

CANABIGEROL E SUA AÇÃO COMPORTAMENTAL EM CAMUNDONGOS COM ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL E TRANSITÓRIA

Luís Fernando Fernandes Miranda (PIBIC/CNPq), Nathalia Akemi Neves Kohara (Coorientadora), Humberto Milani (Orientador).

E-mail: ra123503@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Farmacologia /Neuropsicofarmacologia.

Palavras-chave: Canabigerol; Comportamento; Isquemia cerebral.

RESUMO

A isquemia cerebral global e transitória (ICGT) é caracterizada pela redução generalizada do suprimento sanguíneo cerebral, resultando em déficit de oxigênio e nutrientes essenciais, comprometendo função e viabilidade neuronal. O canabigerol (CBG), um fitocanabinoide não psicotomimético, derivado da *Cannabis sativa*, tem despertado interesse devido a suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras relatadas em modelos pré-clínicos, embora sua ação em condições isquêmicas seja pouco compreendida. Este estudo investigou os efeitos do CBG sobre alterações cognitivas e comportamentais em camundongos submetidos à ICGT induzida pela oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC). Camundongos receberam veículo ou CBG (1, 5 ou 10 mg/kg, i.p.) por sete dias após a OBACC. O desempenho cognitivo foi avaliado pelo teste de localização de objetos (TLO) em diferentes intervalos de retenção de memória, por meio do índice de discriminação (D2), que reflete a capacidade de distinguir um objeto novo de um familiar. O comportamento tipo depressivo foi avaliado pelo teste de suspensão da cauda (TSC), considerando latência para a primeira imobilidade e tempo total de imobilidade. A ICGT reduziu significativamente o D2 no TLO no intervalo de 24 horas, indicando prejuízo da memória espacial de longo prazo, efeito revertido pela dose de 10 mg/kg de CBG. No TSC, não houve diferenças significativas entre os grupos, indicando ausência de ação do CBG sobre parâmetros de comportamento tipo depressivo neste modelo. Conclui-se que o CBG apresenta efeito neuroprotetor cognitivo após ICGT, sem evidências de ação antidepressiva nestas condições, sugerindo potencial terapêutico a ser explorado e necessidade de estudos adicionais.

INTRODUÇÃO

A isquemia cerebral global e transitória (ICGT) ocorre como resultado da privação abrupta do fluxo sanguíneo cerebral, levando à lesão tecidual e à neurodegeneração. A parada cardíaca reversível está entre as suas principais causas. A privação de fluxo cerebral acarreta intensa liberação de neurotransmissores, como o glutamato, devido à perda do potencial de membrana de repouso, e ativação metabólica mediada pelo cálcio, levando à excitotoxicidade. Ainda, durante a reperusão, o desequilíbrio funcional dos neurônios e células da glia culminam no desenvolvimento do estresse oxidativo e da neuroinflamação, os quais contribuem para a morte neuronal, injúria da matéria branca e quebra da barreira hematoencefálica (BHE) por um período prolongado (Moskowitz et al., 2010). Os pacientes que sofrem de ICGT desenvolvem prejuízos duradouros, incluindo deficiências motoras, sensoriais, cognitivas e emocionais com consequências

deletérias para o bem-estar do indivíduo e seus familiares. Disfunção cognitiva, ansiedade e depressão são sintomas comuns e estão associados ao aumento da morbidade e anos de vida perdidos por incapacidade. Tais sintomas são relacionados à degeneração neuronal hipocampal, ao declínio na plasticidade sináptica, neuroinflamação excessiva e deficiência de neurotrofinas, mecanismos induzidos pela injúria isquêmica cerebral (Yin et al., 2021). No entanto, ainda faltam tratamentos que atuem sobre os mecanismos subjacentes da isquemia e desencadeadores dos distúrbios do humor, sendo que a terapêutica atual é focada apenas no controle sintomático com o uso, por exemplo, de fármacos antidepressivos e ansiolíticos (Yin et al., 2021). O Canabigerol (CBG) é um fitocanabinoide presente na *Cannabis sativa*, não psicomimético, que apresenta propriedade anti-inflamatória e neuroprotetora. O CBG possui interações distintas com vários receptores em comparação com o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) e canabidiol, além de afinidade por alvos moleculares diferentes. Já foram demonstrados efeitos ansiolíticos do CBG (Zagzoog et al., 2020). Esse efeito em parte é explicado pela ação do CBG em receptores 5-HT_{1A} e adrenérgico α_2 , os quais são abundantes nos núcleos da rafe e locus ceruleus, estruturas cerebrais com papel central na regulação da dor, ansiedade e depressão. Em continuidade ao PIBIC anterior, o presente projeto de pesquisa tem por objetivo avaliar os efeitos de diferentes doses de CBG sobre a memória espacial e comportamento tipo-depressivo em camundongos submetidos à 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 (CEUA, nº 4320080223).

