

7

Metanfetamina e o ciclo do glutamato no cérebro de murganho

FREDERICO PEREIRA

Artigo recebido em 26/04/11; versão final aceite em 06/06/11.

RESUMO

A metanfetamina (Meta) é uma droga psicoestimulante com propriedades adictivas significativas cuja utilização ultrapassou a da cocaína e heroína em alguns países, com acréscimo do seu consumo nas últimas décadas. O objectivo deste trabalho foi caracterizar o perfil cinético do impacto de uma dose neurotóxica de Meta na comunicação entre neurónios e astrócitos a nível do córtex frontal e no hipocampo do murganho. Murganhos adultos C57BL/6 (3-4 meses de idade) foram sacrificados às 4, 24 e 72 horas após a administração de dose única de Meta (30 mg.kg⁻¹ por via intraperitoneal) ou de solução salina (NaCl a 0,9%). Procedeu-se ao isolamento de duas áreas cerebrais, o córtex frontal e hipocampo para análise dos níveis totais de glutamato (Glu) e glutamina (Gln), do cociente glutamina/glutamato, da expressão da glutamina sintetase (GS), uma enzima astrocitária responsável pela reciclagem do glutamato libertado na sinapse) e da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), uma proteína estrutural astrocitária. Os aminoácidos foram avaliados por cromatografia líquida de alta resolução com detecção electroquímica (HPLC-ED), e os níveis de proteína em estudo foram analisados pela técnica *Western blot*. A injeção única de uma dose elevada de Meta produziu um aumento de 50%-60% na expressão do GFAP às 24 horas no hipocampo e no córtex frontal, a qual permaneceu elevada às 72 horas nesta região cortical. O aumento de 3 vezes na expressão de GS nesta área às 72 horas, em comparação com o controlo no córtex frontal, não teve tradução no cociente glutamina/glutamato. Os resultados sugerem que a Meta perturbou a comunicação cruzada entre neurónios e astrócitos no hipocampo.

Palavras-chave: Metanfetamina; Neurotoxicidade; Gliose Reactiva, Ciclo Glutamato-Glutamina; GS; GFAP.

RÉSUMÉ

La méthamphétamine (Méth) est une drogue psychostimulante avec des propriétés addictives dont l'utilisation a dépassé celle de la cocaïne et l'héroïne dans certains pays, avec une augmentation de la consommation dans les dernières décennies. L'objectif de cette étude était de caractériser le profil cinétique de l'impact d'une dose neurotoxique de Meth dans la communication entre les neurones et les astrocytes dans le cortex frontal et l'hippocampe des souris. Des souris adultes C57BL/6 (3-4 mois) ont été sacrifiées à 4, 24 et 72 heures après une dose unique de Meth (30 mg.kg⁻¹ par voie intrapéritonéale) ou une solution saline (NaCl 0,9%). On a isolé deux zones du cerveau, le cortex frontal et l'hippocampe, pour l'analyse des niveaux totaux de glutamate (Glu) et de glutamine (Gln), du quotient glutamine/glutamate, de l'expression de la glutamine synthétase (GS), une enzyme astrocytaire responsable pour la recyclage du glutamate libéré dans la synapse, et de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), une protéine structurelle astrocytaire. Les acides aminés ont été analysés par chromatographie liquide de haute résolution avec détection électrochimique (HPLC-ED), et les taux de protéines ont été analysés par la technique de *Western blot*. Une seule injection d'une dose élevée de meth produit une augmentation de 50%-60% dans l'expression de la GFAP à 24 h dans l'hippocampe et le cortex frontal, qui est demeuré élevé à 72 heures dans cette région corticale. L'augmentation de 3 fois dans l'expression de GS dans cette région à 72 heures, par rapport au contrôle dans le cortex frontal n'avait pas de traduction dans le quotient glutamine/glutamate. Les résultats suggèrent que la Meth a perturbé la communication croisée entre les neurones et les astrocytes dans l'hippocampe.

Mots-clé: Méthamphétamine; Neurotoxicité; Gliose Réactive; Cycle Glutamate-Glutamine; GS; GFAP.

ABSTRACT

Methamphetamine (METH) is a psychostimulant drug with significant addictive properties, the use of which surpassed that of cocaine and heroin in some countries, with an increase of consumption in recent decades. The aim of this study was to characterize the kinetic profile of the impact of a neurotoxic dose of Meth in the communication between neurons and astrocytes within the frontal cortex and hippocampus of the house mouse. Adult house mice C57BL/6 (3-4 months old) were sacrificed at 4, 24 and 72 hours after a single dose of Meth (30 mg.kg⁻¹, intraperitoneally) or saline (NaCl 0,9%). We proceeded with the isolation of two brain areas, the frontal cortex and the hippocampus, for analysis of total levels of glutamate (Glu) and glutamine (Gln), the quotient glutamine/glutamate, the expression of glutamine synthetase (GS), an astrocytic enzyme responsible for the recycling of glutamate released at the synapse, and glial fibrillary acidic protein (GFAP), an astrocytic structural protein. Aminoacids were evaluated by HPLC-ED, and protein levels were analyzed by the *Western blot* technique. METH treatment evoked an increase in striatal glutamine/glutamate ratio at 72 h, and also a two-fold increase of GFAP and GS expression at this time-point. A single injection of a high dose of Meth in the frontal cortex and hippocampus showed an early 50%-60% increase in GFAP expression at 24 h in the hippocampus and frontal cortex, that remained high at 72 h in the cortical area. The 3-fold increase in the GS expression in this area at 72 hours, compared with the control in the frontal cortex, had no translation in the quotient glutamine/glutamate. The results suggest that Meth disturbed the crossed communication between neurons and astrocytes in the hippocampus.

Key Words: Methamphetamine; Neurotoxicity; Reactive Gliosis; Glutamate-Glutamine Cycle; GS; GFAP.

