

## AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À PROLIFERAÇÃO CELULAR E NEUROGÊNESE ADULTA NO TECIDO CEREBRAL DE RATOS ISQUÊMICOS APÓS O TRATAMENTO COM CANABIDIOL

Bianca Andretto de Mattos (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Erika Meyer, Humberto Milani,  
Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira (Orientador)

E-mail: rmmwoliveira@uem.br

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

### Farmacologia – Neuropsicofarmacologia

**Palavras-chave:** canabidiol, isquemia cerebral global e transitória, imunohistoquímica.

### Resumo:

A isquemia cerebral global e transitória (ICGT) é um resultado imediato e grave da parada cardíaca reversível. Os pacientes isquêmicos que sobrevivem à parada cardíaca podem desenvolver uma síndrome neuropsicológica que consiste em disfunção cognitiva e executiva, além de impedimentos sensoriais e motores. Canabidiol (CBD), um dos componentes não-psicotomiméticos da *Cannabis sativa*, exerce efeitos neuroprotetores em uma gama de distúrbios neuropsiquiátricos. CBD atenua a neurodegeneração em condições isquêmicas, e também apresenta efeitos antidepressivos e antipsicóticos em animais. Além disso, o CBD estimula a plasticidade sináptica e facilita o processo da neurogênese hipocampal. O presente estudo teve por objetivo avaliar a expressão de proteínas relacionadas à proliferação celular e neurogênese adulta no encéfalo de ratos submetidos à ICGT e tratados durante 14 dias com CBD. Foram realizados ensaios de imunohistoquímica para detecção de imunoreatividade para os marcadores de proliferação celular e neurogênese (NeuN, BDNF, Sinaptofisina e PSD-95) no hipocampo. Após a quantificação e análise dos resultados foi observado que o CBD atenuou a morte neuronal e restaurou os níveis da PSD-95 no hipocampo de ratos com ICGT.

### Introdução

A maior parte dos efeitos cognitivos e comportamentais, decorrentes do uso da maconha, ocorre por ações de compostos ativos encontrados na planta, denominados fitocanabinóides (Mechoulam et al., 2002). O CBD, constitui um fitocanabinóide não psicotomimético presente em grande quantidade na *Cannabis sativa* (Mukhopadhyay et al., 2011). Do ponto de vista terapêutico, o CBD apresentou propriedades anticonvulsivantes tanto em animais como em humanos com epilepsia (Mechoulam et al., 2002). CBD age também como agente neuroprotetor capaz de retardar a progressão de sintomas típicos da doença de Huntington em um modelo que simula esta doença em ratos (Sagredo et al., 2011). Além disso, o CBD tem potencial terapêutico em uma ampla gama de distúrbios psiquiátricos, como a ansiedade, a depressão e a psicose.

A isquemia cerebral caracteriza-se pela redução aguda ou crônica do fluxo sanguíneo cerebral (FSC), ocorrendo mediante dois mecanismos principais: oclusão de uma artéria cerebral (*stroke* ou acidente vascular cerebral - AVC), que leva a

redução do FSC em uma específica região cerebral e, parada cardíaca, com redução global do FSC. Em ambas as situações, disfunções neuropsicológicas e déficits de memória, são as principais consequências observadas no paciente, o que leva a incapacitação, dificuldade de reintegração psicossocial/vocacional e necessidade de maiores cuidados em saúde (Fernandes et al., 2008). Um número considerável de estudos pré-clínicos demonstraram que o CBD pode fornecer neuroproteção contra danos cerebrais agudos ou crônicos decorrentes da isquemia cerebral. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares da ação neuroprotetora do CBD ainda não são conhecidos.

Esse trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do tratamento com o CBD sobre a expressão de diferentes proteínas cerebrais relacionadas a plasticidade sináptica, após a indução da ICGT em ratos e também observar se a administração de 14 dias de CBD em ratos isquêmicos aumenta a expressão de neurônios maduros na ZSG do GD. Utilizou-se a imunohistoquímica para a detecção de *Neuronal Specific Protein* (NeuN), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) e *post synaptic density-95 protein* (PSD-95) no hipocampo de ratos isquêmicos. NeuN consiste em uma proteína nuclear solúvel que está localizada no núcleo da célula e no citoplasma de neurônios pós-mitóticos. No cérebro adulto, NeuN, pode ser utilizado na análise de diferenciação celular para identificação de neurônios maduros (Lind et al., 2005), uma vez que células não-neuronais não se coram com esse marcador. O *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) por sua vez, atua como fator trófico que estimula a neurogênese e plasticidade sináptica, e está relacionado com a diferenciação e crescimento neuronal, além de fortalecimento das sinapses. A sinaptofisina é uma glicoproteína integral da membrana de vesículas pré-sinápticas que está presente em células neuroendócrinas e nos neurônios do cérebro e medula espinhal, nos terminais pré-sinápticos e indica a integridade destes terminais. A *Post synaptic density-95 protein* (PSD-95) está localizado pós-sinápticamente nas sinapses excitatórias e está relacionado à promoção da estabilidade nas sinapses, principalmente em neurônios jovens. A PSD-95 pode estar associada a aceleração da maturação sináptica por meio da regulação coordenada de receptores de glutamato pós-sinápticos do tipo AMPA.