Isquemia cerebral: a ICGT foi induzida pela técnica de oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC) sob anestesia com uma mistura de isoflurano/oxigênio. Primeiro, uma incisão foi feita no pescoço ventral para expor as artérias carótidas comuns que foram ocluídas por 20 minutos com cliques de aneurisma. Após, os cliques de aneurisma foram removidos e as artérias reperfundidas. A incisão foi então fechada com suturas. Alguns camundongos tiveram as artérias carótidas expostas, mas não ocluídas, e foram designados como animais controles não isquêmicos (sham).

Tratamento farmacológico: o CBG foi dissolvido em Tween 80 1% em solução salina (veículo). Os animais foram designados a receber injeções intraperitoneais (ip.) aleatoriamente de veículo ou CBG nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg por 7 dias após a OBACC.

Testes comportamentais: o presente estudo utilizou dois testes comportamentais com o objetivo de avaliar aspectos relacionados à memória espacial, capacidade de discriminação e comportamento tipo-depressivo. Teste de localização de objetos (TLO): para investigar memória espacial e reconhecimento de mudanças ambientais. O experimento foi conduzido em uma arena circular onde objetos foram dispostos. Uma semana antes da OBACC, os animais foram habituados à arena por dois dias. Na sequência, passaram por quatro dias de treinamento com os objetos, até apresentarem desempenho consistente em discriminação em intervalo de uma hora. Entre os dias 9 e 12 após a OBACC, o teste foi repetido, agora em sessões compostas por dois ensaios de três minutos cada. No primeiro ensaio (T1), os

animais exploravam dois objetos idênticos; no segundo (T2), realizado após intervalos de 24, 4 ou 1 hora, um dos objetos era realocado. A exploração foi definida como o direcionamento do focinho a menos de um centímetro ou o toque com o nariz. A partir da análise, foi calculado o índice de discriminação (D2), que representa a capacidade de reconhecer a nova localização do objeto, corrigindo diferenças no tempo total de exploração entre os grupos. Teste de suspensão da cauda (TSC): para mensurar comportamentos semelhantes à depressão, os animais foram suspensos pela cauda com fita adesiva diante de um fundo branco, e o comportamento foi registrado em vídeo durante seis minutos. Foram analisados dois parâmetros: a latência até o primeiro episódio de imobilidade e o tempo total de imobilidade nos últimos quatro minutos do teste.

Estatísticas: as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2. Empregou-se a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste post hoc de Sidak para comparações entre grupos. Além disso, no TLO, utilizou-se o teste t de uma amostra pareada para avaliar, dentro de cada grupo, a memória espacial por meio do cálculo do índice de discriminação D2 em relação a valores significativamente diferentes de 0. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A OBACC promoveu prejuízo significativo da memória espacial de longo prazo no TLO, evidenciado pela redução dos escores de D2 no grupo OBACC + vei em comparação ao grupo Sham + vei ($p = 0,0159$). Este foi revertido pelo tratamento com CBG 10mg/kg, que apresentou desempenho semelhante ao grupo Sham e significativamente superior ao grupo veículo ($p = 0,038$). A análise intragrupo confirmou que apenas os grupos Sham + veículo e OBACC + CBG10 diferiram de zero no índice D2 ($p = 0,013$ – $0,048$), indicando manutenção da memória espacial, enquanto as doses de 1 mg/kg e 5 mg/kg não produziram efeito significativo. No TSC, entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos quanto à latência para o primeiro episódio de imobilidade ($p = 0,2696$) ou ao tempo total de imobilidade ($p = 0,4463$), indicando ausência de alterações em comportamentos do tipo depressivo.

