

EFEITOS DO CANABIDIOL SOBRE A INJÚRIA DA MATÉRIA BRANCA EM CAMUNDONGOS COM ISQUEMIA CEREBRAL

Luiz Otávio Versari (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Humberto Milani (Orientador), e-mail: hmilani@uem.br

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

Área: Farmacologia / Subárea: Neuropsicofarmacologia

Palavras-chave: isquemia cerebral, matéria branca, camundongos machos

Resumo:

A isquemia cerebral representa uma causa importante de morbidade e mortalidade na população mundial, constituindo um problema de saúde global. Disfunções neurológicas incluem prejuízos cognitivos, motores e sensoriais associados a lesões do hipocampo, matéria branca (MB) e da barreira hematoencefálica (BHE). Estudos apontam um efeito protetor do canabidiol (CBD) em diferentes patologias neurodegenerativas, inclusive isquemia cerebral. O CBD resulta em efeito protetor sobre os neurônios e células da glia, previne a morte celular por necrose e apoptose. Entretanto, as propriedades neuroprotetoras do CBD, sobretudo sobre a MB, demandam estudos pré-clínico adicionais. Neste projeto de iniciação científica objetivamos avaliar 1º.) como varia o grau de lesão da MB quando avaliado em diferentes tempos pós-isquemia (1, 3 e 7 dias), e 2º.) com base em tais resultados, avaliar o efeito do CBD sobre a lesão da MB. Microfotografias representativas das regiões de interesse (corpo caloso e trato óptico) mostram um desarranjo estrutural da MB (rarefação das fibras e presença de vacúolos) mais intenso no corpo caloso dos grupos com 1 e 3 dias de sobrevivência. A quantificação da lesão por densidade óptica integrada (IOD, *integrated optical density*) deverá confirmar os resultados da análise qualitativa. O tempo pós-isquemia com maior expressão da lesão será utilizado para avaliação dos efeitos do CBD.

Introdução

Isquemia cerebral global (ICG) é uma manifestação comum que resulta mais frequentemente de uma parada cardíaca reversível, e possui grande impacto socioeconômico global devido à lesão cerebral e consequente incapacitação funcional. (FLYNN et al., 2008, GERI et al., 2014). A substância branca cerebral (MB) ocupa quase 40% do volume total do cérebro humano, e desempenha um papel essencial na transmissão de sinais entre as diversas áreas cerebrais. Portanto, a lesão da MB prejudica a função sensorio-motora e induz graves disfunções comportamentais e cognitivas. Estudos pré-

clínicos mostram que o CBD, o principal constituinte não psicotrópico da *Cannabis sativa* (maconha), possui potencial terapêutico neuroprotetor. Em modelos de isquemia cerebral, observou-se que o CBD reduziu o grau de neurodegeneração, aumentou a taxa de sobrevivência, diminuiu o volume do infarto, e melhorou as funções motora e comportamental (LAFUENTE et al., 2011; SCHIAVON et al., 2014). Recentemente, reportamos que o CBD reduziu, ainda que modestamente, a lesão provocada pela ICG no corpo caloso examinada 21 dias pós-isquemia. Em continuidade aquele estudo, neste projeto objetivamos: 1º.) avaliar o grau de lesão da MB em função do tempo de sobrevida pós-isquemia, e 2º.) com base em tais resultados, avaliar o efeito do CBD sobre a lesão da MB.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados camundongos machos C57/B6J, com 12 semanas de idade, pesando entre 20 e 30g. Os animais foram mantidos em temperatura controlada (22 ± 1 °C) e ciclo de luz claro/escuro (12h), água e ração *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética da UEM (CEUA nº 7995230420)

Cirurgia

A ICG foi induzida pela oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC). Sob anestesia (Isoforine®, Cristália, Itapira-SP, Brasil), uma incisão na parte ventral do pescoço expôs as artérias carótidas comuns, as quais foram ocluídas durante 20 min com auxílio de clips de aneurisma (ADCA, Barbacena, Brasil). Durante a oclusão os animais permaneceram em uma caixa aquecida a 30 ± 2 °C). Ao final, os animais foram anestesiados novamente, os clips removidos e a incisão suturada. Durante as 3 horas seguintes à reperfusão, os animais permaneceram alocados na caixa aquecida. Os animais pertencentes ao grupo Sham foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, menos a oclusão das artérias carótidas.

Coloração de Kluver-Barrera para verificação da integridade da matéria branca

Após 1, 3, 7 ou 21 dias de reperfusão, os animais foram anestesiados e perfundidos transcardiacamente com solução salina tamponada (PBS) heparinizada (5 U/ml). O cérebro foi extraído, transferido para uma solução 30% de sucrose até precipitar no fundo do recipiente, e em seguida armazenados a -20°C. Secções coronais (30 µm de espessura) foram obtidas com o auxílio de um criostato (-20°. C), montadas em lâminas revestidas com gelatina e mantidas a 36°C durante 18 h. Após secagem, as lâminas foram imersas em soluções alcoólicas de concentrações crescentes (álcool 70%, 80% e 95%) e, em seguida, imersas em Luxol fast blue 0,1% por 24 h a 56 °C. O excesso de corante foi removido usando carbonato de lítio 0.05%, etanol 70% e água. Cresil violeta 0.1% foi usado para contra-coloração. O tecido foi desidratado em soluções crescentes de álcool (70% a 100%), clarificadas em xilol durante 5 min e cobertos com Permount® e lamínulas.