## Materiais e métodos

O tecido utilizado provém do trabalho de doutorado em andamento da aluna Erika Meyer. Foram utilizados ratos, e esses animais submetidos ao modelo de ICGT e tratados durante 14 dias com CBD. Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Universidade Estadual de Maringá.

Os encéfalos foram divididos em três grupos experimentais:

- (i) grupo sham (controle, falso operado) tratado com veículo – sham+vei
- (ii) grupo isquêmico tratado com veículo – isq+vei
- (iii) grupo isquêmico tratado com CBD 10 mg/Kg – isq+CBD

Para a avaliação da proliferação, neurogênese e neurodegeneração utilizamos a detecção imunohistoquímica de NeuN, após a técnica foram quantificadas de 7-8 secções por animal. O número de células NeuN-positivas foi normalizado pela área (em  $\mu\text{m}^2$ ) da região quantificada. Também foi realizado *Western Blotting* para BDNF, Sinaptofisina e PSD-95 e as bandas foram visualizadas com auxílio do Chemi-doc (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA), e posteriormente quantificadas por

densidade óptica integrada (DOI) usando o software Image J (NIH, Bethesda, MD, USA).

## Resultados e Discussão

Conforme figura 1, células NeuN-imunorreativas (IR) foram quantificadas na região CA1 do hipocampo, 15 dias após a ICGT. A ANOVA detectou uma diferença entre os grupos ( $F_{2,15} = 4,983$ ,  $p = 0,02$ ). O grupo isquêmico+veículo apresentou diminuição da DOI da NeuN-IR em relação ao grupo Sham ( $p < 0,05$ ). Embora tenha ocorrido um aparente aumento na quantidade de células NeuN-IR, o grupo isq+CBD não atingiu valores estatisticamente significantes. Quanto aos níveis de BDNF (figura 2), a ANOVA não mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais ( $F_{2,14} = 2,19$ ,  $p = 0,16$ ). Os níveis de Sinaptofisina no hipocampo também não foram diferentes entre os grupos, conforme mostrado pela ANOVA ( $F_{2,14} = 2,94$ ,  $p = 0,09$ ). Como mostrado na figura 3, a ANOVA evidenciou diferença significativa entre os grupos experimentais em relação aos níveis de PSD-95 no hipocampo de ratos ( $F_{2,14} = 6,49$ ,  $p = 0,012$ ). O grupo sham+veículo foi diferente do grupo isq+veículo ( $p < 0,05$ )

