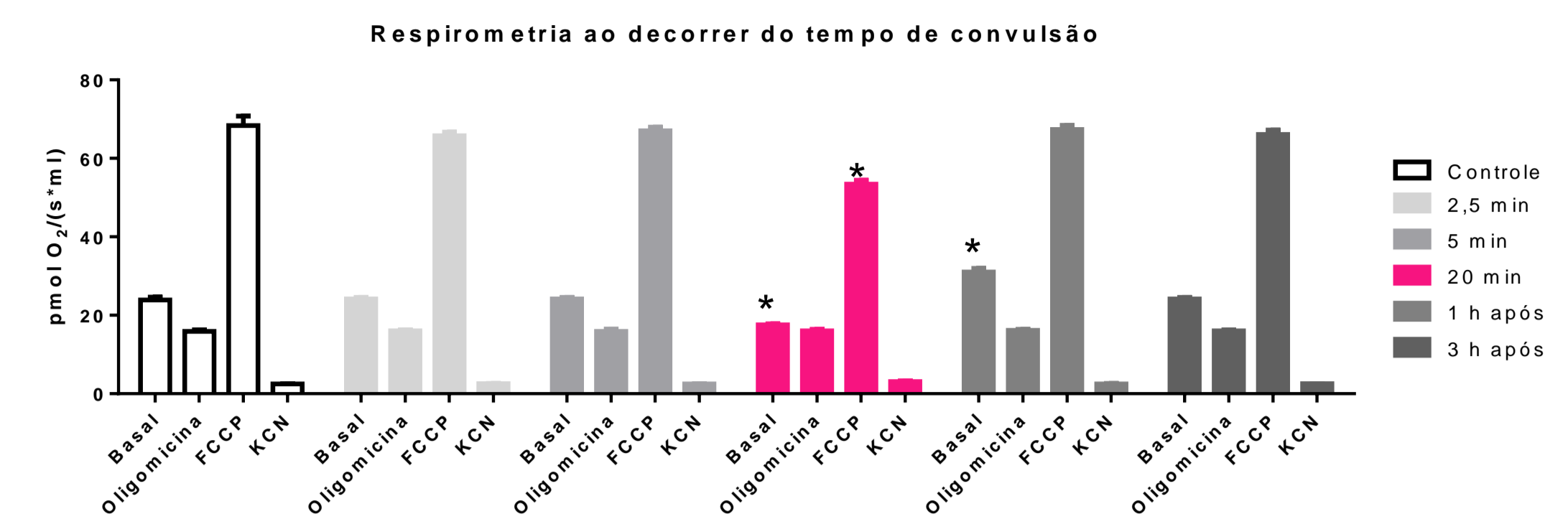


Figura 2: Respirometria basal de alta resolução ao decorrer do tempo de crise epilética. Houve redução na respiração basal após uma crise epilética prolongada de 20 minutos. Neste momento, não houve consumo de O₂ acoplado a produção de ATP. Isto foi chamado de hipometabolismo da glicose acoplado ao consumo de O₂ para produção de ATP. Houve também redução da respiração máxima. Uma hora após a convulsão a rotina respiratória aumentou 50% quando comparada ao controle. Os dados estão representados como média ± S.E.M e foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. O símbolo * representa diferença estatística (p< 0.05). Para todos os parâmetros, n = 8.

