



EFEITO DO RESVERATROL SOBRE PARÂMETROS ASTROCÍTICOS E PERMEABILIDADE DE BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA NO MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁCIDO VALPROICO

Marília Körbes Rockenbach^{1,2,3}, Iohanna Deckmann^{1,2,3}, Júlio Santos-Terra^{1,2,3}, Mellanie Fontes-Dutra^{1,2,3}, Carmem Gottfried^{1,2,3}

¹ Laboratório de Plasticidade Neuroglial, Departamento de Bioquímica, UFRGS; ² Grupo de Estudos Translacionais em Transtorno do Espectro Autista (GETTEA), UFRGS; ³ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Neuroimunomodulação (INCT-NIM), Instituto Oswaldo Cruz.



INTRODUÇÃO

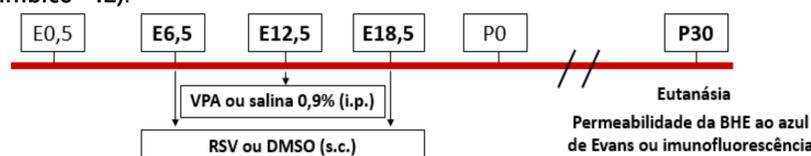
O **Transtorno do espectro autista (TEA)** é caracterizado por prejuízos na comunicação e interação social e por comportamentos repetitivos e interesses restritos [1]. Embora sua etiologia seja desconhecida, sabe-se da importância de fatores genéticos e ambientais, como a exposição ao antiepiléptico **ácido valproico (VPA)** durante a gestação [2]. Além das questões comportamentais, uma alteração clínica de interesse é o aumento do volume encefálico nos primeiros anos de vida [3]. Dessa forma, a **barreira hematoencefálica (BHE)** se torna um importante alvo de estudo, bem como os **astrócitos** e os canais de água **aquaporina (AQP)**, principalmente **AQP4**, presente em maior densidade em pés astrocíticos, em torno do vaso sanguíneo. O **resveratrol (RSV)** é uma molécula anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetora [4] conhecida por prevenir comportamentos sociais no modelo VPA de autismo [5].

OBJETIVOS

Avaliar os efeitos do VPA sobre a permeabilidade da BHE, sobre os astrócitos e sobre a fluorescência de AQP4 no córtex pré-frontal medial (CPFm) de ratos machos de 30 dias e o possível efeito protetivo do RSV.

METODOLOGIA

Ratas *Wistar* prenhes (CEUA-HCPA 130047) foram separadas em 4 grupos experimentais (Controle, RSV, VPA e RSV+VPA), de acordo com o tratamento recebido. Foram administradas doses diárias de 3,6 mg/kg de RSV ou DMSO via subcutânea do dia embrionário 6,5 (E6,5) até E18,5 e no dia E12,5 foi administrada uma dose intraperitoneal de 600 mg/kg de VPA ou solução salina (0,9%) [5]. No dia pós-natal 30 (P30) os animais foram eutanasiados após sobredose anestésica e o encéfalo foi removido e seccionado para a análise da **permeabilidade da BHE ao corante azul de Evans** (n=4-7) e para a **imunofluorescência de células GFAP⁺ (astrócitos) e de AQP4** (n=3-4) das camadas superficiais (*up*) e profundas (*down*) de três regiões do CPFm (córtex cingulado – CC, pré-límbico – PrL e infralímbico – IL).



Os animais avaliados para a permeabilidade da BHE ao corante azul de Evans foram injetados via intraperitoneal com uma solução de azul de Evans 2% diluído em salina (4 mg/kg) 2h antes da eutanásia. A análise estatística foi feita por ANOVA de uma via.

RESULTADOS

PERMEABILIDADE DA BHE AO AZUL DE EVANS

Animais do grupo VPA apresentaram maior permeabilidade da BHE ao corante azul de Evans e o RSV preveniu essa alteração (CC e PrL – *up* e *down*: $p < 0.0001$; IL – *up*: $p = 0.0006$; IL – *down*: $p < 0.0001$).

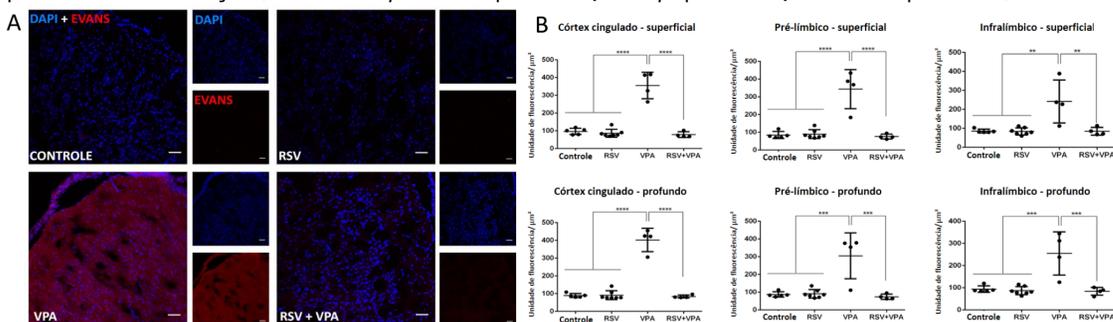


Figura 1: Permeabilidade da BHE ao corante azul de Evans. **A)** Imagens representativas das camadas superficiais do CC, em azul marcação com DAPI, em vermelho fluorescência do azul de Evans. Barra de escala: 50 μ m. **B)** Quantificação da fluorescência do corante azul de Evans nas camadas superficiais e profundas do CC, PrL e IL. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

