

MATHEUS PEREZ

**Papel neuroprotetor do canabidiol em ratos neonatos
após transecção do nervo isquiático**

Campinas, 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MATHEUS PEREZ

**“PAPEL NEUROPROTETOR DO CANABIDIOL
EM RATOS NEONATOS APÓS TRANSECÇÃO DO
NERVO ISQUIÁTICO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Matheus Perez
e aprovada pela Comissão Juizadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção
do Título de Mestre em Biologia
Celular e Estrutural, na área de
Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

P415p Perez, Matheus, 1982-
Papel neuroprotetor do canabidiol em ratos neonatos
após transecção do nervo isquiático / Matheus Perez. –
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Canabidiol. 2. Neuroproteção. 3. Ratos
neonatos. 4. Ferimentos e lesões. 5. Nervo isquiático.
I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de, 1971-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Neuroprotective role of canabidiol after sciatic nerve transection in
neonatal rats

Palavras-chave em Inglês:

Cannabidiol

Neuroprotection

Neonatal rats

Wounds and injuries

Sciatic nerve

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira [Orientador]

Francisco Silveira Guimarães

Claudia Vianna Maurer Morelli

Data da defesa: 19-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 19 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

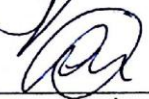
Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães


Assinatura

Profa. Dra. Claudia Vianna Maurer Morelli


Assinatura

Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Assinatura

Profa. Dra. Taize Machado Augusto

Assinatura

Aos meus pais, à minha irmã Carolina e
minha namorada Josiane, vocês são
minha maior fonte de inspiração.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus que nas horas mais difíceis nunca me deixou desistir, sempre me mostrando os caminhos pelos quais devo seguir.

À Universidade estadual de Campinas e ao Programa de Biologia Celular e Estrutural, que permitiram a realização desse trabalho.

Ao meu orientador prof. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira pelos ensinamentos, paciência, conselhos, amizade e dedicação, que sempre mostrou durante esses anos que me acolheu em seu laboratório.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, que financiou e acreditou nesse trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro e a bolsa concedida.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional Nori, Marquinho, Paulo Francisco e Paulo Bernardes.

À Liliam Panagio secretária do Programa em Biologia Celular e Estrutural, pela dedicação e amizade e por sempre se mostrar disposta a ajudar no que era possível.

Aos meus amigos e colegas de trabalho pela ajuda nos experimentos e amizade, Kyl Assaf, Camilia Freria, Bárbara Monteiro, Sérgio Nunes, Sheila Victorio, Nathalia Machado, Gustavo Simões, André

Bombeiro, Aline Barroso Spejo, Roberta Barbizan Petinari, Natália Perussi Biscola, Gleidy Silva, Mateus Vidigal e Rafaela Hell.

Aos meus amigos e conselheiros, Giuliano Gonsálvez, Gabriela Chiaroto, Luciana Cartarozzi, Aline Macedo, Rodrigo Fabrizio e Gabriel Maturana, sempre juntos nos momentos de alegria e dificuldade.

À Suzana Ullian Benítez amiga e colega, que deu início a esse trabalho junto comigo, e até a sua conclusão sempre esteve presente.

À todos os professores do Departamento de Anatomia, pelo conhecimento e experiência passada.

À professora Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães, pelo grande apoio e por fornecer a droga canabidiol utilizada na pesquisa.

Aos professores que aceitaram participar da minha banca de defesa, Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães, Prof. Dra. Claudia Vianna Maurer Morelli, Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior e Profa. Dra. Taize Machado Augusto.

Ao meu cunhado Estevinho, pela amizade por toda ajuda que sempre me deu.

Agradeço ao meu irmão Marcelo pela paciência e compreensão.

À minha mãe Leonice e meu pai Theodosio, pelo amor, carinho, paciência, compreensão, dedicação e ajuda no que era possível e impossível. Vocês são meu alicerce e fonte de inspiração.

Agradeço a minha irmã Carolina, que sempre me apoiou de todas as formas, agradeço pelo amor, dedicação e paciência, sendo uma das maiores responsável por isso e uma das pessoas a quem me inspiro.

À minha namorada Josiane, pelo amor, companheirismo, paciência nas horas difíceis, pela amizade, por me apoiar e estar do meu lado sempre em todos os momentos marcantes nesse período que estamos juntos. Principalmente por ser essa pessoa maravilhosa que admiro e me inspiro.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

Sumário

Abreviações.....	11
Resumo.....	12
Abstract.....	14
1.Introdução.....	16
1.1 Organização morfofuncional do sistema nervoso.....	17
1.2 Embriogênese do sistema nervoso.....	21
1.3 Reação do tecido nervoso após a lesão e capacidade regenerativa.....	22
1.4 Canabidiol e sistema endocanabinóide.....	24
2. Justificativa.....	29
3. Objetivos.....	31
3.1 Obejetivos gerais.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4.Materiais e métodos.....	33
4.1 Grupos experimentais.....	34
4.2 Procedimento cirúrgico para transecção do nervo isquiático.....	34
4.3 Preparação e administração do canabidiol.....	35
4.4 Sacrifício dos animais.....	35
4.5 Imunoistoquímica.....	36
4.6 Análise quantitativa da imunoistoquímica.....	37
4.7 Análise estatística da imunoistoquímica.....	38
4.8 Avaliação da sobrevivência dos motoneurônios medulares.....	38
4.9 Reação de TUNEL para detecção de células apoptóticas.....	39
5. Resultados.....	40
5.1 Efeito do tratamento com canabidiol na sobrevivência dos motoneurônios medulares.....	41
5.2 Imunoistoquímica para proteína sinaptofisina.....	45

