

EFEITOS COMPORTAMENTAIS DECORRENTES DA ADMINISTRAÇÃO DE BOLDINA EM RATOS *Wistar* SUBMETIDOS À HEMORRAGIA INTRACEREBRAL

LOUREIRO, Kamila F.¹; CORDEIRO, Marcos F.²; LUZ, Débora C.²; BARROS, Daniela M.³; HORN, Ana P.⁴

¹Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas/Programa de Pós graduação em Fisiologia Animal Comparada; ²Universidade Federal do Rio Grande, Ciências Biológicas – Bacharelado; ³Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Farmacologia; ⁴Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Morfologia.

Correios eletrônicos: kamila-loureiro@hotmail.com; marfcord@gmail.com; decacamacho@gmail.com; barrosdm@yahoo.com.br; anapaulahorn@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

A hemorragia intracerebral (HIC) possui alta taxa de morbidade e mortalidade, correspondendo a 15-20% das mortes por isquemia no mundo (XI et al., 2006). Estima-se que sua incidência na população mundial seja de 10-30 a cada 100.000 habitantes. Suas principais causas são a hipertensão, as angiopatias amilóides, os aneurismas e a presença de tumores cerebrais. Apesar dos constantes esforços e de ensaios pré-clínicos promissores (QURESHI et al., 2009), até o momento apenas tratamentos sintomáticos estão disponíveis, fazendo com que a busca de novas alternativas terapêuticas faça-se necessária. Nesse contexto, a busca de compostos com propriedades neuroprotetoras é uma ferramenta promissora (KATSUKI, 2010).

A boldina, (S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-aporfina, é o principal alcalóide presente nas folhas e casca de *Peumus boldus* Molina, uma árvore da família Monimiaceae, também conhecida como boldo-do-Chile. Embora presente em menor quantidade, a boldina também ocorre em várias outras espécies das famílias Monimiaceae, Magnoliaceae e Lauraceae (O'BRIEN et al., 2005).

A observação de que a boldina possui uma baixa toxicidade em mamíferos (SPEISKY & CASSELS, 1994), aliada ao fato de ela ser um potente antioxidante (SPEISKY & CASSELS, 1994) e apresentar propriedades neuroprotetoras (HORN et al., manuscrito submetido), a torna candidata a apresentar efeito protetor na morte celular, edema e inflamação desencadeados pela HIC.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Foram utilizados ratos da colônia *Wistar* machos, com peso entre 200 e 250 g. Os animais foram mantidos em biotério sob condições padrão, até cinco animais por caixa e água e comida *ad libitum*. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos experimentais: controle (Ctl), colagenase (Col), colagenase + boldina 25 mg/Kg (Col+B25), colagenase + boldina 50 mg/Kg (Col+B50) e colagenase + boldina 75mg/Kg (Col+B75).

Após uma semana de aclimação no biotério, os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/Kg) e xilasina (60 mg/Kg) intraperitoneal (IP) para submissão à cirurgia estereotáxica. A HIC foi induzida por injeção de colagenase tipo VII (Sigma) no estriado esquerdo do animal, conforme o método

proposto por Rosenberg e colaboradores, com algumas adaptações (ROSENBERG et al., 1990; KIM et al., 2007). Este procedimento foi adotado nos animais de todos os grupos experimentais, exceto aos pertencentes ao grupo Ctl, nos quais foi administrado tampão fosfato (*phosphate buffered saline* (PBS)). O momento do término da cirurgia indica a hora zero.

Na hora quatro (quatro horas após a cirurgia estereotáxica) os animais foram submetidos a injeção IP de PBS (ratos dos grupos Ctl e Col) ou de boldina em concentrações de 25 mg/Kg, 50 mg/Kg ou 75 mg/Kg (nos animais dos grupos Col+B25, Col+B50 e Col+B75, respectivamente), conforme representado na Tab. 1. A collagenase VII e a boldina foram ambas administradas dissolvidas em volumes de PBS iguais àqueles administrados ao grupo Ctl.

Tabela 1 – Caracterização dos grupos experimentais.

