

ESTUDOS SOBRE ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE) EM MODELO ANIMAL: USO DE CÉLULAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA E DE FLAVONOIDES***Arthur Giraldi-Guimarães***

Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica)/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual/UENF/RJ
agiraldi@uenf.br

Maria de Fátima dos Santos Sampaio

Mestre em Biociências e Biotecnologia/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual/UENF/RJ
fatinha@uenf.br

Amélia Miranda Gomes Rodrigues

Mestre em Biociências e Biotecnologia/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual/UENF/RJ
amelia.fmc@gmail.com

Helder Teixeira de Freitas

Bacharel em Ciências Biológicas/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual/UENF/RJ
Heldertfreitas2@hotmail.com

Viviane Gomes da Silva

Bacharel em Ciências Biológicas/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual/UENF/RJ
vyvyanegomes@hotmail.com

Fralini dos Santos Marcilio

Licenciada em Biologia/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual/UENF/RJ
fralinidsm@hotmail.com

Bárbara de Paula Coelho

Graduanda em Ciências Biológicas/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual/UENF/RJ
barbaradepaul@hotmail.com

Mayara de Almeida Martins Soares

Graduanda em Ciências Biológicas/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual/UENF/RJ
mayaram08@gmail.com

Mariana Gomes Rebel

Graduanda em Biomedicina/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual/UENF/RJ
mgrebel@gmail.com

RESUMO

O Acidente Vascular Encefálico é a maior causa de incapacitação em seres humanos adultos, representando atualmente um grande custo pessoal e social. Empregando modelos experimentais de lesões cerebrais focais, este projeto tem como objetivo geral avaliar o efeito benéfico de abordagens terapêuticas promissoras no tratamento do AVE e de outras lesões cerebrais. Em estudos concluídos, tivemos como objetivo principal avaliar a capacidade de indução de recuperação funcional em testes sensorimotora pelas terapias com células derivadas de medula óssea e com o flavonoide rutina. Foram utilizados o modelo de isquemia cortical focal unilateral por termocoagulação dos vasos cortical superficiais, e o modelo da ablação cortical focal unilateral por sucção, ambos causando lesão de mesma localização e extensão. Nossos resultados mostraram que as células mononucleares de medula óssea (MNMOS) e as células-tronco mesenquimais (CTMs) foram capazes de promover recuperação de função sensorimotora em testes de movimentos menos sofisticados, em

ambos os modelos de lesão. Entretanto, as MNMOs não promoveram aumento da recuperação de movimentos de destreza, que envolvem treinamento, como agarrar uma pílula de ração. No estudo com o flavonoide rutina, demonstramos que houve promoção de recuperação sensorimotora após a isquemia, e esta se correlacionou com uma ação neuroprotetora do flavonoide. Nossos resultados sugerem que tanto as MNMOs e como a rutina podem ser utilizados como terapias eficazes para o tratamento de lesões cerebrais, quando administradas na fase aguda da doença. Os estudos precisam ser aprofundados no sentido de ampliar os conhecimentos sobre os seus respectivos mecanismos celulares e moleculares de ação.

Palavras-chaves: Células mononucleares, células-tronco mesenquimais, rutina, córtex sensorimotor, recuperação funcional.

