

## **EFEITO INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE 4 ROFLUMILAST NA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL E TRANSITÓRIA EM CAMUNDONGOS: ASPECTOS COGNITIVOS E EMOCIONAIS.**

Emanuella R. Vilhena da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Juliana Keiko C. Kunieda, Humberto Milani (Co-Orientador), Rúbia M. Monteiro Weffort de Oliveira (Orientador), e-mail: ra89764@uem.br, rubiaweffort@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Farmácia e Farmacologia/Maringá, PR.

**FARMACOLOGIA e NEUROPSICOFARMACOLOGIA 21003009**

**Palavras-chave:** Isquemia cerebral global e transitória, roflumilast, camundongos, neuroproteção.

**Resumo:** Prejuízos cognitivos e emocionais são comumente observados em pacientes vítimas da isquemia cerebral global e transitória (ICGT), o que tem sido associado à perda neuronal no hipocampo. Camundongos submetidos ao ICGT também apresentam déficits cognitivos, aumento dos níveis de ansiedade e neurodegeneração hipocampal. Roflumilast, um inibidor da fosfodiesterase 4 (I-PDE4) de segunda geração, aprovado pelo FDA para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica, promoveu efeitos pró-cognitivos em estudos realizados em roedores. No entanto, não há relatos de seu uso na doença cerebral isquêmica. Portanto o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento crônico com roflumilast, nos aspectos emocionais e cognitivos em camundongos submetidos à ICGT. Camundongos BalbC foram submetidos à oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC) e subsequentemente foram analisados em uma bateria de testes comportamentais incluindo o Teste do Campo Aberto (TCA), Labirinto em Zero Elevado (LZE), Labirinto em Y (TLY) e Teste de Suspensão pela Cauda (TSC). Roflumilast promoveu recuperação funcional nos animais isquêmicos. A avaliação histológica do tecido cerebral está sendo conduzida.

### **Introdução**

-Processos isquêmicos cerebrais afetam a população mundial, sendo responsáveis por incapacitação e morte de muitos indivíduos (YANG et al., 1997; SOARES et al., 2013).

- A inibição da fosfodiesterase 4 (PDE4) parece ser uma boa alternativa para o tratamento da doença isquêmica cerebral (SOARES et al., 2016).

- Roflumilast, um I-PDE4, já foi aprovado para uso na doença pulmonar obstrutiva crônica e apresentou resultados positivos em modelos animais de doenças neurodegenerativas (YUAN et al., 2016).

- Não existem estudos mostrando os efeitos do roflumilast na ICGT em roedores.

## Materiais e métodos

### *Cirurgia.*

A ICGT foi realizada em camundongos machos da espécie Balb/c, pesando de 30g a 35g, através da OBACC, durante doze minutos. Os animais foram divididos em 3 grupos: **Sham**, os quais não foram submetidos a isquemia cerebral e receberam somente o veículo (0.07% DMSO em 0.5% carboximetilcelulose), **Isquêmico Veículo (Isq V)**, os quais passaram pelo processo da cirurgia (OBACC) e receberam veículo. Isquêmico tratado, os quais também foram submetidos a cirurgia (OBACC) e receberam roflumilast (10mg/kg) (**Isq Rof**), 60 min após cirurgia, e durante os 21 dias do experimento.

### *Testes comportamentais.*

No sétimo dia após a OBACC, foi realizada uma bateria de testes comportamentais iniciada com o teste TCA no 7º dia de tratamento, LZE no 8º dia, TLY no 14º dia, e por fim, TSC no 21º dia. Após o último teste comportamental, todos os animais foram submetidos a perfusão transcardíaca e tiveram seus cérebros removidos para análise histológica.

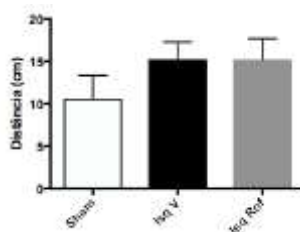
### *Análises comportamentais e estatísticas.*

Todas as análises comportamentais foram realizadas com o software de leitura ANY-maze behavioural tracking Software. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad PRISM 6, através da One-Way ANOVA, seguida de teste de TUKEY.