RESULTADOS – TERCEIRO OBJETIVO ESPECÍFICO

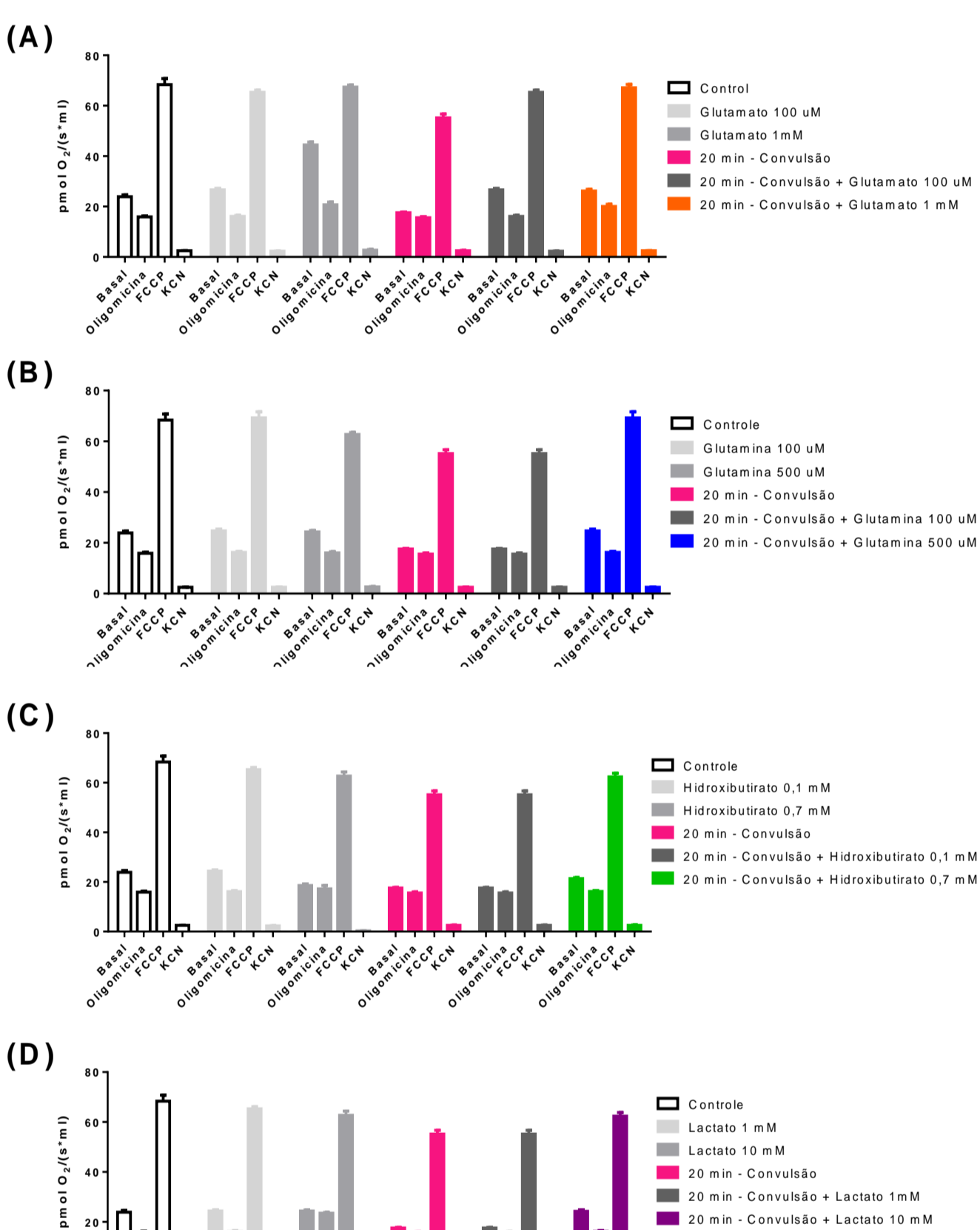


Figura 3: Impacto de diferentes substratos energéticos sobre a respirometria na presença de glicose.

Os substratos **Glutamato** 100µM e 1mM, **glutamina** 500µM, **hidroxibutirato** 0.7mM e **lactato** 10mM foram capazes de reverter os efeitos da crise epilética prolongada sobre a respiração basal. Somente o glutamato apresentou o efeito de reverter a convulsão com concentrações que podem ser encontradas em estado fisiológico. Os dados estão representados como média ± S.E.M e foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. O símbolo * representa diferença estatística (p< 0.05) quando comparado ao controle. O símbolo # representa diferença estatística quando comparado aos efeitos da **crise epilética prolongada** de 20 min na respirometria basal. Para todos os parâmetros, n = 8.

DISCUSSÃO

Apesar do hipometabolismo da glicose ser aceito em diferentes situações de crises epiléticas, nós, como cientistas, não podemos nos esconder atrás de condições controladas de estudo. Muitos protocolos de neuroquímica que estudam neuropatologia da epilepsia são baseados no uso de glicose como substrato energético e sob condições fisiológicas. A partir de agora, devemos estudar as pistas que a natureza está nos oferecendo, principalmente as que envolvem os mecanismos naturais de terminação de crises epiléticas. Em suma, nosso estudo mostra a reversão do hipometabolismo da glicose acoplado ao consumo de O₂ para produção de ATP quando o cérebro foi exposto ao **Glu**, **Gln**, **HB** e **Lac** em concentrações patofisiológicas após uma convulsão prolongada. Será que isso significa que a excitotoxicidade está conectada a necessidades metabólicas? São esses substratos que contribuem como moléculas de sinalização para hiperativar o cérebro, ou poderia o lactato estar envolvido, de alguma maneira, na tentativa de inibição (Bozzo et al., 2013)? A respirometria poderia ser usada para monitorar neuroquimicamente o efeito anti-convulsivo de potenciais varreduras farmacológicas após a análise comportamental da crise? Muitas dúvidas surgem e são reforçadas após este estudo, mas uma coisa é certa: a partir de agora devemos adicionar diferentes substratos energéticos nos nossos protocolos experimentais para aumentar a compreensão das estratégias neurometabólicas de crises epiléticas prolongadas.

REFERÊNCIAS

- Mitochondrial dysfunction in epilepsy. Folbergrová J, Kunz WS. *Mitochondrion*. 2012 Jan;12(1):35-40.
 Brain mitochondrial metabolic dysfunction and glutamate level reduction in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. Smeland OB, Hadera MG, McDonald TS, Sonnewald U, Borges K. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013 Jul;33(7):1090-7.
 Seizures induced by pentilenotetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization. Mussulini BH, Leite CE, Zenki KC, Moro L, Baggio S, Rico EP, Rosemberg DB, Dias RD, Souza TM, Calcagnotto ME, Campos MM, Battastini AM, de Oliveira DL. *PLoS One*. 2013;8(1):e54515.
 Lactate modulates the activity of primary cortical neurons through a receptor-mediated pathway. Bozzo L, Puyal J, Chatton JY. *PLoS One*. 2013 Aug 12;8(8):e71721.

APOIO FINANCEIRO