1. INTRODUÇÃO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) constitui atualmente um dos maiores problemas de saúde pública mundial, sendo atualmente a maior causa de incapacitação em adultos (BRASIL, 2007; LLOYD-JONES et al., 2009; STRONG et al., 2007). Portanto, o AVE representa um grande custo pessoal e social para a humanidade moderna, o que justifica o grande investimento feito em pesquisas na busca do desenvolvimento de terapias para este mal. Dentre os possíveis focos de intervenção terapêutica no tratamento do AVE estão a neuroplasticidade e a neuroproteção (CARMICHAEL, 2003; MURPHY & CORBETT, 2009). Apesar dos mecanismos celulares e moleculares responsáveis por estes eventos serem ainda pouco conhecidos, eles já começaram a ser descortinados por recentes trabalhos, tornando-se um importante caminho na busca de novas terapias (MURPHY & CORBETT, 2009). Recentes estudos têm apontado para algumas novas propostas terapêuticas no tratamento de doenças neurológicas. Dentre elas está a terapia celular com células derivadas de medula óssea e o tratamento com flavonóides de ação antioxidante e antiinflamatória. Estudos com modelos animais de AVE mostram que o transplante de células derivadas de medula óssea causa melhorias no desempenho em testes funcionais (DE VASCONCELOS DOS SANTOS et al., 2010; GIRALDI-GUIMARÃES et al., 2009; MALTMAN et al., 2011). Os meios pelo qual estas agem terapeuticamente ainda não são completamente conhecidos, mas certamente envolvem a liberação de uma grande variedade de fatores tróficos e de crescimento que amplificam os mecanismos de reparação tecidual que são normalmente ativados pela isquemia (MALTMAN et al., 2011; TAKAHASHI et al., 2006). Dentre estes mecanismos se encontram a proteção contra a morte de neurônios afetados pela isquemia e a reestruturação das conexões sinápticas na periferia da lesão (GIRALDI-GUIMARÃES et al., 2009; MALTMAN et al., 2011). Os flavonóides fazem parte do grupo dos compostos polifenólicos e mais de 2000 flavonóides já foram identificados (RAMASSAMY, 2006). A utilização de flavonóides em modelos de isquemia encefálica também vem sendo estudada, apresentando resultados promissores (AHMAD et al., 2011; KHAN et al., 2009; PANDEY et al., 2011). Empregando modelo experimental de isquemia cerebral focal (termocoagulação da vascularização superficial do córtex sensorimotor), este projeto tem como objetivo geral avaliar o efeito benéfico de abordagens terapêuticas promissoras no tratamento do AVE. Utilizamos também o modelo da ablação cortical focal, que provoca a mesma extensão de lesão, mas por sucção. Uma vez que estudos têm demonstrado que lesões de mesma extensão, mas provocadas por diferentes mecanismos, causam diferentes resultados na indução de plasticidade estrutural e na recuperação funcional (CARMICHAEL, 2003), temos por objetivo comparar a eficácia das terapias em diferentes formas de lesão do córtex sensorimotor. Em estudos desenvolvidos ao longo dos últimos quatro anos, no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF, tivemos como objetivo principal avaliar a capacidade de indução de recuperação funcional em testes sensorimotores pelas terapias com células derivadas de medula óssea e com o flavonoide rutina.

2. METODOLOGIA

Foram usados ratos machos da linhagem *Wistar* com idade entre 2-3 meses no início dos experimentos. O modelo de isquemia unilateral focal utilizado foi o da termocoagulação da vascularização superficial dos córtices motor e somestésico primários, que causa uma lesão isquêmica que afeta apenas as

seis camadas do córtex cerebral, não afetando a substância branca subjacente nem o corpo estriado. Foi realizado também o modelo da ablação cortical, através da remoção por sucção da maior parte do córtex motor primário e de parte do córtex somestésico primário, causando uma lesão de mesma localização e extensão que a causada pela termocoagulação. Para avaliação da função sensorimotora, foram utilizados os testes do cilindro e do adesivo, ambos testes que avaliam movimentos menos sofisticados e sem necessidade de treinamento prévio. A destreza foi avaliada pelo teste da “recuperação de pílula e alcance na câmara” (RPAC), que envolve treinamento para agarrar e levar até a boca uma pílula de ração. A avaliação da redução do volume da lesão foi feita pela coloração de cortes do encéfalo com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), que marca apenas o tecido viável, deixando o tecido degenerado não marcado e possibilitando a visualização da lesão. Para quantificar os neurônios em neurodegeneração na borda da lesão isquêmica, foi feita a reação de cortes finos do encéfalo com o marcador fluorescente Fluoro-Jade® C. Foram realizados três experimentos: - (1) para avaliar o efeito da terapia com células mononucleares de medula óssea (MNMOs) no modelo da isquemia, os animais foram divididos em quatro grupos: tratado com MNMOs e submetido ao RPAC (MNMOs+RPAC), tratado com veículo e submetido ao RPAC (salina+RPAC), tratado com MNMOs (MNMOs) e tratado com veículo (salina). Todos os animais foram submetidos à isquemia unilateral focal por termocoagulação da vascularização superficial dos córtices motor e somestésico primários, sempre no hemisfério contralateral ao da pata de preferência no RPAC. 24h depois, os animais foram injetados pela veia jugular com 3×10^7 MNMOs (obtidas de ratos machos normais doadores) ou apenas com o veículo (salina). Nas semanas seguintes, os animais foram avaliados pelos três testes funcionais. Foi avaliado também se o tratamento resultou numa possível redução do volume da lesão 72 h após a isquemia. - (2) para avaliar o efeito das MNMOs e das células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (CTMs) no modelo de ablação, os animais foram submetidos a ablação e, 24h depois, injetados pela veia jugular com 3×10^7 MNMOs, 3×10^6 CTMs (ambas obtidas de ratos machos normais doadores) ou apenas com o veículo (salina). Nas semanas seguintes, os animais foram avaliados pelos testes do cilindro e do adesivo. - (3) para avaliar o efeito do tratamento com o flavonoide rutina no modelo da isquemia, foram testadas duas doses, 50 mg/kg ou 100 mg/kg de peso corporal. O protocolo de tratamento consistiu de uma injeção intraperitoneal (i.p.) diária, durante cinco dias, começando imediatamente após a indução da isquemia. Foram utilizados os testes do cilindro e do adesivo. A verificação da disponibilidade plasmática e encefálica da rutina foi feita através de análise cromatográfica (HPLC). Foi avaliado também se o tratamento resultou numa possível redução do volume da lesão 48 h após a isquemia, assim como da neurodegeneração na periferia da lesão 72 h após a isquemia.