Grupo	Cirurgia estereotáxica	Injeção IP
Ctl	PBS (2 µl) Colagenase VII (0,23 U)	PBS (0,5 mL)
Col		
Col+B25		Boldina (25 mg/Kg)
Col+B50		Boldina (50 mg/Kg)
Col+B75		Boldina (75 mg/Kg)

A precisão motora dos animais foi avaliada pelo teste de motricidade em grade nas horas 24 e 96, sendo analisada a porcentagem de erros de motricidade nos lados ipsilateral e contralateral à lesão. O teste consiste em posicionar o animal sobre uma tela metálica com aberturas de 3,0 cm e contar o número de falhas em apoiar-se sobre a grade com o lado direito e esquerdo do corpo. A atividade locomotora dos animais foi avaliada pelo teste de campo aberto, ocorrido na hora 48. Nesta tarefa, o rato é posto no interior de uma caixa de fundo quadriculado o número de cruzamentos de um quadrado para outro é contado. Foi também realizado o teste de medo condicionado contextual, a fim de avaliar possíveis déficits de memória. No treinamento, ocorrido na hora 72, os animais foram introduzidos em uma caixa de fundo metálico, onde permaneceram por três minutos, para aclimação. Após este período, foram induzidos três choques elétricos de 0,7 mA em suas patas em intervalos de 15 segundos. Passados os três choques, os animais foram mantidos mais dois minutos na caixa e retirados. Vinte e quatro horas depois do treinamento, os animais foram colocados novamente na caixa durante cinco minutos – desta vez, porém, sem indução de choques. Neste dia, foi contado o número de *freezings*. O cronograma de atividades está representado pela Tab. 2.

Tabela 2 – Cronograma das atividades.

Hora zero	Hora 4	Hora 24	Hora 48	Hora 72	Hora 96
Cirurgia estereotáxica	Injeção IP	Teste de motricidade em grade	Campo aberto	Medo condicionado (treinamento)	Teste de motricidade em grade e medo condicionado (teste)

Os resultados dos testes comportamentais foram testados para sua normalidade e após analisados estatisticamente através de ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de motricidade em grade executado na hora 24 puderam ser observadas diferenças significativas entre a porcentagem de erros motores cometidos pelo lado ipsilateral e contralateral em animais de todos os grupos onde a injeção intracerebral de colagenase VII fez-se presente. Conforme esperado em modelos hemorrágicos, a maior parte dos erros sempre foi cometida por membros do lado contralateral à lesão (Fig. 1a). No teste da hora 96, porém, foi observada melhora significativa em animais dos grupos com maiores doses de boldina, Col+B50 e Col+B75 (Fig. 1b), o que sugere que, a longo prazo, a boldina é capaz de reverter o dano decorrente da HIC.

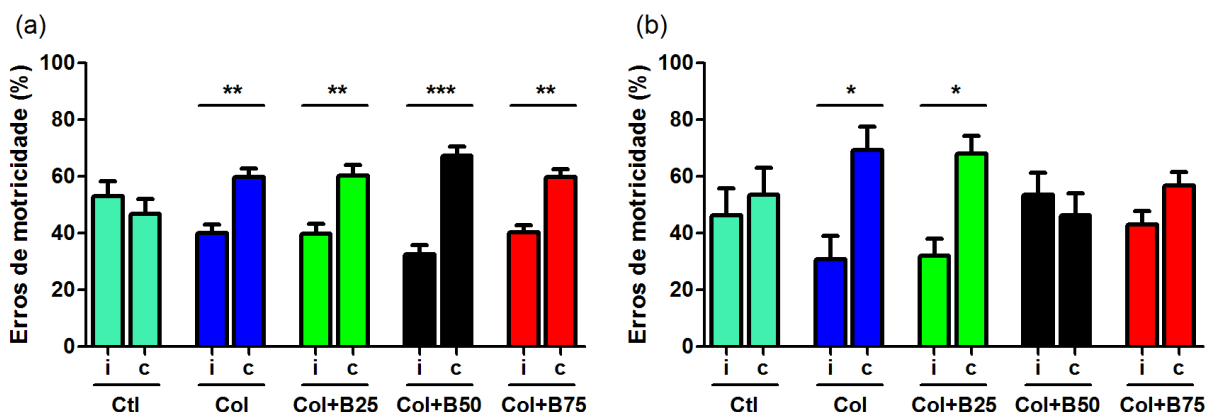


Figura 1 – Testes de motricidade em grade nas horas 24 e 96 após a lesão. Na hora 24 (a) pode-se observar que em todos os grupos, salvo o Ctl, houve uma forte tendência em cometer mais erros de motricidade com o lado contralateral (c) que com o lado ipsilateral (i) (n=12-15, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$). Na hora 96, porém, esta tendência manteve-se apenas nos grupos Col e Col+B25, tendo sido revertida nos grupos Col+B50 e Col+B75 (n=8-10, *= $p < 0,05$).

