

EFEITOS DO CANABIGEROL SOBRE A INJÚRIA DA SUBSTÂNCIA BRANCA EM CAMUNDONGOS COM ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL E TRANSITÓRIA

José Guilherme Pinhatti Carrasco (PIBIC/CNPq/UEM), Cristiano Correia Bacarin (Coorientador), Rubia Maria Monteiro Weffort (Orientador). E-mail: rmmwoliveira@uem.br

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

Área e subárea do conhecimento: Farmacologia /Neuropsicofarmacologia.

Palavras-chave: Neuroproteção; Canabigerol; Substância Branca.

RESUMO

O prejuízo cognitivo e a neurodegeneração são as principais consequências da isquemia cerebral. A ausência de fluxo sanguíneo para o tecido nervoso desencadeia uma série de eventos fisiopatológicos que afetam o funcionamento neuronal, como excitotoxicidade e neuroinflamação. Conjuntamente, esses eventos provocam alterações morfológicas que culminam em morte neuronal e injúria da matéria branca. O canabigerol (CBG) vem sendo estudado com relação a suas propriedades biológicas e possíveis efeitos terapêuticos, chamando a atenção as atividades anti-inflamatória e neuroprotetora demonstrada em estudos preliminares *in vitro* e *in vivo*. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo analisar os possíveis efeitos neuroprotetores do CBG diante de um modelo animal de isquemia cerebral global e transitória. Para tanto, os animais foram submetidos ao modelo de oclusão bilateral da artéria carótida comum (OBACC) e tratados durante 7 dias com duas doses diferentes de CBG, iniciando 1 hora após a OBACC: 1, 5 mg/kg. Quize dias após, os animais foram eutanasiados e os cérebros removidos e processados para a técnica histológica de Kluver-barrera, possibilitando a análise da injúria da matéria branca. Contudo, através da análise da substância branca do corpo caloso nas regiões acima do CA1 do hipocampo e do terceiro ventrículo dorsal, não foi possível evidenciar estatisticamente possíveis efeitos neuroprotetores do CBG.

INTRODUÇÃO

A isquemia cerebral global e transitória (ICGT) ocorre como resultado de uma série de eventos que levam à privação do fluxo sanguíneo cerebral, como parada cardíaca reversível e fibrilação ventricular levando, na maioria dos pacientes, a sequelas duradouras. Isso se explica através de uma série de mecanismos patogênicos que incluem a alteração do equilíbrio iônico neuronal, produção de espécies reativas de oxigênio, ativação da micróglia e astrócitos e degeneração neural. Em casos como esses é válido ressaltar que, além da substância branca (SB) ser mais vulnerável à isquemia, sua lesão constitui um dos principais processos fisiopatológicos envolvidos na isquemia cerebral, refletindo-se clinicamente em

quadros de disfunção sensório-motora e comprometimento cognitivo profundo (Ran *et al.*, 2022).

Nesse sentido, o Canabigerol (CBG), um fito canabinóide não psicoativo, vem sendo estudado por suas possíveis propriedades neuroprotetoras em estudos *in vitro* e *in vivo*. Sua afinidade por receptores alfa-2, 5-HT1 e PPAR gama, associada à capacidade de regular o equilíbrio redox (Skrzydłowska, Jarocka-Karpowicz e Jastrzab; 2022) são possíveis razões que justifiquem a possível aplicação terapêutica do consumo.

Dessa forma, considerando a relevância do assunto e as possíveis propriedades descritas do CBG, o presente projeto tem por objetivo avaliar os efeitos de diferentes doses de CBG sobre degeneração da substância branca (SB) em camundongos com ICGT por meio da técnica histológica de Kluver-Barrera.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos que permanecerão em condições padrões de alojamento. Todos os procedimentos experimentais serão 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. Primeiro, realizou-se uma incisão no pescoço ventral para expor as artérias carótidas comuns que foram ocluídas por 20 minutos com cliques de aneurisma. Após oclusão, os cliques foram removidos e as artérias e a incisão suturada. Alguns camundongos terão as artérias carótidas expostas, mas não ocluídas, e serão designados como animais controles não isquêmicos (sham).

Tratamento Farmacológico: O CBG será 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 e 5 mg/kg durante 7 dias após a ICGT.

Determinação da degeneração da substância branca: A degeneração da substância foi analisada através da técnica de Kluver Barrera. Para isso, após o aprofundamento anestésico com tiopental sódico i.p. (Thiopentax; Cristália, São Paulo, Brasil) e perfusão transcardíaca com solução salina tamponada com fosfato 0,01 M seguida de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,2 M (22 ml/min); o cérebro foi extraído e transferido para uma solução de sacarose 30% até que se precipite no fundo do recipiente. O cérebro foi então embebido em resina OCT (Tissue-Tec) e mantido sob congelamento (-20 oC a -80 oC) até que seja seccionado (50 µm de espessura) em criostato (Leica CM 1860, Wetzlar, Germany). As secções coronais adjacentes foram montadas em lâminas revestidas com gelatina e mantidas a 36°C durante 18 h. Após secagem, as lâminas foram imersas

em soluções alcoólicas ascendentes (álcool 70%, 80% e 95%) e depois imersas em Luxol fast blue 0,1% por 24h a 56 °C. As lâminas foram então imersas em etanol a 70% e água para remover o excesso de Luxol fast blue. O carbonato de lítio 0,05% será utilizado para diferenciar a substância branca. As lâminas foram desidratadas com álcool 95% e 100% seguido de xilol durante 5 min e cobertas com lamínula com meio de montagem Permount.