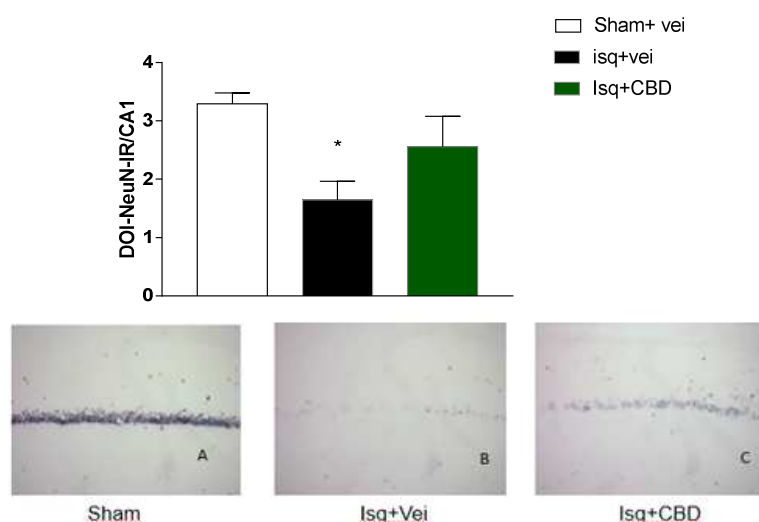


Figura 1 – Tratamento repetido (14 dias) com o CBD 10 mg/kg, atenua a neurodegeneração hipocampal causada pela TGCI em ratos. O gráfico mostra os resultados da densidade óptica integrada obtida em animais sham e isquêmicos (Isq). As colunas representam as médias e as barras os erros padrões das médias (EPM), dos grupos experimentais. (A-C) Células NeuN-IR na região CA1 do hipocampo de ratos. Fotomicrografias representativas de células NeuN-positivas. Isq+vei=Isquêmico tratado com veículo, Isq+CBD = Isquêmico tratado com canabidiol. \* $p < 0,05$  (ANOVA seguida do teste de Tukey).

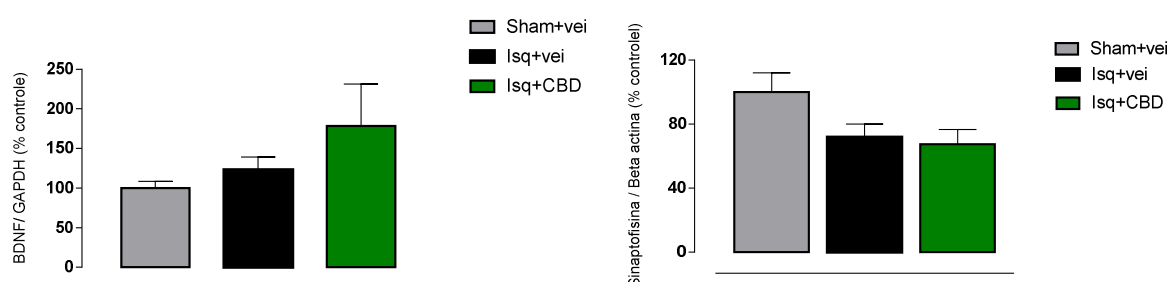


Figura 2 – Tratamento repetido com CBD não alterou os BDNF ou Sinaptofisina no hipocampo dos animais isquêmicos. As colunas representam as médias e as barras os erros padrões das médias (EPM), dos grupos experimentais.

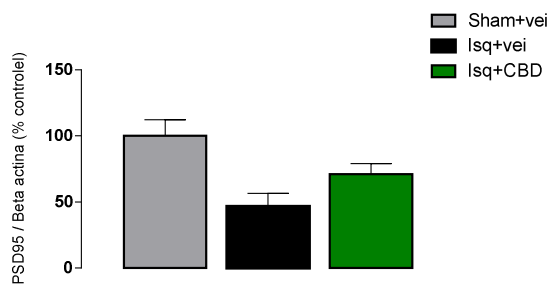


Figura 3 – Tratamento repetido com CBD restaura os níveis de PSD95 em animais com isquemia cerebral. As colunas representam as médias e as barras os erros padrões das médias (EPM), dos grupos experimentais. \* $p < 0.05$  (ANOVA seguida do teste de Tukey).

## Conclusões

O CBD promoveu atenuação da morte neuronal e restaurou os níveis da PSD-95 no hipocampo de ratos com ICGT.

## Agradecimentos

UEM, CNPq, Fundação Araucária e CAPES.

## Referências

Mechoulam R, Parker LA, Gallily R. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol*; 42:11-19; 2002.

Mukhopadhyay P, Rajesh M, Horváth B, Bátkai S, Park O, Tanchian G, Gao RY, Patel V, Wink DA, Liaudet L, Haskó G, Mechoulam R, Pacher P. Cannabidiol protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammatory signaling and response, oxidative/nitrative stress, and cell death. *Free Radic Biol Med*; 50(10):1368-1381; 2011.

Sagredo O, Pazos MR, Satta V, Ramos JA, Pertwee RG, Fernández-Ruiz J. Neuroprotective effects of phytocannabinoid-based medicines in experimental models of Huntington's disease. *J Neurosci Res*; 89(9):1509–1518; 2011.

Fernandes JS, Mori MA, Ekuni R, Oliveira RM, Milani H. Long-term treatment with fish oil prevents memory impairments but not hippocampal damage in rats subjected to transient, global cerebral ischemia. *Nutr Res*; 28(11):798-808; 2008.

Lind D, Franken S, Kappler J, Jankowski J, Schilling K. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res*; 79(3):295–302; 2005.