

EFEITO DA EMULSÃO OBTIDA DE *Trichilia catigua* SOBRE A INJÚRIA DA MATÉRIA BRANCA E INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA EM CAMUNDONGOS COM ISQUEMIA

Anderson Gusthavo dos Santos Mucenieks (PIC-UEM), Daniela Velasquez Oliveira (Aluna do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – UEM) Prof. Dr. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira (Orientadora),
e-mail: rubiaweffort@gmail.com

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

Farmacologia/Neuropsicofarmacologia

Palavras-chave: isquemia cerebral, barreira hematoencefálica, *Trichilia catigua*

Resumo:

A isquemia cerebral (IC) se configura como uma das principais causas de morte no mundo. Disfunções neurológicas decorrentes da IC são comuns em pacientes sobreviventes. Lesões de matéria branca (MB) e perda da integridade da barreira hematoencefálica (BHE) estão entre as consequências da IC, as quais estão associadas a prejuízos cognitivos. Atualmente não existem tratamentos eficientes para diminuir as consequências da IC. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram efeitos neuroprotetores da fração acetato de etila (FAE) obtida da *Trichilia catigua*, uma planta conhecida popularmente como catuaba. Estes efeitos foram ligados à redução do estresse oxidativo e da neuroinflamação no hipocampo. Pouco se sabe sobre os efeitos da FAE sobre a integridade da BHE e da MB. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com FAE sobre a injúria da MB e da integridade da BHE em camundongos submetidos à oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC), um modelo experimental de IC. Os animais foram tratados com FAE (400 mg/kg) 1h após a reperusão e seguiu, uma vez ao dia, por 3 dias consecutivos. A quebra da BHE foi avaliada através da medida do extravasamento do corante Azul de Evans (AE) 1, 3 e 7 dias após a cirurgia. A quebra da BHE em 1 e 7 dias não apresentou valores relevantes, mas foi observada quebra significativa da BHE 3 dias após a OBACC. Estudos futuros, utilizando outros esquemas posológicos, deverão ser conduzidos para verificar se a FAE apresenta efeito neuroprotetor sobre a BHE.

Introdução

A isquemia cerebral (IC) é uma das principais causas de morte em todo o mundo (Neumann et al., 2013) e sobreviventes de eventos isquêmicos são particularmente vulneráveis a desenvolver disfunções neurológicas (Geri et al., 2014). Atualmente, há apenas o ativador do plasminogênio tecidual recombinante (rtPA) aprovado pelo FDA para tratamento dos efeitos agudos da IC, o qual apresenta limitações para sua utilização. Nesse contexto, é

importante a identificação de opções terapêuticas para a IC. Disfunções cognitivas estão associadas à integridade da matéria branca (MB) e barreira hematoencefálica (BHE). A BHE é uma barreira de permeabilidade seletiva, que mantém o microambiente do cérebro, separando o sangue do fluido extracelular. A ruptura da BHE é o principal fenômeno patológico na IC, situação na qual o cérebro lesionado destrói a integridade da BHE e aumenta a permeabilidade da mesma. Evidências indicam que a lesão isquêmica do cérebro pode causar ruptura da BHE e aumentar o infarto cerebral (Fan et al., 2018), além de danos à substância branca do cérebro de ratos (Choi et al., 2016). Portanto, a proteção da BHE e a integridade da MB são essenciais para manter a função cerebral. Conhecida como catuaba, a *Trichilia catigua* é usada popularmente por suas propriedades afrodisíacas e tonificantes. Em 2012, Kandem et al. verificaram que o tratamento com o extrato da *T. catigua* promoveu: a) redução do estresse oxidativo, b) perda de atividade mitocondrial, e c) redução da formação de lactato desidrogenase (marcador de lesão neuronal) *in vitro*. Truiti et al. (2015) mostraram que o tratamento com 200-800 mg/kg da fração acetato de etila (FAE) de *T. catigua* reduziu o déficit de aprendizagem medido no labirinto aquático de Morris (LAM) e diminuiu em cerca de 80% a morte neuronal no hipocampo de camundongos submetidos a oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC). Além disso, a FAE (400 mg/kg), preveniu a amnésia retrógrada, bem como diminuiu o estresse oxidativo, a filtração leucocitária e a resposta das células gliais provocadas pela IC em ratos (Godinho et al.; 2017, 2018). Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos da FAE sobre a integridade da BHE e MB em animais submetidos à OBACC.

Materiais e métodos

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob nº 2081190719. Foram utilizados camundongos BalbC machos, de 2 a 3 meses. A IC foi induzida pela OBACC, conforme descrita por Soares et al. (2013). Para os animais controle, denominados *Sham*, os procedimentos cirúrgicos foram os mesmos, com a diferença de que esses animais não tiveram nenhuma das artérias ocluídas e, portanto, não sofreram injúria isquêmica. Após 1, 3 ou 7 dias o animal foi levemente anestesiado em câmara saturada com o anestésico isoflurano e uma solução a 2% do corante AE (0.2 mg/kg, 1ml/kg de peso) foi injetada i.p. Duas horas após a injeção do AE o animal foi anestesiado profundamente (Thiopental, 50 mg/kg) e perfundido transcárdiacamente com solução salina tamponada (PBS) num fluxo de 11 ml/min, por 5 minutos. O cérebro foi extraído e mantido sob congelamento (- 20 °C a - 80 °C). Para a análise da permeabilidade da BHE, os cérebros foram pesados, homogeneizados com igual volume de ácido tricloroacético em etanol (1: 3) e incubados overnight. Em seguida, o sobrenadante e os padrões (0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 e 10 µg / ml) foram detectados em ($Ex\lambda = 620\text{ nm}$, $Em\lambda = 680\text{ nm}$) por leitor de

microplaca, de modo que o conteúdo de AE de cada grupo foi calculado conforme curva padrão demonstrada por Wu et al. (2017).