Os resultados apontam para 24 horas como o período de maior déficit de memória pós-OBACC. O CBG na dose de 10 mg/kg mitigou significativamente o déficit de memória no TLO em 24 horas após o treinamento, enquanto doses menores não tiveram efeito. Esse papel neuroprotetor do CBG ainda não havia sido documentado em modelos in vivo de isquemia cerebral. No modelo do TSC, não houve diferença estatisticamente significativa no comportamento tipo depressivo nos camundongos após a realização da OBACC. Estudos apontam para o efeito do CBG em modelos animais de Doença de Huntington e Esclerose Múltipla, o que pode indicar que o CBG pode contribuir para recuperação funcional após lesão celular cerebral.

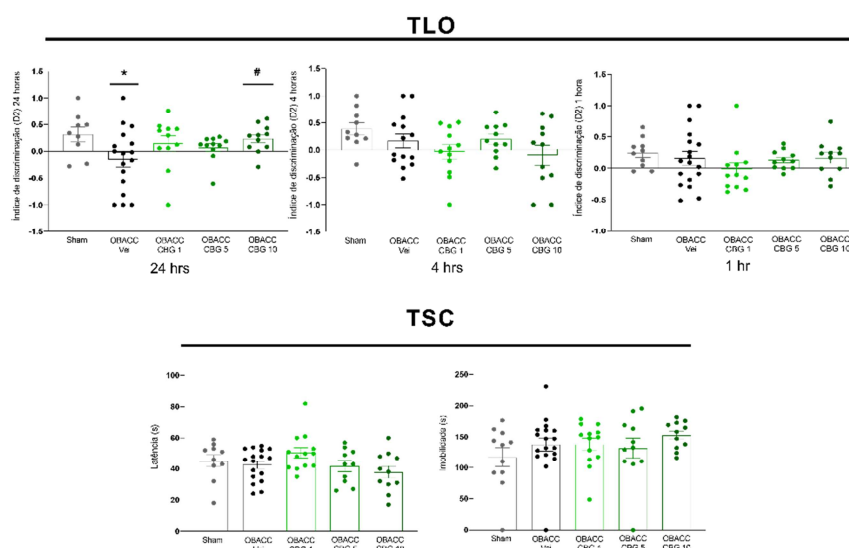


Figura 1 – Efeitos do CBG sobre os comportamentos cognitivos (TLO) analisados por meio do índice de exploração D2 nos intervalos de 1, 4 e 24 horas e sobre os comportamentos tipo-depressivos (TSC) mensurados pela latência para a primeira imobilidade e tempo total de imobilidade em camundongos submetidos à OBACC. As barras representam a média $\pm$ erro padrão da média nos diferentes grupos ($n = 11$ – 17 /grupo). * $p < 0,05$ vs Sham + veículo; # $p < 0,05$ vs OBACC + veículo

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a ICGT induziu prejuízo significativo da memória espacial de longo prazo em camundongos, sendo este efeito revertido pelo tratamento com canabigerol na dose de 10 mg/kg, o que aponta para sua ação neuroprotetora em modelo in vivo. Em contrapartida, não foram observadas alterações relevantes em comportamento tipo depressivo no teste de suspensão pela cauda. Assim, os achados sugerem potencial terapêutico no resgate de funções cognitivas comprometidas pela injúria isquêmica, embora sejam necessários estudos adicionais para elucidar seus mecanismos de ação e avaliar seu impacto em outros aspectos fisiopatológicos e clínicos da isquemia cerebral.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pelo financiamento, ao Laboratório pela oportunidade de aquisição de experiências e conhecimentos e aos meus orientadores.

REFERÊNCIAS

MOSKOWITZ, M. A.; LO, E.H.; IADECOLA, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. **Neuron**. 2010; 67(2): 181-98.

YIN, Q.; DU, T.; YANG, C.; LI, X.; ZHAO, Z.; LIU, R.; YANG, B.; LIU, B. Gadd45b is a novel mediator of depression-like behaviors and neuroinflammation after cerebral ischemia. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 554, p. 107-113, 2021.

ZAGZOOG, A.; MOHAMED, K. A.; KIM, H. J.; KIM, E. D.; FRANK, C. S.; BLACK, T.; JADHAV, P. D.; HOLBROOK, L. A.; LAPRAIRIE, R. B. *In vitro* and *in vivo* pharmacological activity of minor cannabinoids isolated from *Cannabis sativa*. **Sci Rep**, v. 10, 2020.