

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

Juliana Keiko Campolina Kunieda (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Emanuella R. Vilhena da Silva, Humberto Milani, Rúbia Maria Monteiro Weffort (Orientador), e-mail: ra90011@uem.br.  
Universidade Estadual de Maringá/Centro de da Saúde/Maringá, PR.

### **FARMACOLOGIA e NEUROPSICOFARMACOLOGIA 21003009**

**Palavras-chave:** oclusão bilateral das artérias carótidas comuns, roflumilast, neuroproteção.

**Resumo:** Estudos indicam que a perda neuronal no hipocampo observada em pacientes acometidos pela isquemia cerebral global e transitória (ICGT) está associada ao aparecimento de prejuízos cognitivos e emocionais. Em animais de laboratório sujeitos a ICGT também se observa estes mesmos déficits, os quais tem sido relacionado a neurodegeneração de estruturas cerebrais como o, hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala. Até o momento não existe tratamento efetivo aprovado para impedir os efeitos deletérios da ICGT. Os inibidores das fosfodiesterases (I-PDE), dadas suas propriedades pleiotrópicas, podem representar uma nova estratégia terapêutica para o tratamento das sequelas da isquemia cerebral. Roflumilast, um I-PDE4 de segunda geração, apresenta um perfil de efeitos adversos mais favoráveis, com poucos efeitos eméticos. Roflumilast é aprovado pelo FDA para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica. Roflumilast apresentou efeitos pró-cognitivos em animais de laboratório e pacientes. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar se o tratamento com roflumilast poderia resultar em recuperação funcional e neuroproteção tecidual em animais com isquemia cerebral. Para isto, camundongos BalbC foram submetidos à oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC) e subsequentemente avaliou-se o desempenho cognitivo nestes animais usando o teste do labirinto em Y. Estão sendo investigados os efeitos do roflumilast sobre a neurodegeneração hipocampal decorrente da OBACC, usando a coloração de Nissl.

### **Introdução**

Prejuízos cognitivos e emocionais são comumente observados em pacientes vítimas da isquemia cerebral global e transitória. Camundongos submetidos ao ICGT também apresentam déficits cognitivos, aumento dos níveis de ansiedade e neurodegeneração hipocampal (YANG et al., 1997; SOARES et al., 2013). Rolipram, um inibidor da fosfodiesterase tipo 4 (I-PDE4), promoveu efeito pró-cognitivo, ansiolítico e antidepressivo em camundongos submetidos a ICGT (SOARES et al., 2016). Contudo, o uso clínico deste

composto não foi possível, devido a limitações como janela terapêutica estreita e severos efeitos eméticos (HEBENSTREIT et al., 1989). O I-PDE4 de segunda geração, roflumilast, apresenta baixa toxicidade e poucos efeitos eméticos (YUAN et al., 2016). No entanto, não há relatos de seu uso na doença cerebral isquêmica. Dessa forma, esta pesquisa investigou o tratamento repetido com roflumilast sobre as sequelas funcionais e neurohistológicas da TGCI. Camundongos BalbC foram submetidos à OBACC, tratados com veículo ou roflumilast e posteriormente, avaliados em uma bateria de testes comportamentais que incluiu Campo Aberto e o Y Maze. Está em andamento, a avaliação do efeito do roflumilast sobre a neurodegeneração hipocampal por meio da coloração de Nissl.

## **Materiais e métodos**

### *Animais*

Utilizou-se camundongos machos adultos BalbC, pesando de 20 a 30 g. Os animais permaneceram em condições padrões de alojamento, com ciclo de luz claro/escuro (12 h), temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e suprimento de água e ração à vontade durante o desenvolvimento de todo o experimento. Os procedimentos experimentais seguiram os “Princípios Básicos para a Utilização Animal”, conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, sob o CEUA nº 5529100517.

### *Isquemia cerebral global e transitória (ICGT)*

Os animais foram anestesiados por fluxo contínuo de inalação de halotano e gás oxigênio através de uma máscara facial. Em seguida, os ramos comuns das artérias carótidas foram cuidadosamente expostos e isolados dos tecidos adjacentes por meio de um fio de seda, cujas extremidades ficaram exteriorizadas. Posteriormente, as artérias foram ocluídas temporariamente (10 min) com o auxílio de cliques de aneurismas. Fechou-se a incisão com linha de algodão e os animais serão mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ). Animais que sofreram convulsão foram eliminados do experimento. Os animais controle, denominados sham, passaram pelos mesmos procedimentos anestésicos utilizados, contudo, não tiveram nenhuma das artérias ocluídas.

