

EFEITOS DO CANABIDIOL SOBRE AS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO CÉREBRO DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS A ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL E TRANSITÓRIA

Fernanda Canova da Silveira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira (Orientadora), Marco Aurélio Mori (Coorientador).
rubiaweffort@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Farmacologia, Neuropsicofarmacologia

Palavras-chave: isquemia cerebral, injúria neuronal, machos e fêmeas

Resumo

A isquemia cerebral (IC), importante causa de morbimortalidade na população mundial, possui incidências e prevalências distintas entre os sexos. A incidência da IC é maior nos homens do que em mulheres até uma idade avançada, momento em que as taxas passam a se igualar ou mesmo tornarem-se maiores no sexo feminino. Evidências experimentais e clínicas mostram que redução ou mesmo bloqueio do fluxo sanguíneo de uma dada área cerebral causa diminuição do suprimento de oxigênio e glicose, de forma a promover neuroinflamação, com progressão para morte neuronal. Como consequência, após um episódio isquêmico, podem ocorrer alterações de humor e déficits de memória. No entanto, são escassas as evidências experimentais das consequências da IC para animais do sexo feminino. Neste estudo, comparamos as alterações neurohistológicas da IC entre camundongos machos e fêmeas. Observou-se significativa injúria neuronal no hipocampo dos animais machos em contraste com a ausência de lesão neuronal significativa em fêmeas. Estudos futuros devem esclarecer as causas destas diferenças.

Introdução

A isquemia cerebral (IC) representa importante causa de incapacidade e mortalidade na população mundial, além de causar impacto negativo sobre os custos dos sistemas de saúde. A lesão cerebral isquêmica aguda ocorre mediante dois mecanismos principais: i) A oclusão de uma artéria cerebral (acidente vascular cerebral – AVC), que leva a redução do Fluxo Sanguíneo Cerebral (FSC) em uma específica região cerebral, ou ii) Parada cardíaca, com redução global do FSC (PERCIE DU SERT, et al., 2017). Em ambas as situações, disfunções neuropsicológicas e déficits de memória, são as principais consequências observadas no paciente, o que leva a incapacitação, e necessidade de maiores cuidados em saúde (FERNANDES et al., 2008). Entretanto, existem diferenças no risco de ocorrência e também no grau de comprometimento decorrente da IC entre homens e mulheres. Em geral, a incidência de IC e as taxas de mortalidade são menores em mulheres na pré-menopausa em relação aos homens da mesma idade.

Parte dessa vantagem feminina em relação a IC está relacionada com os diferentes níveis de hormônios sexuais inerentes a diferença de gênero (AHNSTEDT et al., 2016). A literatura aponta vários mecanismos envolvidos na fisiopatologia da IC que podem ser alvos para novas ferramentas farmacológicas. Embora muitos estudos pré-clínicos apontem para terapias neuroprotetoras promissoras, a translação destes estudos para a clínica neurológica não ocorre. Uma das razões para esta deficiência decorre que os estudos pré-clínicos são realizados em animais do sexo masculino, jovens e sem co-morbidades (Dhir et al., 2020; Gutiérrez-Vargas et al., 2020). Portanto, há uma necessidade e recomendação para que se teste a IC animais de ambos os sexos, envelhecidos e na presença de diabetes e hipertensão entre outras condições. Isto, poderá facilitar a compreensão das diferenças sexuais no desenvolvimento da IC e alavancar o desenvolvimento de ferramentas farmacológicas que possam auxiliar no tratamento das sequelas da IC. Desta forma, este trabalho teve por objetivo, comparar as consequências neurohistológicas da IC em camundongos machos e fêmeas. O canabidiol (CBD), será utilizado em experimentos futuros para se verificar se o efeito neuroprotetor desta droga é variável quanto ao sexo.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas *black* linhagem C57/B6J, com 12 semanas de idade, pesando entre 20 e 30g. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura controlada (22 ± 1 °C) e ciclo de luz claro/escuro (12h), e água e ração *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética da UEM (CEUA nº 9668310119).

Cirurgia

A IC foi induzida pela oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC). Os animais, posicionados em decúbito dorsal em mesa cirúrgica, foram anestesiados com uma mistura de isoflurano + oxigênio (Isoforine®□, Cristália, São Paulo, Brazil) aplicada com a ajuda de um sistema de liberação contínua de anestésico gasoso (1,3-1,5% de isoflurano em oxigênio 100%) em uma máscara encaixada no focinho do animal. Por meio de uma incisão na parte ventral do pescoço, as artérias carótidas comuns foram expostas, dissecadas, isoladas do nervo vago e, em cada uma delas, colocado um clip de aneurisma para oclusão do fluxo sanguíneo durante 20 minutos, período em que os animais permaneceram em uma caixa aquecida (30 ± 1 °C) para evitar uma possível hipotermia induzida pela isquemia. Após 20 minutos, os animais foram novamente anestesiados, os clips de aneurisma removidos e a incisão suturada. Os animais pertencentes ao grupo Sham foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos com exceção da oclusão das artérias carótidas com os clips de aneurisma. Foram obtidos 4 grupos experimentais: machos sham, machos isquêmicos, fêmeas sham e fêmeas isquêmicas.