3. DISCUSSÕES

No experimento (1), o resultado da avaliação do efeito das MNMOs no RPAC, com a comparação entre os grupos MNMOs+RPAC e salina+RPAC, não mostrou efeito significativo do tratamento na recuperação. Nos testes do cilindro e do adesivo, a comparação entre os quatro grupos mostrou que as MNMOs induziram recuperação funcional significativa. Apenas no Adesivo foi observado um aumento da recuperação no grupo MNMOs+RPAC no primeiro mês, mas nos tempos subsequentes não houve diferença entre os grupos MNMOs+RPAC e MNMOs. Nenhuma redução significativa de volume de lesão foi observada com o tratamento. No experimento (2), nossos resultados mostraram significativo aumento da recuperação de função sensorimotora a partir do segundo mês pós-isquemia, tanto no grupo tratado com MNMOs como no tratado com CTMs, e nenhuma diferença significativa foi observada entre esses grupos. No experimento (3), observamos significativa recuperação sensorimotora induzida pela rutina, sendo este efeito mais expressivo na menor dose utilizada (50 mg/kg). A disponibilidade plasmática da rutina após a administração de 50 mg/kg apresentou um pico aprox. 4 horas após a isquemia. Entretanto, não detectamos a rutina no tecido encefálico. O tratamento não promoveu redução no volume da lesão isquêmica, mas reduziu significativamente o número de neurônios em degeneração na periferia da lesão.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados sugerem que as MNMOs são capazes de induzir recuperação de movimentos menos refinados das patas dianteiras, mas não dos mais refinados. Portanto, as MNMOs podem ter limitações quanto ao nível de recuperação promovido aos pacientes, podendo agir sobre certas vias

sensorimotoras, mas não em outras. Entretanto, nossos resultados não encerram a questão, e os estudos precisam ser aprofundados para analisar se em outros modelos de isquemia, com variações no local e na extensão da lesão, a terapia com as MNMOs ou outros tipos celulares pode ser efetiva em recuperar movimentos de destreza.

Como demonstrados em estudo anterior no modelo de isquemia por termocoagulação, as MNMOs e as CTMs também foram capazes de induzir recuperação sensorimotora no modelo da ablação, e com a mesma eficiência. Esses resultados sugerem que ambos os protocolos são eficazes, o que reforça a vantagem de utilização das MNMOs, uma vez que são de mais rápida obtenção e com menor custo. Além disso, nossos resultados mostram que a terapia com células de medula óssea apresenta efeito terapêutico em um modelo de lesão cerebral que se caracteriza por não induzir significativa plasticidade de conexões relacionadas com o controle motor. Isso sugere que a terapia celular pode ser útil em diferentes tipos de lesão cerebral.

