EFEITOS DO CANABIDIOL SOBRE A INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA EM CAMUNDONGOS COM ISQUEMIA CEREBRAL

Fernanda Canova da Silveira (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Rubia Maria Monteiro Weffort de Oliveira (Orientadora), rubiaweffort@gmail.com

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

Área farmacologia; Subárea neuropsicofarmacologia

Palavras-chave: isquemia, barreira hematoencefálica, camundongos

Resumo

A isquemia cerebral (IC) representa uma importante causa de morbidade e mortalidade na população, constituindo, dessa forma, um problema de saúde global. A redução ou o bloqueio do fluxo sanguíneo a uma região cerebral causa uma disfunção na distribuição de oxigênio e glicose na área afetada, resultando em morte neuronal e neurodegeneração. Frequentemente são observadas disfunções neurológicas, associadas a lesões do hipocampo, da matéria branca (MB) e à perda da integridade da barreira hematoencefálica (BHE). Estudos apontam efeitos benéficos do canabidiol (CBD) em diferentes patologias neurodegenerativas, associados a uma potente atividade antioxidante e anti-inflamatória, além de efeito protetor sobre os neurônios e astrócitos, com prevenção de morte celular por necrose e apoptose. Considerando que a IC é uma doença que ainda não apresenta tratamento adequado, e que os mecanismos de neuroproteção do CBD sobre a MB e BHE não são totalmente esclarecidos, sobretudo no sentido de indução de mudanças plásticas neuronais para recuperação funcional, o objetivo deste estudo foi identificar a integridade da BHE em camundongos machos e fêmeas submetidos a obstrução bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC) e avaliar o efeito do CBD nesta situação. Foi utilizada a medida do extravasamento do corante Azul de Evans para detectar a integridade da BHE. Os resultados parciais mostraram que mesmo após 7 dias do insulto isquêmicos, camundongos machos apresentaram quebra da BHE.

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 (FERNANDES et al., 2008). Entretanto, existem diferenças no risco de ocorrência e no grau de comprometimento decorrente da IC entre os sexos. 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, sendo parte dessa vantagem feminina relacionada aos níveis de estrogênio circulantes (AHNSTEDT et al., 2016). A literatura aponta vários mecanismos envolvidos na fisiopatologia da IC que podem ser alvos para novas ferramentas farmacológicas. A neuroinflamação pode provocar uma disfunção da barreira hematoencefálica (BHE), estrutura que constitui uma interface funcional entre as estruturas anatômicas que formam o SNC e a circulação periférica, incluindo substâncias químicas no sangue. Embora muitos estudos pré-clínicos apontem para terapias neuroprotetoras promissoras, a translação destes estudos para a clínica neurológica é limitada. Uma das razões para esta deficiência decorre que os estudos pré-clínicos são realizados em animais do sexo masculino, jovens e sem comorbidades (DHIR et al., 2020; GUTIÉRREZ-VARGAS et al., 2020). Portanto, há uma necessidade de se testar a IC em animais de ambos os sexos, e em animais com comorbidades. 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. Considerando as atividades neuroprotetoras do CBD, este trabalho teve por objetivo comparar o efeito da integralidade da BHE em camundongos machos e fêmeas submetidos a IC, bem como investigar o efeito neuroprotetor do CBD nestas condições.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas 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 7995230420).

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 hipotermia induzida pela isquemia. Após 20 minutos, os animais foram novamente anestesiados, os clips de aneurisma removidos e a incisão suturada. Animais pertencentes ao grupo Sham foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos com exceção da OBACC.

Avaliação da permeabilidade da BHE

Após 1, 3, 7 ou 21 dias das cirurgias, o animal era anestesiado, e uma solução a 2% do corante azul de Evans (AE, 0.2 mg/kg, 1ml/kg de peso) era injetada via intraperitoneal. Para obtenção do tecido cerebral, após os animais serem anestesiados, realizou-se perfusão transcardíaca com paraformaldeído 5% (PFA 4%) e posterior decaptação. Os cérebros retirados foram transferidos para uma solução glicosilada e posteriormente congelados (-20º.C a - 80º.C). Foram feitos ensaios bioquímicos para a detecção do AE e posterior quantificação do extravasamento deste corante.

Análise Estatística

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

Resultados e Discussão

O extravasamento do AE permite avaliar a quebra da BHE, em decorrência da neuroinflamação induzida pela IC. A figura 1 corrobora com tal afirmação, representando resultados parciais do projeto. Uma avaliação do decurso temporal da quebra da BHE em camundongos do sexo masculino é um aspecto importante para definição do melhor tempo para avaliação de possíveis estratégias de neuroproteção como por exemplo, o uso do CBD. Camundongos isquêmicos apresentaram maior extravasamento do AE após 24, 48, 72 horas e 7 dias após o insulto isquêmico. Embora não houve diferença estatística, os tempos de maior extravasamento do AE foram detectados 48 e 72 horas da cirurgia. Dados referentes ao sexo feminino encontram-se em análise.

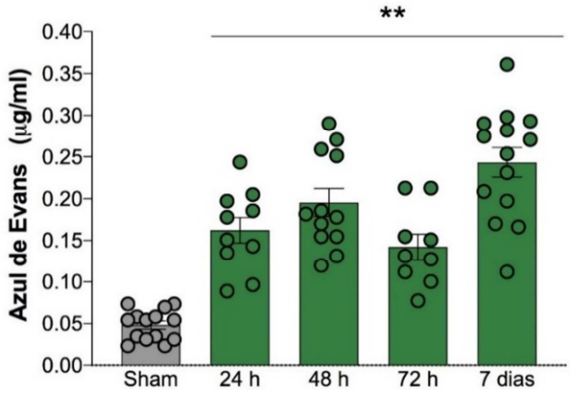

Figura 1 - Decurso temporal da quebra da barreira hematoencefálica (BHE) em camundongos machos falso operados (Sham) ou submetidos à oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC). A injeção de AE foi realizada depois de 24, 48, 72 horas e 7 dias após a cirurgia. As colunas representam as médias, as barras os erros padrão das

médias (EPM) e os círculos os valores individuais para cada animal. ***P<0.01 (teste t-Student).*

Conclusões

Neste trabalho foi possível observar que a OBACC com duração de 20 minutos possui repercussão na permeabilidade da BHE, em decorrência da neuroinflamação gerada pela IC. Os valores de maior expressão foram após 24 e 72 horas do evento isquêmico, embora observou-se extravasão do corante AE até 7 dias do insulto. Estudos futuros poderão auxiliar no desenvolvimento de terapias que atuem especificamente na neuroproteção e, consequente integralidade da BHE.

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**, v. 18, n. 7, p. 596-612, 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.