RESUMEN

La metanfetamina (Meta) es una droga psicoestimulante con propiedades adictivas significativas cuya utilización ultrapasó la de cocaína y heroína en algunos países, con crecimiento de su consumo en las últimas décadas. El objetivo de este trabajo ha sido la caracterización del perfil cinético del impacto de una dosis neurotóxica de meta en la comunicación entre neuronas y astrócitos a nivel de la corteza frontal y en el hipocampo del murganjo. Murganjos adultos C57BL/6 (3-4 meses de edad) fueron sacrificados a las 4, 24 y 72 horas después de haber sido administrada la dosis única de Meta (30 mg.kg⁻¹ por vía intraperitoneal) o de solución salina (NaCl a 0,9%). Se aislaron las dos áreas cerebrales, la corteza frontal y el hipocampo, para análisis de los niveles totales de glutamato (Glu) y glutamina (Gln), del cociente glutamina/glutamato, de la expresión de la glutamina sintetase (GS), una enzima astrocitária responsable por la reciclaje del glutamato libertado en la sinapsis y de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), una proteína estructural astrocitária. Los aminoácidos fueron evaluados por cromatografía líquida de gran resolución con detección electroquímica (HPLC-ED), y los niveles de proteína en estudio fueron analizados por la técnica *Western blot*. La inyección única de una dosis elevada de Meta produjo un aumento de 50%-60% en la expresión del GFAP a las 24 horas en el hipocampo y en la corteza frontal, la cual permaneció elevada a las 72 horas en esta región cortical. El aumento de 3 veces en la expresión de GS en esta área a las 72 horas, en comparación con el control en la corteza frontal no tubo traducción en el cociente glutamina/glutamato. Los resultados sugieren que la Meta perturbó la comunicación cruzada entre neuronas y astrócitos en el hipocampo.

Palabras Clave: Metanfetamina; Neurotoxicidad; Gliose Reactiva; Ciclo Glutamato-Glutamina; Glutamina; GS; GFAP.

1 - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, e de acordo com um relatório das Nações Unidas (www.unodc.org/UNODC/pt/global_illicit_drug_trends.html), o consumo de anfetaminas ultrapassou, em alguns países, o abuso de outras drogas ilícitas, como a cocaína e a heroína, com acréscimo significativo das sequelas. A metanfetamina (Meta), uma anfetamina modificada, é usada pelas suas propriedades euforizantes, sensação de elevada capacidade de trabalho, aumento da atenção, energia, auto-confiança e pela diminuição da ansiedade (Anglin *et al.*, 2000). No entanto, o abuso crónico desta droga pode originar um quadro de esquizofrenia paranóide, défices de atenção e memória, provavelmente relacionados com uma disfunção dopaminérgica no estriado (Cadet *et al.*, 2003). A disfunção permanente dos terminais nervosos dopaminérgicos e serotoninérgicos nesta área cerebral foi previamente demonstrada em modelos animais (Hotchkiss and Gibb, 1980; Kita *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2006). No entanto, estudos recentes sugerem que os défices cognitivos consecutivos ao uso desta droga podem ser ainda devidos a alterações no sistema glutamatérgico (Simões *et al.*, 2007; Gross and Marshall, 2009). Alguns trabalhos salientam a existência de projecções glutamatérgicas no circuito de recompensa mesolímbico-dopaminérgico, o que possibilita uma base anatómica de interacção entre os dois sistemas na regulação dos efeitos de várias drogas de abuso (Gass and Olive, 2008). Recentemente, foi relatado que o aumento dos níveis extracelulares de dopamina (DA) estriatal pode causar uma libertação secundária de glutamato (Glu) na via corticostriatal, através do circuito estriato-tálamo-corticostriatal (Mark *et al.*, 2004 e 2007). Também foi sugerido que o aumento dos níveis de Glu poderia desempenhar um papel na neurotoxicidade induzida pela Meta (Nash e Yamamoto, 1992; Mark *et al.*, 2004, 2007; Caligiuri e Buitenhuis, 2005). A título de exemplo, o pré-tratamento com MK-801, um antagonista do receptor ionotrópico glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), atenua a neurotoxicidade estriatal (Bowyer *et al.*, 1991). Recentemente, o nosso grupo mostrou que uma dose única neurotóxica de Meta (30 mg.kg⁻¹) induziu alterações ao nível das subunidades

de receptores de glutamato do tipo NMDA e ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) no estriado, no córtex frontal e no hipocampo de rato, 24 horas após a administração do psicoestimulante (Simões *et al.*, 2007, 2008).

A regulação excitatória glutamatérgica está intimamente relacionada com o ciclo glutamato-glutamina entre os neurónios e os astrócitos. O glutamato libertado na fenda sináptica é captado pelos astrócitos (Danbolt, 2001), onde é convertido em glutamina (Gln) pela glutamina sintetase (GS), uma enzima presente nestas células gliais, mas ausente nos neurónios (Norenberg e Martinez-Hernandez, 1979; Suárez *et al.*, 2002). A glutamina é libertada pelos astrócitos no espaço extracelular e rapidamente captada pelos neurónios, sendo reconvertida em glutamato por acção da enzima glutaminase (PAG) (Kvamme *et al.*, 2000). Finalmente, o glutamato é armazenado em vesículas sinápticas, completando o ciclo (Fremeau *et al.*, 2004).

Métodos como a espectroscopia de prótons por ressonância magnética (MRS), realizada em humanos, podem ser úteis no estudo do ciclo glutamina/glutamato *in vivo*, fornecendo evidências directas de disfunção glutamatérgica em algumas entidades patológicas. A título de exemplo, foi relatado um aumento desta relação no córtex cingulado anterior e córtex parieto-occipital em doentes bipolares, mas não em esquizofrénicos, comparativamente a controlos (Öngur *et al.*, 2008). Foi ainda demonstrada por esta técnica o aumento da concentração de glutamato na área frontal, durante a adaptação cerebral ao abuso de metanfetamina (Sailasuta *et al.*, 2009; Abulseoud *et al.*, 2009). As variações da relação glutamina/glutamato permitem a análise do intercâmbio neuro-glial (Öngur *et al.*, 2008). O efeito da Meta nesta troca inter-celular não é conhecido. O objectivo deste trabalho foi avaliar a cinética do impacto de uma dose neurotóxica de Meta no ciclo glutamato-glutamina em roedores. Para tal, avaliaram-se os seguintes marcadores: i) teores totais de Glu e Gln e razão glutamina/glutamato; ii) expressão dos níveis da glutamina sintetase (GS) e iii) expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP).