### *Tratamento*

Administrou-se roflumilast (10 mg/kg) ou veículo (0.07% DMSO em 0.5% carboximetilcelulose) por via intraperitoneal (i.p.), durante 21 dias. O tratamento iniciou 1 hora após a OBACC. Todas as soluções foram preparadas e injetadas em um volume de 10 ml/kg. As doses de roflumilast utilizadas foram baseadas em estudos anteriores, os quais descreveram efeitos pró-cognitivos e antidepressivos. Distribuíram-se os animais randomicamente de acordo com o tratamento recebido e, partir de então, três grupos experimentais foram criados: animais sham que receberão

veículo (n=10), animais OBACC que receberão veículo (n=9), animais OBACC que receberão roflumilast 0.01 mg/kg (n=12).

### *Delineamento experimental*

Uma bateria de testes comportamentais foi realizada durante os 21 dias de tratamento. Os testes comportamentais no campo aberto (CA) e Y maze (LY) foram realizados 7 e 14 dias após a OBACC, respectivamente. Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados e seus cérebros foram processados para avaliação de Nissl.

### *Coloração de Nissl*

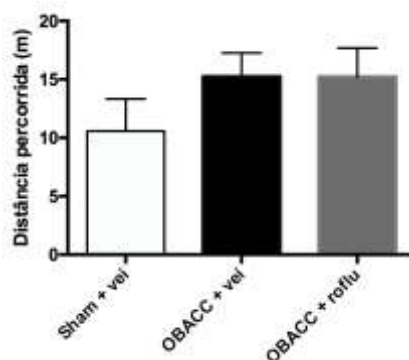
Em andamento.

### *Análise Comportamental e Estatística*

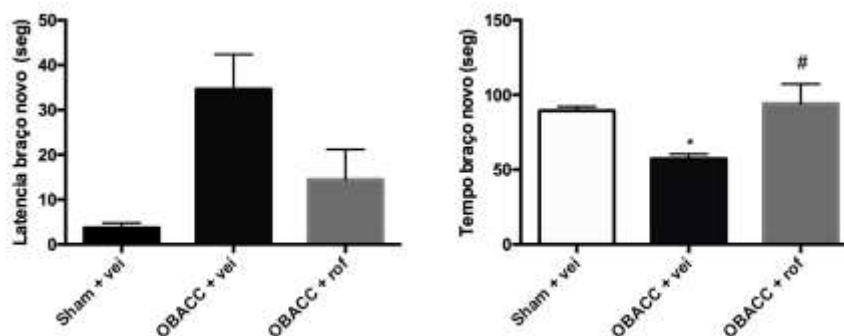
Utilizou-se software ANY-maze Behavioural Tracking Software o para a leitura dos testes comportamentais realizados. Para análise estatística, o programa utilizado foi o Software GraphPad PRISM 6.

## **Resultados e Discussão**

Como observado na figura 1, não houve diferença significativa na distância percorrida pelos animais avaliados no CA ( $F_{2,26}=0.48$ ,  $p>0.05$ ), indicando que nem a cirurgia para a indução da ICGT ou o tratamento com roflumilast alteraram a atividade locomotora dos mesmos. No LY, no entanto, animais isquêmicos apresentaram diferenças quando comparados com os animais sham operados. Animais isquêmicos apresentaram maior latência ( $F_{2,26}=7,1$ ,  $p<0.05$ ) bem como dispenderam menos tempo na exploração do braço novo ( $F_{2,26}=5,7$ ,  $p<0.05$ ), inferindo que o tratamento com roflumilast melhorou o desempenho cognitivo dos animais isquêmicos quando comparados com aqueles isquêmicos que receberam veículo ( $p<0.05$ ).



**Figura 1** – Efeito do tratamento com roflumilast 0.01 mg/Kg sobre a atividade locomotora dos animais avaliada como distância total percorrida, medida no campo aberto. As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMS (n=9-12/grupo).



**Figura 2** – Efeito do tratamento com roflumilast 0.01 mg/Kg sobre o desempenho cognitivo de animais submetidos a cirurgia sham ou OBACC e avaliados no labirinto em Y. \* $p < 0.05$  versus o grupo sham + vei e # $p < 0.05$  versus o grupo OBACC + roflumilast. As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMS (n=9-12/grupo).

## Conclusões

O tratamento com roflumilast não alterou a atividade locomotora de animais isquêmicos e melhorou o desempenho cognitivo dos mesmos quando comparados com seus pares controles.

## Agradecimentos

Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

## Referências

- 1- 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.
- 2- SOARES, L.M. et al. Cognitive impairment and persistent anxiety-related responses following bilateral common carotid artery occlusion in mice. *Behav Brain Res*. 2013; 249:28–37.
- 3- 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.
- 4- 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 Res*. 1997; 28;752(1-2):209-18.
- 5- YUAN, L. et al. Potential treatment benefits and safety of roflumilast in COPD: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis*. 2016; 11:1477-83.