No estudo com a rutina, nossos resultados mostram que a rutina tem capacidade de promover aumento de recuperação sensorimotora e de salvar neurônios da morte. Isto sugere que o efeito neuroprotetor da rutina possa resultar tanto em menor perda funcional, pela diminuição da perda de neurônios, como em manutenção de substrato neural para reorganização de conexões, resultando no recrutamento de neurônios sobreviventes para exercer a função dos que morreram, resultando em recuperação funcional. Não detectamos a presença de rutina no tecido encefálico, sugerindo ou que a quantidade que entra no parênquima encefálico é muito baixa para o nível de sensibilidade da técnica utilizada, ou que sua ação terapêutica pode ser independente de entrada no parênquima. Futuros estudos são necessários para verificar que mecanismos moleculares estão envolvidos na neuroproteção e na redução das perdas funcionais promovidos pela rutina.

Estes resultados iniciais do nosso projeto nos deixam otimistas para aprofundar ainda mais os estudos no sentido de identificar mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao efeito terapêutico tanto das células de medula óssea como do flavonoide rutina. Nossos próximos estudos, já em andamento, visam relacionar a recuperação promovida com o possível efeito sobre a reestrutural das conexões tanto na região periférica à lesão, como no córtex sensorimotor contralateral ao hemisfério lesado. Outros mecanismos investigados são os efeitos das terapias na proteção à quebra da barreira hematoencefálica e na resposta inflamatória tecidual, via investigação da ativação de microglia e de astrócitos e da infiltração de neutrófilos durante a resposta aguda à lesão cortical.

5. REFERÊNCIAS

AHMAD, A.; KHAN, M. M.; HODA, M. N.; RAZA, S. S.; KHAN, M. B.; JAVED, H.; ISHRAT, T.; ASHAFAQ, M.; AHMAD, M. E.; SAFHI, M. M.; ISLAM, F. Quercetin protects against oxidative stress associated damages in a rat model of transient focal cerebral ischemia and reperfusion. **Neurochem. Res.**, v. 36, p. 1360-1371, 2011.

BRASIL. **Saúde Brasil 2007**: uma análise da situação de saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2007.641p. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coletiva_saude_061008.pdf. Acesso em julho de 2010.

CARMICHAEL, S.T . Plasticity of Cortical projections after stroke. **The Neuroscientist**, v. 9, n. 1, p. 64-75, 2003.

DE VASCONCELOS DOS SANTOS, A; REIS, J.C.; PAREDES, B.D.; MORAES, L.; J; GIRALDI-GUIMARÃES, A.; MENDEZ-OTERO, R. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. **Brain Research**, v. 1306, p. 149-158, 2010.

GIRALDI-GUIMARÃES, A.; REZENDE-LIMA, M.; BRUNO, F.P.; MENDEZ-OTERO, R. Treatment with bone marrow mononuclear cells induce functional recovery and decrease neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. **Brain Research**, v. 1266, p. 108-120, 2009.

KHAN, M. M.; AHMAD, A.; ISHRAT, T.; KHUWAJA, G.; SRIVASTAWA, P.; KHAN, M. B.; RAZA, S. S.; JAVED, H.; VAIBHAV, K.; KHAN, A.; ISLAM, F. Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. **Brain Research**, v. 1292, p. 123-135, 2009.

LLOYD-JONES, D.; ADAMS, H. P.; CARNETHON, M.; DE SIMONE, G.; FERGUSON, T. B.; FLEGAL, K.; et al. Heart disease and stroke statistics 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, v. 119, p. e71-87, 2009.

MALTMAN, D.J.; HARDY, S.A.; PRZYBORSKI, S.A. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. **Neurochem. Int.**, v. 59, p. 347-56, 2011.

MURPHY, T. H. & CORBETT, D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. **Neuroscience**, v. 10, p. 861-872, 2009.

PANDEY, A. K.; HAZARI, P. P.; PATNAIK, R.; MISHRA, A. K. The role of ASIC1a in neuroprotection elicited by quercetin in focal cerebral ischemia. **Brain Res.**, v. 1383, p. 289-299, 2011.

RAMASSAMY, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. **Eur J. Pharmacol.**, v. 545, p. 51-64, 2006.

STRONG, K.; MATHERS, C.; BONITA, R. Preventing stroke: saving lives around the world. **Lancet Neurol.**, v. 6, p. 182-187, 2007.

TAKAHASHI, M.; LI, T.S.; SUZUKI, R.; KOBAYASHI, T.; ITO, H.; IKEDA, Y.; et al. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 291, p. 886-893, 2006.