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Animais, esquema de administração da Meta e isolamento de tecido cerebral

Foram usados murganhos adultos C57BL/6 (*Charles River Laboratories*, Barcelona, Espanha), com peso variando entre as 20-28 g, em condições ambientais controladas, e tendo sido fornecidos alimentos e água *ad libitum*. Os animais foram injectados por via intraperitoneal com uma dose única de Meta (30 mg.kg⁻¹) ou com solução salina (NaCl 0,9%), tendo ambos os grupos sido sacrificados às 4, 24 e 72 horas pós-tratamento. A escolha destes tempos deveu-se à demonstração prévia de que esta droga produz neurotoxicidade dopaminérgica estriatal nestes períodos (Cappon *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2002; 2006). Os cérebros foram removidos logo após o sacrifício. O processo experimental foi realizado em conformidade com as orientações da Comunidade Europeia (86/609/CEE) e da Direcção Geral de Veterinária. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e para reduzir o número de murganhos usados.

Procedeu-se ao isolamento do córtex frontal e do hipocampo, com dissecação em gelo e com base nas coordenadas descritas para o cérebro do murganho (Paxinos e Franklin, 2004). As amostras foram armazenadas a -69°C até serem usadas. As áreas do hemisfério direito foram usadas para a quantificação dos valores totais de Glu e de Gln por cromatografia líquida de alta pressão com detecção electroquímica (HPLC-ED) (Pereira *et al.*, 2008) e as áreas do hemisfério esquerdo para avaliação da expressão das proteínas GFAP e GS por *Western blot* (Simões *et al.*, 2007).

2.2 – Determinação dos teores tecidulares de glutamato e glutamina por HPLC-ED

As amostras cerebrais foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas em ácido perclórico 0,1 M. Os homogeneizados foram centrifugados e filtrados e as amostras foram mantidas a 4°C até à análise pelo método de HPLC. O Glu e Gln foram medidos após derivação com o-ftalaldeído (OPA)/β-mercaptoetanol, de acordo com Donzanti e Yamamoto (1988) e Smolders *et al.* (1995). 10 µL de cada amostra, previamente neutrali-

zada com NaOH 0,1 M (1:2), foram misturados com 2 µL da solução OPA/β-mercaptoetanol, durante 2 minutos, à temperatura ambiente, e 2 µL de solução de iodoacetamida foram ainda acrescentados. 10 µL desta mistura foram injectados 2 minutos depois no sistema cromatográfico. O método de HPLC isocrático com detecção electroquímica, utilizado para separar e determinar os níveis de Glu e Gln, consistiu na utilização de uma bomba 307 *Gilson*, um injector automático 231 *Gilson*, uma coluna ODS Spherisorb (250 x 4,6 mm; tamanho das partículas: 5 µm) e um detector amperométrico 141 *Gilson* com um eléctrodo de carbono vítreo fixado em 700 mV *versus* eléctrodo de referência Ag/AgCl. A fase móvel consistiu em acetato de sódio 0,1 M (pH = 5,9) contendo 10% de acetonitrilo e 40 mg/L de Na₂EDTA. A velocidade do fluxo foi 1,2 ml/min. Os dados foram analisados usando um *software Gilson* Unipoint 5,1. As concentrações de Glu e Gln foram determinadas a partir das curvas padrão geradas para cada substância de interesse e os valores expressos em pmol/10µl/mg tecido.

2.3 – Análise dos níveis das proteínas GFAP e GS por *western blot*

A análise dos níveis de GFAP e de GS foi feita por *western blot*. Os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise (50 mM Tris-HCl-pH 7,4-5% Triton X-100, 4°C), suplementado com uma mistura de inibidores de proteases (1 mM fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), 1 mM ditioneitol (DTT), 5 µg/ml quimostatina, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml antiparina, 25 µg/ml pepsatina A) (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal), e sujeitos a centrifugação. A concentração de proteína total foi determinada pelo método BCA (Smith *et al.*, 1985) e os homogeneizados foram armazenados a -69°C até posterior utilização. 2 µg e 100 µg de proteína para avaliação dos níveis de GFAP e GS, respectivamente, foram carregados e separados por electroforese num gel de 8% de SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Millipore, Madrid, Espanha). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado, em solução tampão fosfato, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Posteriormente,

as membranas foram incubadas com os anticorpos primários policlonais, preparados em soro *anti-rabbit* anti-GFAP (1:20000, 5% de leite) ou *anti-goat* anti-GS (1:500, 5% de leite) (Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.), durante a noite, a 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas com um anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina: *anti-rabbit* ou *anti-goat* (1:20000; Amersham, GE Healthcare Life Science, E.U.A.). Finalmente, as membranas foram visualizadas usando um reagente de detecção quimifluorescente (ECF-enhanced chemifluorescence) (Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe GmbH, Carnaxide, Portugal) e através do Storm 860 Gel e Blot Imaging System (Amersham Biosciences). Para confirmar igual carregamento no gel e transferência de proteína, as membranas foram incubadas durante a noite, a 4°C com anticorpo anti- β -actina (1:10000, Sigma-Aldrich) e depois com anticorpo secundário *anti-rabbit* (1:2000; Amersham Biosciences). As análises densitométricas foram realizadas utilizando o *software Image Quant*.

2.4 - Análise estatística

Os valores totais de glutamato e glutamina foram expressos em média \pm EPM (pmol.10 μ l⁻¹mg de tecido⁻¹). Os níveis de proteína foram expressos em percentagem do controlo. Calculou-se um valor médio dos valores de controlo a todos os tempos estudados, visto não ter havido diferenças entre eles. A análise estatística das diferenças entre as médias dos grupos submetido à Meta e do grupo controlo foi realizada utilizando uma análise de variância ANOVA, seguida de comparação *post-hoc* (Fisher's LSD ou Dunnett's). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $P < 0,05$.

3 - RESULTADOS

3.1 - Valores totais de Glu e Gln e razão glutamina/glutamato

Os níveis tecidulares de Glu no hipocampo e no córtex frontal dos animais controlo foram $114,6 \pm 20,4$ e $422,6 \pm 39,0$ pmol.10 μ l⁻¹mg⁻¹, respectivamente. Uma dose única de 30 mg/kg de Meta não alterou os níveis de Glu no hipocampo, nos 3 períodos estudados (4, 24 e 72 horas), no entanto, o conteúdo de glutamato no córtex,

às 24 horas, foi inferior ao das 4 horas ($339,4 \pm 40,7$ contra $489,7 \pm 44,9$ pmol.10 μ l⁻¹mg⁻¹) (Fig. 1).