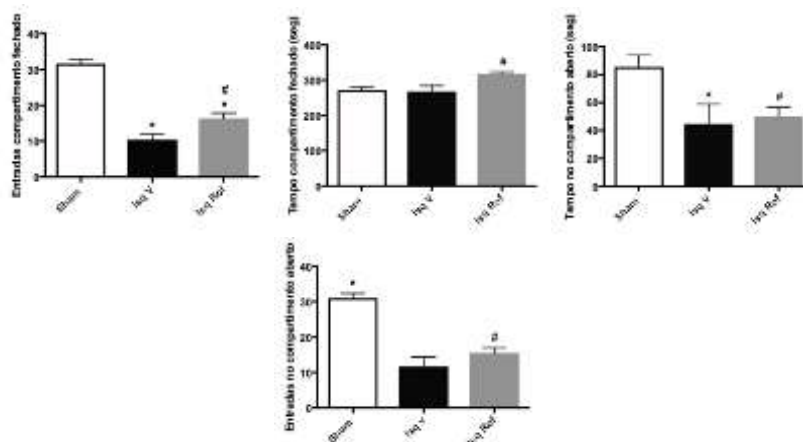
## Resultados e Discussão

A Figura 1 mostra os resultados obtidos no TCA. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais quanto a distância percorrida ( $F_{2,26}=1,22$ ;  $p=0,09$ ). Estes resultados indicam que a ICGT não afetou a atividade locomotora dos animais. No entanto, quando os animais foram testados no LZE ao 8º dia após a ICGT, observou-se uma queda na exploração total dos animais. A ANOVA mostrou diferença significativa quanto ao número de entradas no compartimento aberto ( $F_{2,26}=30,1$ ;  $p<0,001$ ), bem como no número de entradas no compartimento fechado ( $F_{2,25}=55,11$ ;  $p<0,001$ ). Animais isquêmicos foram diferentes dos animais sham ( $p<0,05$ ). Da mesma forma, observou-se diferença significativa no tempo de permanência dos animais no compartimento aberto ( $F_{2,26}= 5,025$ ;  $p= 0,014$ ;) e no compartimento fechado ( $F_{2,26}=6,074$ ;  $p=0,0071$ ). Diferenças significativas foram observadas quando comparados os grupos Sham e Isq V, Sham e Isq Rof, Isq V e Isq Rof ( $p,0.05$ ). Ou seja, há comportamentos distintos entre os grupos e também se vê um efeito da droga nos grupos

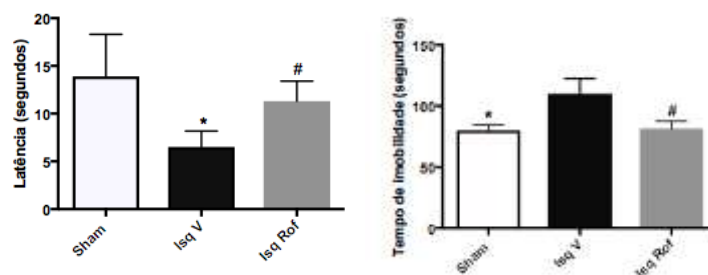
tratados. As razões para as alterações de locomoção no LZE aos 8 dias após ICGT são desconhecidas. Conforme a Figura 3, ANOVA mostrou diferença significativa para a imobilidade dos animais no TSC ( $F_{2,24}=3,92$ ;  $p=0,038$ ), sendo o os grupos Isq V diferente dos outros grupos experimentais ( $p<0.05$ ). Porém, não houve diferença significativa em relação a latência quando comparados os grupos experimentais ( $F_{2,25}=1,33$ ;  $p=0,28$ ), sendo necessário testes estatísticos mais sensíveis para inferir uma diferença significativa em tal parâmetro. Tal comportamento verificado com a análise de imobilidade dos animais experimentados, pode ser característico de um possível efeito antidepressivo do roflumilast em animais isquêmicos.



**Figura 1:** Efeito do tratamento com roflumilast (10 mg/kg) em camundongos submetidos a ICGT e avaliados no teste de Campo Aberto. As colunas representam as médias e as barras verticais os EPM (n=9-12 animais).



**Figura 2:** Efeito do tratamento com roflumilast (10 mg/kg) em camundongos submetidos a ICGT e avaliados no teste de Labirinto em Zero Elevado. \* $p<0.05$  em relação ao grupo Sham e # $p<0.05$  em relação ao grupo Isq V. As colunas representam as médias e as barras verticais os EPM (n=9-12 animais).



**Figura 3:** Efeito do tratamento com roflumilast (10 mg/kg) em camundongos submetidos a ICGT e avaliados no teste de Suspensão pela Cauda. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo Sham e # $p < 0.05$  em relação ao grupo Isq V. As colunas representam as médias e as barras verticais os EPM ( $n=9-12$  animais).

### Conclusões

O tratamento com roflumilast não alterou a atividade locomotora dos animais isquêmicos no CA após 7 dias da ICGT. No entanto, uma diminuição da exploração nos animais isquêmicos detectada no 8º dia após a ICGT, conforme os resultados no LZE, sendo em partes revertida pela administração da droga. O tratamento com roflumilast atenuou a expressão de sintomas do tipo-depressivos induzidos pela ICGT em camundongos avaliados no TSC. Em conjunto, os resultados apontam para um efeito positivo do roflumilast sobre a recuperação funcional após ICGT.

### Agradecimentos

Ao CNPq, CAPES, Fundação Araucária e UEM.

### Referências

- HEBENSTREIT, G.F. et al. **Rolipram in major depressive disorder: results of a double-blind comparative study with imipramine.** Pharmacopsychiatry. 1989; 22(4):156-60.
- SOARES, L.M. et al. **Rolipram improves cognition, reduces anxiety- and despair-like behaviors and impacts hippocampal neuroplasticity after transient global cerebral ischemia.** Neuroscience. 2016; 326:69-83.
- YANG, G. et al. **C57BL/6 strain is most susceptible to cerebral ischemia following bilateral common carotid occlusion among seven mouse strains: selective neuronal death in the murine transient forebrain ischemia.** Brain Research. 1997; 28;752(1-2):209-18.
- YUAN, L. et al. **Potential treatment benefits and safety of roflumilast in COPD: a systematic review and meta-analysis.** International Journal of Chronic Obstructive Pulmonar Disease. 2016; 11:1477-83.