Análise histológica: Coloração de Nissl

Para obtenção do tecido cerebral, após os animais serem anestesiados, realizou-se perfusão transcárdica com paraformaldeído 5% (PFA 4%) e posterior decaptação. Os cérebros retirados foram armazenados por 24h em vidros âmbar com PFA 4%, e posteriormente solução de glicose 5% por 5 dias. O tecido cerebral foi congelado com o uso de nitrogênio líquido e armazenado a -20 °C. Utilizando um Criostato (CM

1350, Leica, Alemanha), foram obtidas secções cerebrais, em posição coronal, na espessura de 30µm, de toda extensão do hipocampo. Os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas, resultando em 8 cortes por lâmina e uma lâmina por animal. As lâminas ficaram embebidas nas soluções de Nissl, seguidas de etanol 100%, isopropanol e xilitol, e posteriormente as lâminas foram montadas com Permunt. Após a secagem, as lâminas foram analisadas através do microscópio óptico de luz (Olympus AX-70 microscope), acoplada a câmera digital, onde foram obtidas fotos das regiões CA1 e CA3, de ambos os hemisférios cerebrais de cada animal. Para análise semi-quantitativa da lesão neuronal, por meio do software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), foram obtidos os valores da densidade óptica integrada (DOI) das regiões CA1 e CA3 do hipocampo, em áreas previamente estabelecidas. Foram calculadas as médias dos valores obtidos em cada hemisfério de cada animal. Os resultados são mostrados com a média do grupo experimental.

Tratamento

Os experimentos com CBD não foram realizados devido a pandemia COVID-19

Análise estatística

Para a análise estatística dos dados e ilustrações gráficas, foi utilizado o Software GraphPad PRISM 8. Os valores foram analisados por Student t-test, sendo $p < 0,05$ considerado significativo.

Resultados e Discussão

A coloração de Nissl proporciona resultados referentes a neurodegeneração do tecido. Uma redução da densidade celular nas áreas do hipocampo dos animais submetidos à OBACC evidencia a existência de sequelas isquêmicas neste grupo de camundongos. A fig. 1 mostra o resultado da avaliação histológica em neurônios do hipocampo nas áreas CA1 e CA3 no que se refere à DOI. Camundongos isquêmicos machos apresentaram significativa diminuição das DOIs em relação aos seus controles Sham, tanto nas áreas CA1 quanto CA3 ($p < 0,05$). Em contrapartida, percebe-se que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais do sexo feminino ($p > 0,05$). Os achados deste estudo evidenciam sequelas neurohistológicas significativas no hipocampo, apenas para camundongos do sexo masculino. A partir deste resultado, surgem teorias explicativas para tal fato, como possível existência de neuroproteção feminina mediada por hormônios sexuais, ou possível tempo de OBACC insuficiente para o sexo feminino.

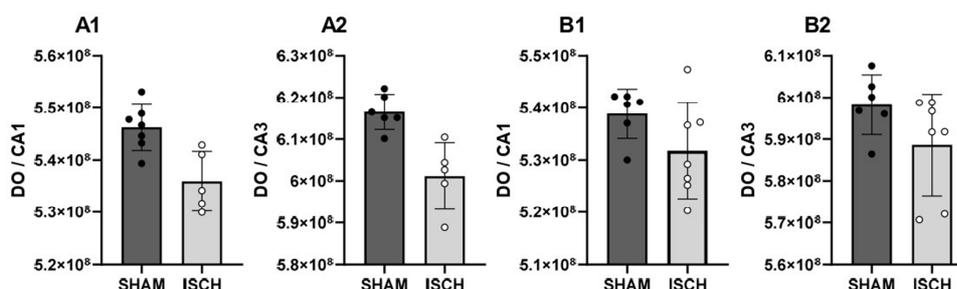


Figura 1 – Efeitos da OBACC sobre a densidade óptica integrada (DOI) no hipocampo de camundongos submetidos à OBACC (Isch) e falso operados (Sham) machos e fêmeas. (A1) CA1 de

camungondos machos (A2) CA3 de camundongos machos (B1) CA1 de camundongos fêmeas (B2)
CA3 de camundongos fêmeas.

Conclusões

Neste trabalho foi possível observar que a OBACC com duração de 20 minutos significativa neurodegeneração do hipocampo de camundongos machos. A mesma intervenção cirúrgica, não resultou em lesão significativa em fêmeas. Estudos futuros poderão investigar as possíveis causas da diferença entre machos e fêmeas submetidos a OBCCA. Estes estudos poderão possibilitar a melhor compreensão da fisiopatologia da IC bem como o desenvolvimento de terapias que atuem especificamente em cada sexo.

Agradecimentos

Universidade Estadual de Maringá, Fundação Araucária, CNPq e CAPES.

Referências

AHNSTEDT, Hilda; MCCULLOUGH, Louise D.; CIPOLLA, Marilyn J. The importance of considering sex differences in translational stroke research. **Translational stroke research**, v. 7, n. 4, p. 261-273, 2016.

DHIR, Neha et al. Pre-clinical to clinical translational failures and current status of clinical trials in stroke therapy: a brief review. **Current Neuropharmacology**, 2020.

FERNANDES, Juliana S. et al. Long-term treatment with fish oil prevents memory impairments but not hippocampal damage in rats subjected to transient, global cerebral ischemia. **Nutrition Research**, v. 28, n. 11, p. 798-808, 2008.

GUTIÉRREZ-VARGAS, Johanna Andrea; CARDONA-GÓMEZ, Gloria Patricia. Considering risk factors for the effectiveness of translational therapies in brain stroke. **Journal of the neurological sciences**, v. 408, p. 116547, 2020.

PERCIE DU SERT, Nathalie et al. The IMPROVE guidelines (ischaemia models: procedural refinements of in vivo experiments). **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 37, n. 11, p. 3488-3517, 2017.