Tratamento farmacológico

Esse experimento ficou condicionado aos resultados de decurso temporal dos efeitos da isquemia sobre a integridade da MB. Os animais serão tratados com salina ou CBD (10 mg/kg, i.p.) ao término da isquemia, e subsequentemente nos três primeiros dias pós-isquemia.

Análise Estatística

Análise de variância de uma via (ANOVA) será empregada para análise estatística dos resultados de IOD. Significância estatística será considerada para um valor de $P < 0.05$

Resultados e Discussão

A figura 1 mostra microfotografias do corpo caloso e do trato óptico de camundongos examinados após 1, 3 e 7 dias de isquemia. Comparado ao controle (*sham*), e apesar das diferenças de tonalidade, os cérebros dos animais isquêmicos apresentam uma nítida desestruturação da MB, expressa pela irregularidade das fibras e, principalmente, pela presença de vacúolos. Aparentemente, a intensidade de lesão foi maior no 1º. e 3º. dias pós-isquemia. Também parece haver uma diferença entre o corpo caloso e o trato óptico em resposta à ICG. O grau de lesão da MB será objetivamente estimado pela medida de densidade óptica integral (IOD) e apresentado durante o XXX EAIC.

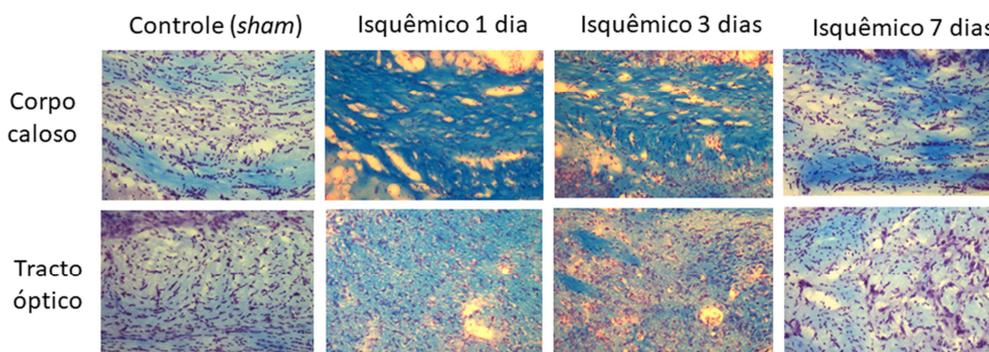


Figura 1. Aspecto da massa branca no corpo caloso e trato óptico evidenciado após coloração de Kluver-Barrera em camundongos examinados 1, 3 e 7 dias após OBACC.

Num estudo anterior deste laboratório a isquemia reduziu em 17% a IOD no corpo caloso medida 21 dias pós-isquemia, efeito este aliviado pelo CBD (10 mg/kg) dado 30 minutos antes, e repetido 3, 24 e 48 horas após a isquemia (MORI et al., 2017). Ainda que estatisticamente significativa ($p = 0.05$), o efeito protetor do CBD sobre a lesão da MB foi modesto naquele estudo (10% aproximadamente). É possível que se examinado mais precocemente em relação a isquemia, o CBD possa mostrar um efeito mais consistente. No presente estudo estamos avaliando o decurso temporal da lesão da MB. Nossa hipótese é que uma lesão mais contundente da MB possa ser detectada nos primeiros dias pós-isquemia. Uma vez determinado qual período de maior lesão, é possível que o efeito do CBD se expresse de modo mais robusto.

Conclusões

Os resultados obtidos até o presente sugerem que a lesão da MB, expressa qualitativamente nas microfotografias, se mostram mais evidente nos tempos de 1 e 3 dias pós-isquemia. Aparentemente, a lesão foi mais intensa no corpo caloso, comparado ao trato óptico. A se confirmar pela medida de IOD, estes tempos de sobrevida serão usados para se testar o efeito do CBD.

Agradecimentos

Universidade Estadual de Maringá, Fundação Araucária, CNPq e CAPES.

Referências

FLYNN, R. W. V.; MACWALTER, R. S. M.; DONEY, A. S. F. The cost of cerebral ischaemia. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 250-256, 2008.

GERI, Guillaume *et al.* Neurological consequences of cardiac arrest: where do we stand?. In: **Annales francaises d'anesthesie et de reanimation**. Elsevier Masson, 2014. p. 98-101.

HAYAKAWA, Kazuhide *et al.* Cannabidiol prevents a post-ischemic injury progressively induced by cerebral ischemia via a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 8, p. 1280-1286, 2008.

LAFUENTE, Hector *et al.* Effects of cannabidiol and hypothermia on short-term brain damage in new-born piglets after acute hypoxia-ischemia. **Frontiers in neuroscience**, v. 10, p. 323, 2016.

MORI, Marco Aurélio *et al.* Cannabidiol reduces neuroinflammation and promotes neuroplasticity and functional recovery after brain ischemia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 75, p. 94-105, 2017.

SCHIAVON, Angélica Pupin *et al.* Protective effects of cannabidiol against hippocampal cell death and cognitive impairment induced by bilateral common carotid artery occlusion in mice. **Neurotoxicity research**, v. 26, n. 4, p. 307-316, 2014.