Em seguida, a análise quantitativa das lâminas foi realizada usando um microscópio Leica DM 2500 com uma câmera Leica DF345 FX. As imagens microscópicas foram obtidas do corpo caloso localizado imediatamente acima do subcampo hipocampal CA1 e do 3º ventrículo dorsal. O software ImageJ foi usado para obter a densidade óptica integrada (DOI) em 3-4 seções por animal. As seções corresponderam às coordenadas estereotáticas (-1,70 a -2,46 mm do Bregma), de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2004). Os valores de DOI foram calculados como média \pm SEM da DOI/área para cada grupo experimental e expresso como uma porcentagem do grupo Sham.

Estatísticas: Foram realizadas usando o GraphPad Prism 8.0.2. Os dados foram avaliados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Bartlett). Testes paramétricos (ANOVA one way) foram usados. O teste post hoc de Tukey foi usado para determinar diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi definida em $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em cada um dos grupos, foi analisada a substância branca em 2 regiões: acima da região CA1 do hipocampo e acima do 3º ventrículo dorsal, conforme ilustrado pela Fig 1.

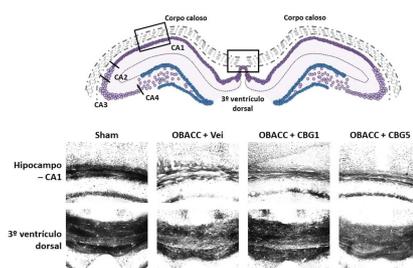


Figura 1 – Representação fotomicrografia da substância branca do corpo caloso analisado em 2 regiões distintas: acima da região CA1 e do terceiro ventrículo dorsal

A isquemia cerebral provocou mudanças no arranjo estrutural da substância branca no corpo caloso acima do subcampo hipocampal CA1 (Fig. 1), observada pela coloração de Kluver-Barrera em camundongos OBACC (F (3, 19) = 5,959; $p = 0,0048$). O grupo OBACC + Vei exibiu mais vacuolização e desarranjo das fibras, refletido por uma diminuição significativa na DOI em comparação com o grupo Sham ($p = 0,0028$). No entanto, o tratamento com CBG, em ambas as doses, não

apresentou proteção significativa da substância branca nas medições do DOI ($p < 0,05$). Quando analisado o corpo caloso da região acima do 3º ventrículo dorsal nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos experimentais ($F(3, 23) = 1,841$; $p = 0,1679$) (Fig. 1). Dessa forma, não foram observados, estatisticamente, um possível efeito neuroprotetor do CBG.

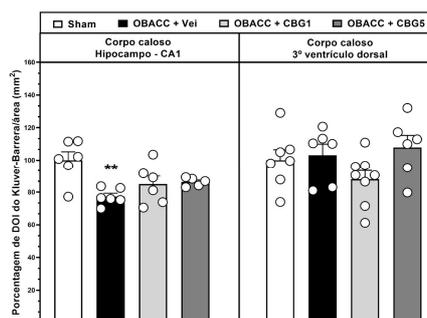


Figura 2 – Densidade Óptica Integrada nos diferentes grupos submetidos ao tratamento. As barras representam a média \pm SEM dos diferentes grupos. *** $p < 0,05$ OBACC + Vei vs. Sham.

CONCLUSÕES

O presente estudo não demonstrou possíveis efeitos protetores do CBG na substância branca nas doses de 1 e 5 mg/kg. No entanto, ainda são necessários estudos adicionais a fim de avaliar a eficácia do CBG com outros marcadores histoquímicos e em outras regiões encefálicas a fim de elucidar seu possível efeito neuroprotetor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pelo financiamento e ao Laboratório de Neuropsicofarmacologia.

REFERÊNCIAS

JASTRZĄB, A.; JAROCKA-KARPOWICZ, I.; SKRZYDLEWSKA, E. The Origin and Biomedical Relevance of Cannabigerol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 14, p. 7929, 19 jul. 2022.

RAN, Y. et al. Curcumin Ameliorates White Matter Injury after Ischemic Stroke by Inhibiting Microglia/Macrophage Pyroptosis through NF- κ B Suppression and NLRP3 Inflammasome Inhibition. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2021, p. 1552127, 30 set. 2021. DOI: 10.1155/2021/1552127.