FAE obtida da *Trichilia catigua* (200 e 400 mg/kg) foi administrada oralmente por gavagem em um volume de 10 ml/kg, uma hora após as cirurgias aos animais do grupo de OBACC 3d. Na análise estatística, os resultados são apresentados como médias \pm EPM dos grupos. Os dados foram submetidos a ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de comparações múltiplas de Tukey-Kramer's (GraphPrisma software). $p \leq 0,05$ foi considerado como critério para significância estatística.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos são demonstrados na Figura 1. A IC induzida por OBACC em camundongos resultou em significativa alteração da permeabilidade da BHE ao corante AE após a reperusão ($F_{4,46}=6,513$, $p=0,0003$). Houve diferença significativa entre o grupo OBACC e grupo Sham, 3 dias após a cirurgia ($p < 0,05$). No entanto, não foram observadas diferenças entre os grupos OBACC e OBACC + FAE ($p > 0,05$), indicando que a FAE, neste esquema posológico, não exerceu efeitos neuroprotetores sobre a BHE em camundongos isquêmicos. Estes resultados contrariam, em parte, estudos preliminares que indicaram que a FAE reduz o estresse oxidativo, diminui neuroinflamação e promove recuperação funcional em roedores com isquemia cerebral (Godinho et al. 2017, 2018; Truiti et al., 2015). No entanto, os estudos citados foram realizados em ratos submetidos à isquemia cerebral global e a administração de FAE foi realizada por 5 dias após a isquemia. Portanto, foram modelos de IC cerebral, espécie e esquemas posológicos diferentes. As razões para a ineficácia da FAE sobre a quebra da BHE precisam ser melhor investigadas. Outras doses da FAE, bem como outros esquemas posológicos deverão ser testados em experimentos futuros.

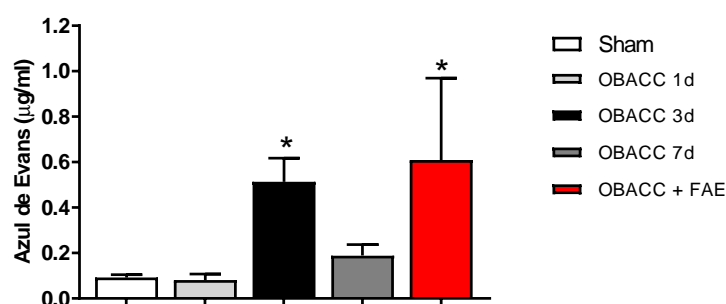


Figura 1: Permeabilidade da BHE em animais submetidos à isquemia cerebral. As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMs dos grupos Sham (n= 11), OBACC 1d (n=6), OBACC 3d (n=17), OBACC 7d (n=10), OBACC + FAE (n=6). * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sham.

OBS: os experimentos com a dose de 200 mg/kg da FAE e sobre a injúria da matéria branca não foram realizados devido à pandemia COVID-19 (Res. CEP 006/2020).

Conclusões

Os resultados indicam quebra da BHE em camundongos BalbC ocorre 3 dias após a OBACC. O tratamento com a FAE 400 mg/kg não protegeu os animais do dano da isquemia sobre a BHE.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Estadual de Maringá, ao programa de pós-graduação em ciências Farmacêuticas (PCF), a Capes e ao CNPQ.

Referências

CHOI, Bo-Ryoung et al. Characterization of white matter injury in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. **Stroke**, v. 47, n. 2, p. 542-547, 2016.

FAN, Feng et al. MiR-539 Targets MMP-9 to Regulate the Permeability of Blood–Brain Barrier in Ischemia/Reperfusion Injury of Brain. **Neurochemical research**, v. 43, n. 12, p. 2260-2267, 2018.

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.

GODINHO, Jacqueline et al. Ethyl-acetate fraction of *Trichilia catigua* restores long-term retrograde memory and reduces oxidative stress and inflammation after global cerebral ischemia in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 337, p. 173-182, 2018.

KAMDEM, Jean Paul et al. Catuaba (*Trichilia catigua*) prevents against oxidative damage induced by in vitro ischemia–reperfusion in rat hippocampal slices. **Neurochemical research**, v. 37, n. 12, p. 2826-2835, 2012.

T NEUMANN, Jake et al. Global cerebral ischemia: synaptic and cognitive dysfunction. **Current drug targets**, v. 14, n. 1, p. 20-35, 2013.

SOARES, Lígia Mendes et al. Cognitive impairment and persistent anxiety-related responses following bilateral common carotid artery occlusion in mice. **Behavioural brain research**, v. 249, p. 28-37, 2013.

TRUITI, Manuela Torrado et al. *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction protects against cognitive impairments and hippocampal cell death induced by bilateral common carotid occlusion in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 172, p. 232-237, 2015.



WU, Qingjian et al. Roflumilast reduces cerebral inflammation in a rat model of experimental subarachnoid hemorrhage. **Inflammation**, v. 40, n. 4, p. 1245-1253, 2017.