Relativamente aos níveis tecidulares de Gln no hipocampo e córtex, os valores nos animais controlo foram $110,3 \pm 29,4$ e $338,8 \pm 32,0$ pmol.10 μ l⁻¹mg⁻¹, respectivamente. A Meta induziu apenas um incremento nos níveis de glutamina no hipocampo às 4 horas ($167,7 \pm 30,7$ pmol.10 μ l⁻¹mg⁻¹) relativamente ao controlo e às 24 horas ($110,4 \pm 29,4$ e $80 \pm 10,7$ pmol.10 μ l⁻¹mg⁻¹, respectivamente) (Fig. 1). A razão glutamina/glutamato revelou as seguintes alterações nas áreas estudadas: às 4 horas no hipocampo ($1,3 \pm 0,1$, diferente dos outros tempos) e às 24 horas no córtex frontal relativamente às 4 horas ($1,0 \pm 0,1$ e $0,6 \pm 0,08$, respectivamente) (Fig. 2).

FIGURA 1 - Valores tecidulares de glutamato (Glu) e glutamina (Gln) nas duas áreas estudadas após uma dose única de metanfetamina às 4, 24 e 72 horas. * $P < 0,05$ diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo; # $P < 0,05$ diferença estatisticamente significativa entre as 4 e as 24 horas. Os dados estão expressos como média \pm EPM (n = 4-7 animais).

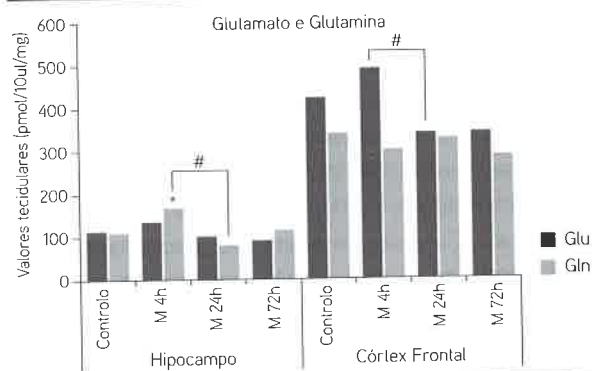
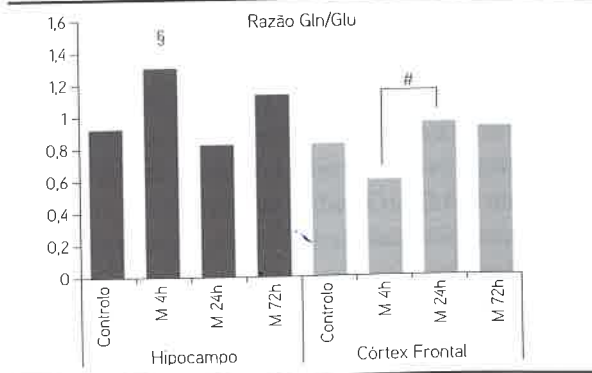


FIGURA 2 - Relação glutamina/glutamato após a administração de metanfetamina nas duas áreas estudadas às 4, 24 e 72 horas. § $P < 0,05$ estatisticamente diferente de todos os períodos avaliados, # $P < 0,05$ diferença significativa entre as 4 e as 24 horas. Os dados traduzem uma razão e são apresentados como média \pm EPM (n = 4-7 animais).



3.2 - Expressão das proteínas GS e GFAP

A administração de Meta induziu um aumento da expressão da GS às 72 horas no córtex frontal (311% do controlo correspondente). No entanto, não foi detectado um efeito significativo na expressão desta proteína no hipocampo, em nenhum dos períodos analisados (Fig. 3).

Este esquema de administração da droga aumentou a expressão de GFAP nas duas regiões estudadas. Verificou-se um aumento da expressão de GFAP às 24 horas no hipocampo (149% do controlo) e no córtex frontal, que permaneceu elevada às 72 horas na última área referida (158% e 162% do controlo, respectivamente) (Fig. 4).

FIGURA 3 - Níveis de GS nas duas áreas estudadas, às 4, 24 e 72 horas após a administração de metanfetamina. § P <0,05 significativamente diferente de todos os tempos analisados. Os dados estão expressos em percentagem do controlo e são apresentados como média ± EPM (n = 4-7 animais).

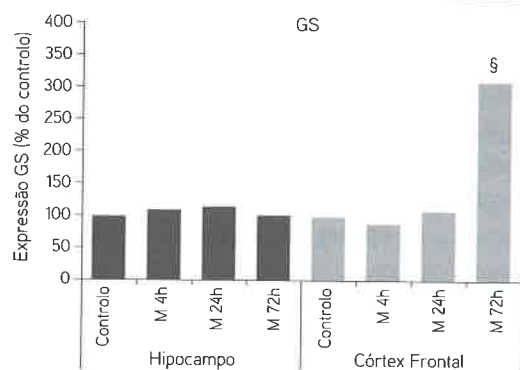
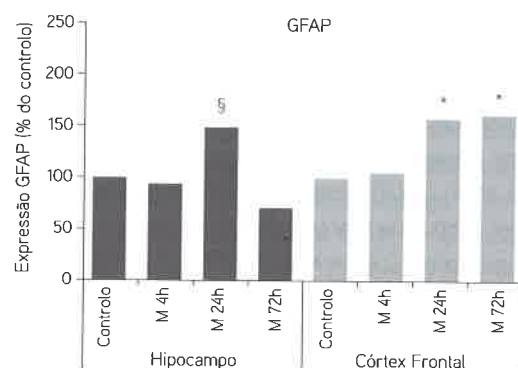


FIGURA 4 - Níveis de GFAP nas duas áreas estudadas, às 4, 24 e 72 horas após a administração de metanfetamina. § P <0,05 diferença estatisticamente significativa dos outros períodos analisados. * P <0,05 diferença significativa em relação ao controlo. Os dados estão expressos em percentagem do controlo e apresentados como média ± EPM (n = 4-7 animais).



