

## EFEITOS DO CANABIGEROL SOBRE A QUEBRA DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA EM CAMUNDONGOS COM ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL E TRANSITÓRIA

Luís Fernando Fernandes Miranda (PIBIC/CNPq/UEM), Cristiano Correia Bacarin (Coorientador), Humberto Milani (Orientador). E-mail: hmilani@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR

**Área e subárea do conhecimento:** Farmacologia /Neuropsicofarmacologia.

**Palavras-chave:** Neuroproteção; Canabigerol; Barreira Hematoencefálica.

### RESUMO

O prejuízo cognitivo e a neurodegeneração são as principais consequências da isquemia cerebral, tal como ocorre durante uma parada cardíaca reversível. A ausência de fluxo sanguíneo para o tecido nervoso desencadeia uma série de eventos fisiopatológicos que afetam o funcionamento neuronal, como excitotoxicidade, estresse oxidativo e neuroinflamação. Conjuntamente, esses eventos provocam alterações morfológicas, como quebra da barreira hematoencefálica (BHE) e ativação glial, além de necrose e apoptose neuronal. Poucas são as estratégias terapêuticas em casos de isquemia cerebral, como o ativador do plasminogênio tecidual. Em vista disso, faz-se necessário a prospecção de estratégias com potencial terapêutico no futuro. O canabigerol (CBG), um fitocanabinoide não psicoativo, vem sendo estudado com relação aos possíveis efeitos terapêuticos, chamando a atenção a atividade anti-inflamatória e neuroprotetora demonstrada em estudos preliminares. O presente estudo tem por objetivo analisar os efeitos do CBG sobre a quebra da BHE após isquemia cerebral global e transitória (ICGT) em camundongos. Para tanto, os animais foram submetidos ao modelo de oclusão bilateral da artéria carótida comum (OBACC) e, após 7 dias, a quebra da BHE foi avaliada por meio da técnica de extravasamento do corante azul de Evans. Os animais foram tratados com CBG nas doses de 1, 5 ou 10 mg/kg, durante 7 dias, com início do tratamento 1 h após a OBACC. O CBG na dose de 5 mg/kg, mas não nas doses de 1 ou 10 mg/kg, impediu a quebra da BHE analisada 7 dias pós-isquemia.

### INTRODUÇÃO

A isquemia cerebral, uma condição clínica grave, desencadeia uma série de eventos patológicos, incluindo excitotoxicidade, estresse oxidativo e resposta inflamatória, que culminam em morte neuronal, danos à substância branca e quebra da barreira hematoencefálica (BHE) (Moskowitz *et al.*, 2010). Esses eventos contribuem significativamente para a morbimortalidade associada a essa condição. A isquemia cerebral global e transitória (ICGT), frequentemente desencadeada por eventos como a parada cardiorrespiratória, resulta em lesões cerebrais difusas,

comprometendo diversas funções cognitivas e motoras. A ruptura da barreira hematoencefálica, uma estrutura essencial para a proteção do tecido neural, é um evento comum nesse contexto. A perda da integridade dessa barreira permite a entrada de substâncias tóxicas e células inflamatórias no parênquima cerebral, amplificando a lesão e dificultando a recuperação funcional (Candelario-Jalil *et al.*, 2022). O canabigerol (CBG) emergiu como um potencial agente neuroprotetor, demonstrando propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras. Ao reduzir a produção de interleucina-6 (IL-6), um mediador inflamatório chave liberado por astrócitos, o CBG contribuiu para a manutenção da integridade da barreira hematoencefálica em culturas de células constituintes da BHE (Stone *et al.*, 2021). Seus efeitos podem estar relacionados à modulação de receptores como o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ), um mecanismo compartilhado com o canabidiol (CBD). No entanto, diferentemente do CBD, o CBG pode apresentar antagonismo aos receptores de serotonina 1A (5-HT $1A$ ), sugerindo um perfil farmacológico distinto. O objetivo desse estudo foi avaliar se o CBG protege contra a quebra da BHE num modelo *in vivo* de ICGT.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Animais:** Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos que permaneceram em condições padrões de alojamento. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos sob a autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA, nº 4320080223).

**Isquemia Cerebral:** A isquemia cerebral global transitória foi induzida pela técnica de oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC) sob anestesia com uma mistura de isoflurano/oxigênio. Uma incisão na porção ventral do pescoço expôs as artérias carótidas comuns as quais foram ocluídas por 20 minutos com cliques de aneurisma. Após a remoção dos cliques, as artérias foram inspecionadas quanto à patência de reperfusão e a incisão foi suturada. Nos animais Sham (falso-isquêmicos) as artérias carótidas foram expostas, mas não ocluídas.

**Tratamento Farmacológico:** O CBG foi dissolvido em Tween 80 1% em solução salina estéril (veículo). Os animais foram aleatoriamente designados para receber injeções intraperitoneais (ip.) de veículo ou CBG nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg durante 7 dias após a ICGT.

