

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS TRATADOS COM CANABIDIOL E SUBMETIDOS A ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL E TRANSITÓRIA.

Luiz Otávio Versari (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Humberto Milani (Orientador), Marco Aurélio Mori (Coorientador). hmilani@uem.br

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), umas das maiores causas de morbimortalidade na população mundial, possui comportamento e incidência diferente entre os sexos. O distúrbio é menos frequente em mulheres até o período pré-menopausa, momento em que as incidências se igualam ou mesmo se tornam maiores. Evidências experimentais e clínicas mostram que uma redução ou bloqueio do fluxo sanguíneo de uma dada área cerebral causa diminuição do suprimento de oxigênio, levando a um processo isquêmico com intensa neuroinflamação que pode progredir para morte neuronal. Em consequência a esse dano neuronal, podem ocorrer disfunções neuropsicomotoras e déficits de memória. No entanto, são escassas as evidências experimentais das consequências da IC para animais do sexo feminino. Neste estudo, foram comparadas alterações comportamentais da IC em camundongos machos e fêmeas, e observadas significativas sequelas comportamentais apenas nos primeiros. Estudos futuros são necessários para esclarecer estas diferenças.

Introdução

A isquemia cerebral (IC) é uma manifestação do acidente vascular cerebral ou da parada cardíaca, e possui grande impacto socio-econômico global, devido ao dano cerebral e a consequente incapacitação funcional (Flynn et al., 2008). Pacientes que sobrevivem aos danos de uma IC, mormente após uma parada cardíaca, são particularmente vulneráveis ao desenvolvimento de disfunções neuropsicológicas e déficits de memória (Geri et al., 2014). Diferentes modelos experimentais foram desenvolvidos para avaliar os danos neuronais e as sequelas comportamentais, além do desenvolvimento de potenciais estratégias terapêuticas, (Hall and Traystman, 2009). 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 à diferença de gênero (AHNSTEDT et al., 2016). Em modelos

animais de IC, grande parte dos estudos são realizados com animais machos, jovens e sem co-morbidades (Dhir et al., 2020;). Portanto, há a necessidade de se avaliar os efeitos da IC em animais de ambos os sexos a fim de se distinguir possíveis diferenças de resposta entre gêneros, para então se avaliar os possíveis mecanismos dessas diferenças, e desenvolver terapias farmacológicas apropriadas. Desta forma, este trabalho teve como objetivo comparar os efeitos da isquemia cerebral global e transitória (ICGT) sobre alguns parâmetros comportamentais de 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), 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.

Testes comportamentais:

Campo aberto (CA): Os animais foram colocados individualmente em um campo circular delimitado, para se locomoverem livremente por 5 min. O parâmetro analisado foi a distância percorrida (metros). CA é um método experimental utilizado para avaliação da atividade locomotora dos animais, sendo o comportamento filmado e analisado pelo software Any-maze.

Teste do nado forçado (TNF): Cada animal foi colocado individualmente em um tanque preenchido com água a 25 °C por 6 min. Os parâmetros analisados foram: latência para o primeiro episódio de imobilidade e tempo total de imobilidade. A imobilidade é definida quando o animal não exerce esforços, apenas movimentos necessários para manutenção da cabeça acima do nível de água. O TNF tem sido utilizado em estudos para avaliação de compostos com ação antidepressiva (PORSOLT et al. 1978).

Teste de localização de objetos (TLO): O teste (T) é realizado em 2 sessões, com 3min de duração/sessão. No primeiro teste (T1), o animal é colocado dentro de um campo circular delimitado, no qual dois objetos idênticos são dispostos simetricamente a uma distância fixa entre eles. Após 1h de intervalo, é realizado o segundo teste (T2). O animal volta para o campo, porém, agora com um dos objetos em uma nova posição. O tempo de exploração dos objetos é registrado manualmente, em T1 e T2. Como indicativo do processo de aprendizagem, calcula-se o índice de discriminação (D2) dos objetos nas posições 'familiar' e 'nova'. O cálculo é da seguinte forma: $D2 = (\text{tempo de exploração na nova localização} - \text{tempo de exploração na localização familiar}) / (\text{tempo de exploração na nova localização} + \text{tempo de exploração na localização familiar})$.

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 pelo Teste t de Student (*Student t-test*), sendo o valor de $p < 0,05$ indicativo de diferenças significativas entre grupos.