4 - DISCUSSÃO

A homeostasia do glutamato no cérebro desempenha um papel importante nos processos fisiopatológicos (Lipton e Rosenberg, 1994; Price, 1999).

O presente estudo teve como objectivo caracterizar, em função do tempo, o impacto de uma dose elevada única de Meta (30 mg.kg⁻¹), sobre o ciclo glutamato-glutamina em duas regiões cerebrais. Esta dose aguda simula o equivalente a uma dose elevada no homem quando um "iniciante" administra a mesma dose alta que um consumidor habitual é capaz de tolerar, mas que será letal para o primeiro (Simões *et al.*, 2007).

A Meta é um estimulante poderoso que aumenta a concentração extracelular de glutamato no cérebro de mamíferos (ver introdução, Stephans e Yamamoto, 1994). O glutamato é um aminoácido ubíquo que é vital para todas as células, pelo seu papel na síntese proteica e no metabolismo intermediário. Muitos receptores de glutamato são activados por concentrações micromolar (1-10µM) (Sheldon e Robinson, 2007). Os valores extracelulares deste neurotransmissor devem ser mantidos em níveis relativamente baixos para garantir um sinal apropriado e para impedir a activação excessiva dos seus receptores, o que pode resultar em dano ou morte celular, um fenómeno conhecido por excitotoxicidade (Hansson e Ronnback 1995; Sheldon e Robinson, 2007). Este controlo minucioso é conseguido através dos astrócitos que removem uma grande percentagem (cerca de 80%) de glutamato libertado após a actividade neuronal, enquanto o restante se acumula em neurónios pós-sinápticos (Verkhatsky e Kirchoff, 2007).

O reservatório do glutamato parece ser mantido pelo ciclo glutamato-glutamina (Rodrigo e Felipo, 2007), através do diálogo entre os neurónios e astrócitos. Além de terem um papel importante no suporte metabólico (como no transporte direccionado glicose-lactato) (Benarroch, 2005), na regulação do pH e do fluxo sanguíneo e na modulação de resposta imunitária, estas células gliais também participam na comunicação bidireccional no SNC, comprovado pela expressão de receptores para neurotransmissores, peptídeos, hormonas e citocinas na sua superfície (Hansson e Ronnback, 1995, Araque *et al.*, 1999, Bezzi *et al.*, 2001, Keyser *et al.*, 2008). Alterações

na sua função parecem ter um papel crucial na patogénese de múltiplas entidades clínicas como na enxaqueca, epilepsia, doenças desmielinizantes, infecções, edema cerebral, doenças neurodegenerativas ou na esquizofrenia (Keyser *et al.*, 2008). Uma teoria recente sugere que na esquizofrenia poderá existir um decréscimo de glutamato no córtex pré-frontal, com hipofunção dos receptores NMDA, o que pode contribuir para os sintomas negativos. A mesma alteração, ao envolver projecções cortico-subcorticais, pode induzir uma subida dos níveis de DA no estriado, originando sintomas positivos (Halassa *et al.*, 2007). A fenciclidina (PCP), antagonista do receptor NMDA, induz sintomas negativos e positivos do tipo esquizofrénico além dos défices cognitivos (Jentsch and Roth, 1999). Outro exemplo de disfunção glutamatérgica parece estar presente na doença obsessivo-compulsiva, com aumento da libertação do glutamato. O riluzole, que bloqueia este mecanismo, tem sido usado no alívio dos sintomas (Coric *et al.*, 2005).

Relativamente ao nosso trabalho, foi medido o teor total de Glu e Gln após a administração de Meta. O conteúdo de glutamato nos homogeneizados cerebrais reflecte essencialmente um reservatório neuronal, uma vez que a glia não expressa grandes quantidades deste neurotransmissor (Waagepetersen *et al.*, 2003). Não foram encontradas alterações significativas nos níveis do glutamato no hipocampo nem no córtex frontal relativamente ao controlo. Tendo em conta que o glutamato cerebral é essencialmente intracelular, os níveis podem não reflectir a actividade sináptica glutamatérgica (Öngur *et al.*, 2008). Os níveis de glutamato podem ter sido restabelecidos pelo ciclo Glu-Gln, bem como pela via do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Assim, estas duas estratégias podem ter concorrido para garantir a homeostasia do glutamato. O doseamento da glutamina e o estudo da razão Gln/Glu podem reflectir melhor as modificações no diálogo cruzado entre neurónios e astrócitos. A glutamina é a molécula que relaciona o metabolismo da amónia com a produção dos neurotransmissores glutamato e GABA (Albrecht *et al.*, 2007), sendo sintetizada endogenamente pela glutamina sintetase (GS) nos astrócitos (ver introdução). Os níveis tecidulares da glutamina reflectem predominantemente o

conteúdo intracelular (Erecinska e Silver, 1990), do qual 80% se estima ser glial (Ottersen *et al.*, 1992). A concentração de glutamina nos astrócitos também reflecte a quantidade de glutamato captado (Bak *et al.*, 2006).

No nosso estudo, constatou-se um aumento dos níveis totais de glutamina no hipocampo às 4 horas, não tendo havido mudança significativa nos valores do córtex frontal em nenhum dos tempos estudados. Observou-se ainda um aumento da razão Gln/Glu no hipocampo às 4 horas. Dado que o glutamato, em condições normais, fornece a maioria (80%-90%) do reservatório de substrato para a síntese de glutamina (Kanamori *et al.* 2002), estes últimos resultados podem dever-se ao aumento da conversão do glutamato em glutamina pela glutamina sintetase (GS). No córtex frontal apenas se verificou um aumento da razão Gln/Glu às 24 horas relativamente às 4 horas.

Para uma melhor caracterização do comportamento astrocitário após administração de Meta, foram também analisadas duas proteínas astrocíticas, uma com um papel estrutural – GFAP, e uma funcional – GS. Estas proteínas têm sido estudadas noutras entidades patológicas como epilepsia (Dutuit *et al.*, 2000), isquémia *in vivo* (Petito *et al.*, 1992), e estados de hiperamoniémia (Yamamoto *et al.*, 1989) em modelos animais e em doentes com Alzheimer (Robinson, 2000).