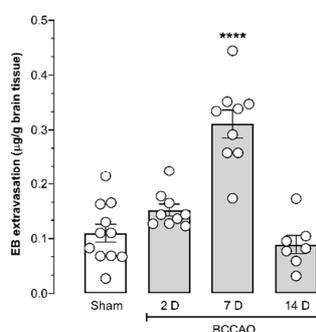
**Determinação da Quebra da Barreira:** A permeabilidade da BHE foi medida por extravasamento de corante azul de Evans (AE) administrado por via i.p. (4 ml/kg). Após 8 horas, procedeu-se a perfusão transcardíaca de solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M para remover o restante do corante AE intravascular. O cérebro (exceto cerebelo e tronco encefálico) foi pesado e homogeneizado com igual volume de ácido tricloroacético em etanol (1:3) e incubado por 24 h. O material foi centrifugado e o sobrenadante, bem como os padrões (0, 0,08, 0,16, 0,32 0,65, 1,25, 2,50 e 5,00  $\mu$ g/ml de AE) foram detectados por um leitor de microplacas Asys Expert Plus. O conteúdo de AE foi calculado de acordo com a curva padrão e representado como extravasamento do corante ( $\mu$ g/g de tecido cerebral).

**Estatística:**

O software SAS 9.4 foi utilizado para análise estatística dos resultados. O teste de D'Agostino-Pearson e o teste de Levene foram usados para avaliar a distribuição Gaussiana e a homogeneidade de variâncias, respectivamente. A ANOVA de uma via foi utilizada para verificar a diferença entre os grupos (tratamentos). O nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ) foi adotado.

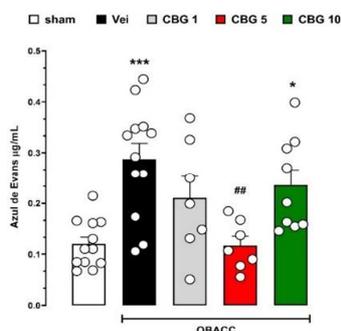
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 ilustra o extravasamento de AE nos tempos de 2 e 7 dias pós-isquemia, visando determinar o decurso temporal da quebra da BHE. Um extravasamento marcante de AE ocorreu no grupo OBACC com 7 dias de sobrevivida pós-isquemia, comparado aos grupos Sham e OBACC 2 dias ( $F_{2, 24} = 29,23$ ;  $p < 0,0001$ ), indicando a quebra da BHE.



**Figura 1** – Decurso temporal da quebra da BHE após OBACC. O extravasamento do AE foi detectado nos animais nos intervalos de 2, 7 e 14 dias após a isquemia cerebral. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos diferentes grupos. \*\*\* $p < 0,0001$  vs. Sham.

Utilizando o decurso temporal de 7 dias, a figura 2 mostra os efeitos de diferentes doses de CBG sobre a quebra da BHE. Comparado ao veículo, o CBG na dose de 5 mg/Kg impediu o extravasamento do AE ( $F_{4, 42} = 7,651$ ;  $p = 0,0001$ ). Essa Porém, nas doses de 1 mg/Kg e 10 mg/Kg de CBG não foi observado qualquer efeito protetor sobre a BHE quando comparados ao grupo OBACC + Vei ( $p > 0,05$ ), o que indica um efeito dose-dependente do CBG sobre a quebra da BHE.



**Figura 2** – Efeitos do tratamento com CBG sobre a quebra da BHE medida 7 dias após OBACC. As barras representam a média  $\pm$  EPM. \*\*\* $p < 0,001$  vs. sham; \* $p < 0,05$  vs. Sham; ## $p < 0,01$  vs. OBACC + Vei.

O presente estudo indica uma ação protetora do CBG contra a quebra da BHE provocada pela isquemia cerebral em camundongos. A quebra da BHE pode estar associada à intensa neuroinflamação que ocorre durante a fase aguda da isquemia cerebral (Candelario-Jalil *et al.*, 2022). Em modelo *in vitro* de isquemia em cultura de células que constituem a BHE observou-se que o CBG protegeu contra as lesões celulares, possivelmente por mecanismos distintos, tais como redução de IL-6, lactato desidrogenase e proteínas de dano ao DNA, incluindo a p53 (Stone *et al.*, 2021).

## CONCLUSÕES

O presente estudo demonstra que o tratamento com CBG foi capaz de amenizar a quebra da BHE em um modelo de isquemia cerebral em camundongos, sugerindo seu potencial como terapia para o tratamento de doenças cerebrovasculares. A prevenção da ruptura da barreira hematoencefálica e a modulação da neuroinflamação emergem como mecanismos chave para os efeitos benéficos do CBG. No entanto, são necessários estudos adicionais para avaliar a eficácia do CBG em diferentes modelos de isquemia e em diferentes estágios da doença, bem como para elucidar seus mecanismos moleculares de ação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pelo financiamento e ao Laboratório de Neuropsicofarmacologia da UEM e aos orientadores.

## REFERÊNCIAS

CANDELARIO-JALIL, E.; DIJKHUIZEN, R. M.; MAGNUS, T. Neuroinflammation, Stroke, Blood-Brain Barrier Dysfunction, and Imaging Modalities. **Stroke**, v. 53, n. 5, p. 1473-1486, 2022.

MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H.; IADECOLA, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. **Neuron**. 2010; 67(2): 181-198.

STONE, N. L.; ENGLAND, T. J.; O'SULLIVAN, S. E. Protective Effects of Cannabidiol and Cannabigerol on Cells of the Blood-Brain Barrier Under Ischemic Conditions. **Cannabis Cannabinoid Res.** 2021; 6(4): 315-326.