A atividade locomotora dos animais do grupo Col, conforme esperado, reduziu-se significativamente em comparação àquela dos pertencentes ao grupo Ctl. Nos grupos onde foram administradas as maiores doses de boldina, Col+B50 e Col+B75 foi observada diferença significativa na atividade locomotora em comparação com o grupo Col, tendo sido seus resultados próximos aos do grupo Ctl (Fig. 2), o que indica novamente que a boldina, nas doses mais elevadas, pode ter revertido o dano causado pela hemorragia.

Não foram observadas quaisquer diferenças significativas nos resultados do teste de medo condicionado (Fig. 3), indicando que a boldina não possui influência no aprendizado e que a lesão não se estendeu ao hipocampo dos animais, ligado à memória espacial e associativa.

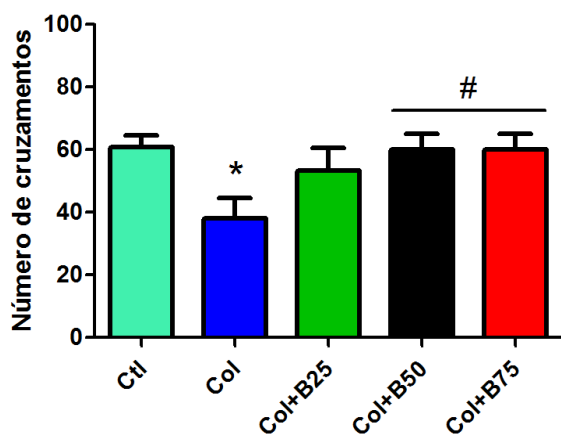


Figura 2 – Teste em campo aberto. O “*” indica diferença significativa em relação ao grupo Ctl, enquanto o “#” simboliza diferença significativa com relação ao grupo Col (*, #= $p < 0,05$, $n = 17-20$).

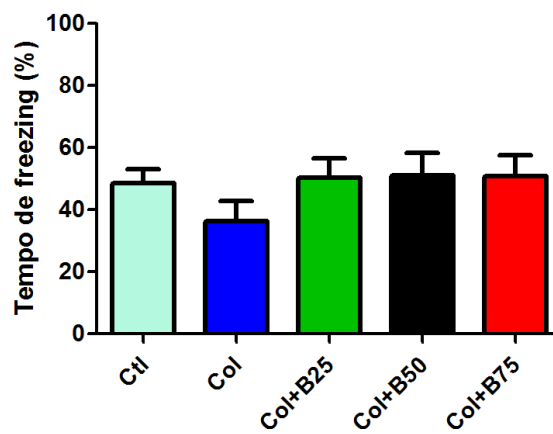


Figura 3 – Teste de medo condicionado contextual. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos resultados obtidos nesse teste. ($n = 11-15$)

4 CONCLUSÃO

Os resultados sustentam que a boldina é eficaz na reversão do déficit motor de ratos submetidos à hemorragia intracerebral. Isto a torna uma candidata relevante para mais estudos que tenham como objetivo focar em possíveis fármacos com propriedades neuroprotetoras.

5 AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi realizado com apoio financeiro da FAPERGS, do CNPq e do PDE/FURG.

6 REFERÊNCIAS

- HORN AP, COMIRAN R, GERHARDT D et al. Boldine prevents the damage caused by oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. Manuscrito submetido.
- KATSUKI H. Exploring neuroprotective drug therapies for intracerebral hemorrhage. **J Pharmacol Sci**. v. 114, n. 4, p. 366-378, 2010.
- KIM, JM, LEE, ST, CHU K et al. Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model. **Brain Res**, v. 1183, p.43-50, 2007.
- O'BRIEN P, CARRASCO-POZO C & SPEISKY H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. **Chem Biol Interact**, v. 159, n. 1, p.1-17, 2005.
- QURESHI A, MENDELOW D & HANLEY D. Intracerebral Haemorrhage. **Lancet**, v. 373, n. 9675, p. 1632-1644, 2009.
- ROSENBERG G, MUN-BRYCE S, WESLEY M et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in the rat. **Stroke**, v. 21, n. 5, p. 801-807, 1990.
- SPEISKY H & CASSELS B. Boldo and boldine: an emerging case of a natural drug development. **Pharmacol Res**, v. 29, n. 1, p. 1-12, 1994.
- XI G, KEEP R & HOFF J. Mechanisms of brain injury after intracerebral hemorrhage. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 1, p. 53-63, 2006.