A GS tem uma importância fulcral na desintoxicação da amónia cerebral e na regulação metabólica do glutamato. A expressão e a actividade desta proteína estão correlacionadas com a concentração de glutamato extracelular (Derouiche e Frotscher, 1991; Fonseca *et al.*, 2005). A título de exemplo, culturas primitivas de astrócitos respondem ao glutamato com aumento da actividade da GS. Além disso, a distribuição dos receptores e transportadores gliais de glutamato tem correspondência com a localização da GS, sugerindo uma ligação funcional entre a captação de glutamato e a sua degradação (Suarez *et al.*, 2002). Esta enzima desempenha, assim, um papel central na manutenção do reservatório sináptico de glutamato (Laake *et al.*, 1995).

A administração de Meta induziu um aumento da expressão da GS no córtex frontal às 72 horas. No entanto este resultado não tem tradução em alterações

da razão Gln/Glu relativamente ao controlo. Para além do glutamato, factores tróficos neuronais bem como o contacto directo entre astrócitos e a matriz celular dos neurónios podem condicionar sobreexpressão de GS (Albrecht *et al.*, 2007). Apesar de não ter sido observada qualquer mudança na expressão da GS no hipocampo, o aumento da Gln sugere que houve aumento da actividade da enzima após administração de Meta.

A gliose reactiva ou activação da astroglia ocorre em resposta aos danos cerebrais induzidos por muitas patologias do SNC, como já foi referido, e cursa habitualmente com hipertrofia dos processos astrocitários e com aumento da expressão dos filamentos intermediários proteicos, em especial, do GFAP (O'Callaghan & Miller, 1993; Pennypacker *et al.*, 2000; Gonçalves *et al.*, 2010), o que não traduz necessariamente uma proliferação glial (Sofroniew e Vinters, 2010). Esta proteína é talvez o marcador de reactividade astrocitária mais sensível e fiável (Raivich *et al.*, 1999; Pekny e Nilsson, 2005). Os astrócitos são importantes não apenas para resgatar neurónios na área lesada, mas também para eliminar o excesso de glutamato a nível sináptico. A protecção conferida pela astroglia contra a excitotoxicidade do glutamato tornou-se evidente em experiências *in vitro*: a remoção de astrócitos de culturas neuronais induziu um aumento significativo da morte neuronal após administração de glutamato (Danbolt, 2001). No entanto, além de desempenhar um papel neuroprotector, os astrócitos activados também podem ter um papel neurotóxico, dependendo da natureza e extensão dos danos, bem como do período temporal de permanência da manutenção do estímulo agressor (Miyatake *et al.*, 2005, Benarroch, 2005, Giaume *et al.*, 2007).

Neste estudo, verificou-se que a administração aguda de Meta induziu um aumento significativo da expressão de GFAP nas áreas estudadas, confirmando que a dose utilizada foi neurotóxica. Os nossos resultados são coerentes com a activação da astroglia no hipocampo e no córtex frontal de roedores, já observada noutros trabalhos (Pubill *et al.*, 2003, Simões *et al.*, 2007, Gonçalves *et al.*, 2010).

Em resumo, o presente estudo mostrou que a injeção de uma dose elevada de metanfetamina (30 mg.kg⁻¹) induziu um aumento da expressão de GFAP nas duas

regiões estudadas e um aumento da proporção Gln/Glu no hipocampo. O equilíbrio do ciclo glutamato-glutamina está, pois, alterado, nesta área. Analisando os resultados por região, detectaram-se alterações precoces no hipocampo, com aumento da proporção Gln/Glu devido à elevação dos níveis de glutamina tecidual, seguida de aumento da expressão de GFAP às 24 horas. O córtex frontal revelou aumento da expressão do GFAP no mesmo período temporal, mantida às 72 horas, e da GS no último tempo estudado. Este aumento pode ser secundário à reactividade dos astrócitos.

5 - CONCLUSÕES

A patologia cerebral traduz, em grande medida, uma patologia da glia, que, quando disfuncional, determina o grau de morte neuronal, os défices neurológicos e o prognóstico. As células da glia são fundamentais na homeostasia do glutamato (Giaume *et al.*, 2007). A participação do glutamato no desenvolvimento neuronal, plasticidade sináptica, aprendizagem e memória e em estados patológicos como epilepsia, isquémia neural, dependência de drogas, dor neuropática, ansiedade ou depressão tem limitado o uso de substâncias com efeito selectivo nas sinapses glutamatérgicas.

O aumento da razão Gln/Glu no hipocampo parece reflectir uma hiperactividade glutamatérgica e/ou uma articulação defeituosa neuro-glial após o uso da Meta. Consistentemente, a proteína astrocitária envolvida na integridade do citoesqueleto (GFAP) foi expressa de modo anormal, sugerindo que os astrócitos participam na disfunção glutamatérgica desencadeada pela Meta. Anomalias na neurotransmissão glutamatérgica relacionadas com as células gliais podem representar novos alvos terapêuticos em consumidores de metanfetamina.

CONTACTO:

FREDERICO PEREIRA

Frederico C. Pereira, PhD

Professor Auxiliar

Farmacologia e Terapêutica Experimental/Instituto Biomédico de Investigação em Luz e Imagem (IBILI), Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