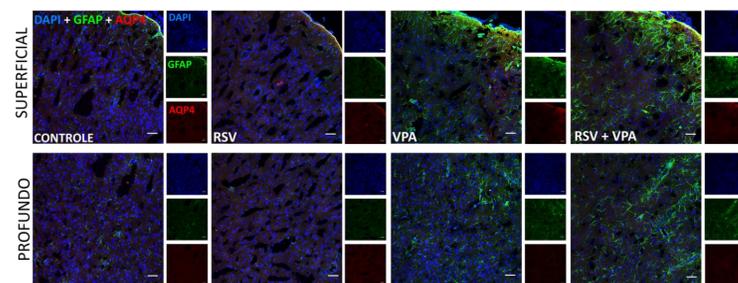
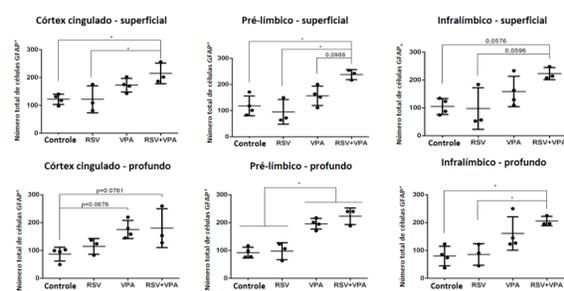


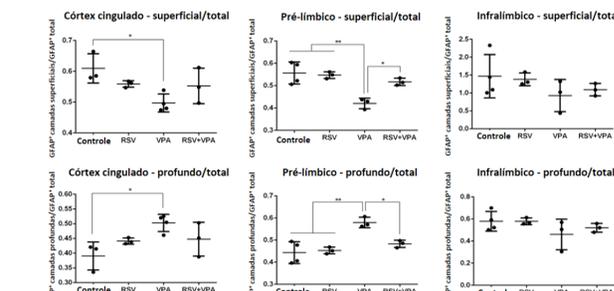
Figura 2: Imagens representativas da fluorescência de astrócitos (verde), AQP4 (vermelho) e DAPI (azul) nas camadas superficiais e profundas do CC. Barra de escala: 50 μ m

Os grupos que receberam VPA apresentaram aumento no **número absoluto de astrócitos** no PrL (*down*), além de um efeito sinérgico do RSV e do VPA no CC (*up*), no PrL (*up*) e no IL (*down*). Na **razão de astrócitos** foi visto um aumento no número relativo nas camadas profundas e uma diminuição nas camadas superficiais do CC e do PrL no grupo VPA e o RSV foi capaz de prevenir essa alteração no PrL. Também foi observado uma diminuição no **conteúdo de fluorescência de AQP4** em todas as regiões analisadas do CPFm no grupo VPA.

A NÚMERO ABSOLUTO DE ASTRÓCITOS



B RAZÃO DE ASTRÓCITOS NAS CAMADAS CORTICAIS



C CONTEÚDO DE FLUORESCÊNCIA DE AQP4

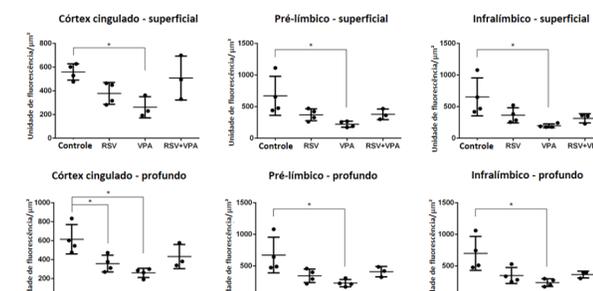


Figura 3: Quantificação de astrócitos e fluorescência de AQP4 no CPFm. **A)** Número de astrócitos no CC, PrL e IL (*up* e *down*). **B)** Razão de astrócitos nas camadas superficiais e profundas em relação ao número total na região. **C)** Quantificação da fluorescência de AQP4 nas mesmas regiões. * $p < 0,05$.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O aumento da permeabilidade da BHE observado no CPFm no grupo VPA é um indicativo de dano na BHE. Para investigar o que poderia estar relacionado com essa alteração foram analisados astrócitos e AQP4. Foi observado um aumento no número absoluto de astrócitos no PrL (*down*) nos grupos que receberam VPA e um efeito sinérgico do RSV e do VPA no CC (*up*), no PrL (*up*) e no IL (*down*), podendo este efeito estar relacionado com a atuação de ambas as moléculas na cromatina. Na razão de astrócitos foi visto um aumento no número relativo nas camadas profundas e uma diminuição nas camadas superficiais do CC e do PrL no grupo VPA e o RSV preveniu essa alteração no PrL, o que poderia estar associado com a desorganização cortical observada em estudos prévios. Também foi demonstrada uma diminuição na fluorescência de AQP4 no grupo VPA; a AQP4 é importante tanto para a entrada quanto para a saída de água do tecido encefálico, sendo necessários mais estudos para compreender o seu papel no contexto do TEA. O RSV foi capaz de prevenir o aumento da permeabilidade da BHE e apresentou diferentes efeitos nas outras análises, demonstrando ser uma importante ferramenta no estudo de mecanismos que possam estar envolvidos na fisiopatologia do TEA.

AGRADECIMENTOS

REFERÊNCIAS