Resultados e Discussão

As fig. 1 e 2 mostram os resultados da análise comportamental. Nos camundongos fêmeas não houve diferenças significativas entre os grupos 'sham' (controle) e isquêmico, independentemente do parâmetro comportamental analisado ($p > 0,05$). Em contrapartida, no sexo masculino, foram notadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quanto ao índice de discriminação D2 (fig.1, B) e ao tempo total de imobilidade no teste de nado forçado (TNF) (fig. 1, D, $p < 0,05$). Esses dados indicam comprometimento da memória de reconhecimento da localização de objetos e o desenvolvimento de comportamento do tipo depressivo. No teste de campo aberto (CA), a atividade locomotora em ambos os sexos não foi comprometida pela isquemia ($p > 0,05$). Estes dados sugerem que camundongos machos podem ser mais suscetíveis aos efeitos emocionais e cognitivos provocados pela isquemia cerebral.

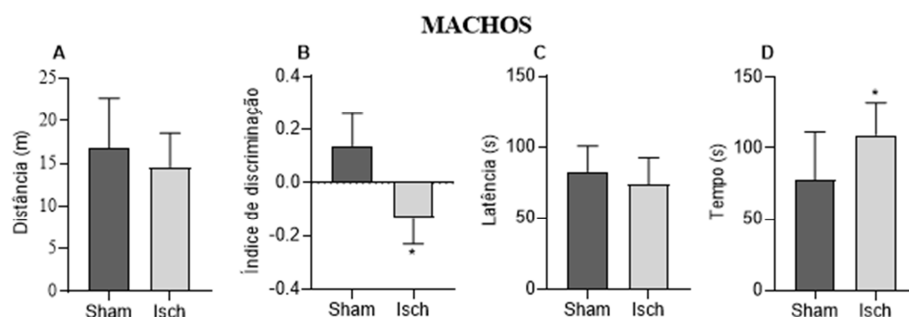


Figura 1 – Efeitos da isquemia cerebral sobre o comportamento de camundongos machos. (A) Distância percorrida no teste CA (B) Índice de discriminação no TLO (C) Latência para primeira imobilização no TNF (D) Tempo de imobilidade total no TNF

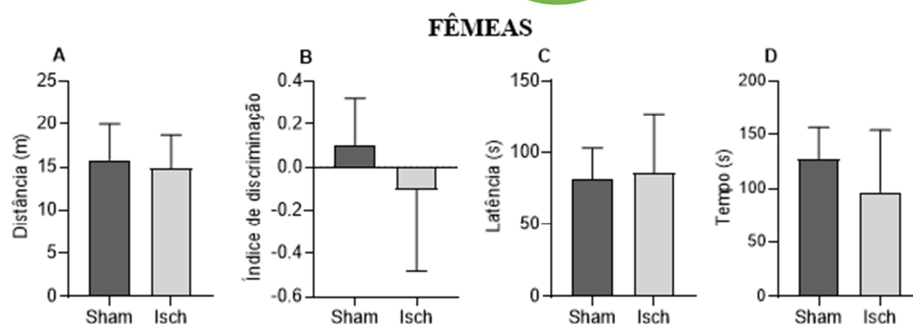


Figura 2 – Efeitos da isquemia cerebral sobre o comportamento de camundongos fêmeas. (A) Distância percorrida no teste CA (B) Índice de discriminação no TLO (C) Latência para primeira imobilização no TNF (D) Tempo de imobilidade total no TNF

Conclusões

A isquemia cerebral provocada por 20 minutos de oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC) resultou em alterações comportamentais indicativas de disfunções cognitivas e emocionais em animais do sexo masculino, mas não naqueles do sexo feminino. Estes dados sugerem uma susceptibilidade diferencial entre camundongos dos gêneros masculino e feminino aos efeitos comportamentais da isquemia cerebral. Estudos adicionais são necessários para se averiguar os mecanismos dessa diferenciação, e seu impacto sobre os efeitos de um potencial fármaco neuroprotetor.

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.

FLYNN, R. W. V.; MACWALTER, R. S. M.; DONEY, A. S. F. The cost of cerebral ischaemia. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 250-256, 2008.

GERI, Guillaume et al. Neurological consequences of cardiac arrest: where do we stand?. In: **Annales francaises d'anesthesie et de reanimation**. Elsevier Masson, 2014. p. 98-101.

HALL, Edward D.; TRAYSTMAN, Richard J. Role of animal studies in the design of clinical trials. **Frontiers of neurology and neuroscience**, v. 25, p. 10, 2009.