fredcp@ci.uc.pt

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abulseoud, O.; Sailasuta, N.; Hernandez, M.; Ross, B. D. (2009). Impact of depression on cerebral and cognitive function in abstinent methamphetamine users. *Proc Int Soc Magn Reson Med* 17: 210.
- Albrecht, J.; Sonnewald, U.; Waagepetersen, H. S.; Schousboe, A. (2007). Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. *Frontiers in Bioscience* 12: 332-343.
- Anglin, M. D.; Burke, C.; Perrochet, B.; Stamper, E.; Dawud-Noursi, S. (2000). History of the methamphetamine problem. *J Psychoactive Drugs* 32: 137-141.
- Araque, A.; Parpura, V.; Sanzgiri, R. P.; Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22: 208-215.
- Bak, L.; Schousboe, A.; Waagepetersen, H. (2006). The glutamate/GABA - glutamine cycle: aspects of transport; neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry* 98: 641-653.
- Benarroch, E.; (2005). Neuron-astrocyte Interactions: Partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clinic Proc.* 80 (10): 1326-1338.
- Bezzi, P.; Volterra, A. (2001). A neuron-glia signalling network in the active brain. *Current Opinion in Neurobiology* 11: 387-394.
- Bowyer, J. F.; Scallet, A. C.; Holson, R. R.; Lipe, G. W.; Slikker, W. Jr.; Ali, S. F. (1991). Interactions of MK-801 with glutamate -, glutamine - and methamphetamine-evoked release of [3H] dopamine from striatal slices. *J Pharmacol Exp Ther.* 257 (1): 262-70.
- Cadet, J. L.; Jayanthi, S.; Deng, X. (2003). Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis. *FASEB J* 17: 1775-1788.
- Caligiuri, M. P.; Buitenhuis, C. (2005). Do preclinical findings of Methamphetamine-induced motor abnormalities translate to an observable clinical phenotype? *Neuropsychopharmacology* 30: 2125-2134.
- Cappon, G. D.; Pu C.; Vorhees, C. V. (2000). Time-course of methamphetamine-induced neurotoxicity in rat caudate-putamen after a single-dose treatment. *Brain Res*, 863: 106-111.
- Coric, V.; Taskiran, S.; Pittenger, C.; Wasyluk, S.; Mathalon, D. H.; Valentine, G.; Saks, J.; Wu, Y.T.; Gueorguieva, R.; Sanacora, G.; Malison, R. T.; Krystal, J. H. (2005). Risperidone augmentation in treatment-resistant obsessive-compulsive disorder: an open-label trial. *Biol Psychiatry*, 58 (5): 424-8.
- Danbolt, N. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 65: 1-105.
- Derouiche, A.; Frotscher, M. (1991). Astroglial processes around identified glutamatergic synapses contain glutamine synthetase: evidence for transmitter degradation. *Brain Res*, 552: 346-350.
- Donzanti, B. A.; Yamamoto, B. K. (1988). An improved and rapid HPLC-EC method for the isocratic separation of amino acid neurotransmitters from brain tissue and microdialysis perfusates. *Life Sci* 43: 913-922.
- Dutuit, M.; Didier-Bazés, M.; Vergnes, M.; Mulin, M.; Conjard, A.; Akaoka, H.; Belin, M.; Touret, M. (2000). Specific alteration in the expression of Glial Fibrillary Acidic Protein, Glutamate Dehydrogenase, and glutamine synthetase in rats with genetic absence epilepsy. *Glia* 32: 15-24.
- Erecinska, M.; Silver, I. (1990). Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 35: 245-296.
- Fonseca, L. L.; Monteiro, M. A.; Alves, P. M.; Carrondo, M. J.; Santos, H. (2005). Cultures of rat astrocytes challenged with a steady supply of glutamate: new model to study flux distribution in the glutamate-glutamine cycle. *Glia* 51: 286-296.
- Freneau, R. T. Jr.; Voglmaier, S.; Seal, R. P.; Edwards, R. H. (2004). VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci*, 27 (2): 98-103.
- Gass, J. T.; Olive, M. F. (2008). Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol* 75 (1): 218-65.
- Giaume, C.; Kirchhoff, F.; Matule, C.; Reichenbach, A.; Verkhratsky, A. (2007). Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell death and Differentiation*, 14: 1324-1335.
- Gonçalves, J.; Baptista, S.; Martins, T.; Milhazes, N.; Borges F.; Ribeiro, C. F.; Malva, J. O.; Silva, A. P. (2010). Methamphetamine-induced neuronal inflammation and dysfunction in the mice hippocampus: preventive effect of indomethacin. *Eur J Neurosci*, 31: 315-326.
- Gross, N.; Marshall, J. (2009). Striatal dopamine and glutamate receptors modulate methamphetamine-induced cortical Fos expression. *Neuroscience* 21: 1114-1125.
- Halassa, M.; Fellin, T.; Haydon, P. (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 13 (2): 54-63.
- Hansson, E.; Ronnback, L. (1995). Astrocytes in glutamate neurotransmission. *FASEB Journal* 9: 343-350.
- Hotchkiss, A. J.; Gibb, J. W. (1980). Long term effects of multiple doses of methamphetamine on tryptophan hydroxylase and tyrosine hydroxylase activity in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 214: 257-262.
- Jentsch, J. D.; Roth, R. H. (1999). The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 20: 201-225.
- Kanamori, K.; Ross, B.; Kondrat, R. (2002). Glial uptake of neurotransmitter glutamate from the extracellular fluid studied in vivo by microdialysis and ¹³C NMR. *J Neurochem*, 83: 682-695.

- Keyser, B.; Glatzel, M.; Stellmer, F.; Kortmann, B.; Lukacs, Z.; Kölker, S.; Sauer, S. W.; Muschol, N.; Herdering, W.; Thiem, J.; Goodman, S. I.; Koeller, D. M.; Ullrich, K.; Braulke, T.; Mühlhausen, C. (2008). Transport and distribution of 3-hydroxyglutaric acid before and during induced encephalopathic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1. *Biochim Biophys Acta*, 1782 (6): 385-90.
- Kita, T.; Wagner, G. C.; Nakashima, T. (2003). Current research on methamphetamine-induced neurotoxicity: animal models of monoamine disruption. *J Pharmacol Sci*, 92: 178-195.
- Kvamme, E.; Roberg, B.; Torgner, I. A. (2000). Phosphate-activated glutaminase and mitochondrial glutamine transport in the brain. *Neurochem Res*, 25: 1407-1419.
- Laake, J. H.; Slyngstad, T. A.; Haug, F. M.; Ottersen, O. P. (1995). Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures. *J Neurochem*, 65: 871-881.
- Lipton, S. A.; Rosenberg, P. A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*, 330: 613-622.
- Mark, K. A.; Soghomonian, J. J.; Yamamoto, B. K. (2004). High dose methamphetamine acutely activates the striatonigral pathway to increase striatal glutamate and mediate long-term dopamine toxicity. *J Neurosci*, 24: 11449-11456.
- Mark, K. A.; Quinton, M. S.; Russek, S. J.; Yamamoto, B. K. (2007). Dynamic Changes in vesicular glutamate transporter 1 function and expression related to methamphetamine-induced glutamate release. *The Journal of Neuroscience*, 27 (25): 6823-6831.
- Miyatake, M.; Narita, M.; Shibasaki, M.; Nakamura, A.; Suzuki, T. (2005). Glutamatergic neurotransmission and protein kinase C play a role in neuron-glia communication during the development of methamphetamine - induced psychological dependence. *European Journal of Neuroscience*, 22: 1476-1488.
- Nash, J. F.; Yamamoto, B. K. (1992). Methamphetamine neurotoxicity and striatal glutamate release: comparison to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine. *Brain Res*, 581: 237-243.
- Norenberg, M.; Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res*, 161: 303-310.
- O'Callaghan, J. P.; Miller, D. B. (1993). Quantification of reactive gliosis as an approach to neurotoxicity assessment. *NIDA Res Monogr*, 136: 188-212.
- Öngür, D.; Jensen, J. E.; Prescott, A. P.; Stork, C.; Lundy, M.; Cohen, B. M.; Renshaw, P. F. (2008). Abnormal glutamatergic neurotransmission and neuronal-glia interaction in acute mania. *Biol Psychiatry*, 64: 718-726.
- Ottersen, O.; Zhang, N.; Walberg (1992). Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience* 46: 519-534.
- Paxinos, G.; Franklin, K. B. J. (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 2nd edition, Academic Press Limited, London, UK.
- Pekny, M.; Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50: 427-434.
- Pennypacker, K. R.; Kassed, C. A.; Eidizadeh, S.; O'Callaghan, J. P. (2000). Brain injury: prolonged induction of transcription factors. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 60(4): 515-30.
- Pereira, F. C.; Imam, S. Z.; Gough, B.; Newport, G. D.; Ribeiro, C. F.; Slikker, W.; Macedo, T. R.; Ali, S. F. (2002). Acute changes in dopamine release and turnover in rat caudate nucleus following a single dose of methamphetamine. *J Neural Transm*, 109: 1151-1158.
- Pereira, F. C.; Lourenço, E. S.; Borges, F.; Morgadinho, T.; Ribeiro, C. F.; Macedo, T. R.; Ali, S. F. (2006). Single or multiple injections of methamphetamine increased dopamine turnover but did not decrease tyrosine hydroxylase levels or cleave caspase-3 in caudate-putamen. *Synapse*, 60 (3): 185-93.
- Pereira, F. C.; Rolo M. R.; Marques E.; Mendes, V. M.; Ribeiro C. F.; Ali, S. F.; Morgadinho T.; Macedo T. R. (2008). Acute increase of the glutamate-glutamine cycling in discrete brain areas after administration of a single dose of amphetamine. *Ann N Y Acad Sci*. 1139: 212-21.
- Petito, C.; Chung, M.; Verkhovsky, L.; Cooper, A. (1992). Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. *Brain Res*, 569: 275-280.
- Price, D. L. (1999). New order from neurological disorders. *Nature* 399: A3-A5.
- Pubill, D.; Canudas, AM.; Pallas, M.; Camins, A.; Camarasa, J.; Escubedo, E. (2003). Different glial response to methamphetamine - and methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 367: 490-499.
- Raivich, G.; Bohatschek, M.; Kloss, C.; Werner, A.; Jones, L.; Kreutzberg, G. (1999). Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. Rev*, 30: 77-105.
- Robinson, S. (2000). Neuronal expression of glutamine synthetase in Alzheimer's disease indicates a profound impairment of metabolic interactions with astrocytes. *Neurochem. Int*, 36, 471-482.
- Rodrigo, R.; Felipe, V. (2007). Control of brain glutamine synthesis by NMDA receptors *Front Biosci*. 12: 883-9 Review.

Sailasuta, N.; Abulseoud, O.; Harris, K & Ross, B. (2009). Glial dysfunction in abstinent methamphetamine abusers. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* ([Epub ahead of print]), 1-11.

Sheldon, A. L.; Robinson, M. B. (2007). The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochemistry International*, 51: 333-355.

Simões, P.; Silva, A.; Pereira, F.; Marques, E.; Grade, S.; Milhazes, N.; Borges, F.; Ribeiro, C. & Macedo, T. (2007). Methamphetamine induces alteration on hippocampal NMDA and AMPA receptor subunit levels and impairs spatial working memory. *Neuroscience* 150: 433-441.

Simões, P. F.; Silva, A. P.; Pereira, F. C.; Marques, E.; Milhazes, N.; Borges, F.; Ribeiro, C. F.; Macedo, T. R (2008). Methamphetamine changes NMDA and AMPA glutamate receptor subunit levels in the rat striatum and frontal cortex. *Ann N Y Acad Sci*, 1139: 232-41.

Smith, A. J.; Cawston, T. E.; Hazleman, B. L. (1985). A rapid and reproducible method for the analysis of immune complexes using affinity chromatography and *Western blotting*. *J. Immunol. Methods* 84: 125-134.

Smolders, I.; Sarre, S.; Michotte, Y.; Ebinger, G. (1995). The analysis of excitatory; inhibitory and other amino acids in rat brain microdialysates using microbore liquid chromatography. *J Neurosci Methods*, 57: 47-53.

Sofroniew, M.; Vinters, H. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119: 7-35.

Stephans, S. E.; Yamamoto, B. K. (1994). Methamphetamine-induced neurotoxicity: roles for glutamate and dopamine efflux. *Synapse*, 17: 203-209.

Suárez, I.; Bodega, G.; Fernández, B. (2002). Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochemistry International*, 41: 123-142.

Verkhatsky, A.; Kirchhoff, F. (2007). Glutamate-mediated neuronal-glial transmission. *J Anat*, 210: 651-660.

Waagepetersen, H. S.; Sonnewald, U.; Schousboe, A. (2003). Compartmentation of glutamine; glutamate; and GABA metabolism in neurons and astrocytes: functional implications. *Neuroscientist* 9 (5): 398-403.

Yamamoto, T.; Iwasaki, Y.; Sato, Y.; Yamamoto, H.; Konno, H. (1989). Astrocytic pathology of methionine sulfoximine-induced encephalopathy. *Acta Neuropathol*, 77: 357-368.