5.3 Imunoistoquímica para proteína GFAP.....	47
5.4 Imunoistoquímica para proteína Iba-1.....	49
5.5 Reação do TUNEL para detecção de células apoptóticas.....	52
6. Discussão.....	60
7. Conclusões.....	69
8. Referências bibliográficas.....	71
9. Anexo	86

Lista de abreviaturas

2-AG - 2-Araquidonil Glicerol

BBB - Basso Beattie e Bresnahan

CB1 - Receptor Canabinóide do Tipo 1

CB2 - Receptor Canabinóide do Tipo 2

CDB - Canabidiol

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CNTF - Fator Neurotrófico Ciliar

DAG Lipase - *sn*-1- diacilglicerol Lipase Seletiva

FAAH - *Fatty Acid Amide Hydrolase*

GABA - Ácido Gama-amino Butírico

GFAP - Glial Fibrillary Acidic Protein

Iba-1 - Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1

IFN γ - Interferon gama

K⁺ - íon potássio

MAPK - Mitogen-activated Protein Kinases

MCP - Morte Celular Programada

MHC-II - Complexo de Histocompatibilidade Principal de Classe II

NAPEPLD - *N*-acilfosfatidiletanolamida- Fosfolipase D Seletiva

OPCs - Células Progenitoras de Oligodendrócitos

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

SY- Sinaptofisina

TUNEL - Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) dUTP nick end labeling

Resumo

O sistema nervoso é muito sensível à lesões e sua capacidade regenerativa é limitada. Assim, na maioria dos casos, o reparo tecidual não ocorre ou ocorre de forma incompleta, causando danos irreversíveis. Embora o sistema nervoso do neonato apresente maior capacidade regenerativa do que o adulto, a regeneração também é um processo complexo e limitado.

Para melhor compreensão dos mecanismos e limitações da regeneração do SNC, tanto na fase neonatal como na fase adulta, diversos modelos de lesão têm sido propostos por vários autores, inclusive transecção de nervo periférico. Através desses estudos experimentais, diferentes modalidades terapêuticas foram sugeridas, com intuito de evitar as alterações que levam à morte neuronal, seja na fase neonatal ou adulta. Para isso, muitas substâncias, com propriedades neuroprotetoras, têm sido testadas no processo de regeneração, plasticidade sináptica e para evitar a morte neuronal após lesão do sistema nervoso. Dentre a grande variedade de substâncias com potencial neuroprotetor, estão alguns derivados da planta *Cannabis sativa*. Um deles, o canabidiol (CBD), é o principal componente não-psicotrópico produzido nas glândulas encontradas na superfície das folhas da planta. O presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial neuroprotetor do canabidiol e, para isso, foram utilizados ratos neonatos da linhagem Wistar, divididos nos seguintes grupos experimentais: grupo submetido à axotomia do nervo isquiático e tratamento com o canabidiol (grupo CBD), grupo submetido à axotomia e tratamento veículo (grupo PB) e grupo controle, com axotomia sem tratamento (grupo sem tratamento). Assim, cortes histológicos utilizando coloração de Nissl mostraram que os grupos tratados com canabidiol (15 e 30mg/kg) mostraram maior sobrevivência (21%; $p < 0.0001$) de motoneurônios medulares, quando comparados aos grupos que não foram tratados com canabidiol ou tratados com canabidiol (5mg/kg).

A análise imunohistoquímica, empregando o anticorpo anti-sinaptofisina revelou, no grupo tratado com canabidiol, preservação de imunoreatividade, refletindo preservação de circuitos sinápticos

medulares. Tal manutenção de terminais foi 30% superior nos grupos tratados com canabidiol, comparativamente aos grupos controle ($p=0,0003$). A imunoistoquímica para os anticorpos anti-GFAP (astrócito) e anti-IBA 1(microglia) revelou uma menor imunomarcacão para o grupo tratado com canabidiol, quando comparado aos grupos não tratados. Tal fato demonstra que o canabidiol reduz astrogliose (anti-GFAP) em 30% ($p=0,0149$) e reacão microglial em 27% ($p=0,0086$). A análise para detecção de células apoptóticas, através reacão de TUNEL (teminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick end labeling), mostrou que o tratamento com canabidiol foi neuroprotetor, quando comparado ao grupo axotomia sem tratamento ($p=0,0063$). Em conjunto, os presentes resultados mostram que o canabidiol apresenta promissora propriedade neuroprotetora, devendo ser melhor investigado, com vistas ao seu emprego clínico futuro.

Abstract

The CNS is very sensitive to injury and their regenerative capacity is limited, so in most cases the tissue repair does not occur or occurs incompletely, leading to irreversible damage. Although the nervous system of neonatal rats presents a greater regenerative capacity than adults, the regenerative process is still complex and limited. To better understand the mechanisms and limitations of CNS regeneration, both in the neonatal and adulthood, various injury models have been proposed by several authors, including peripheral nerve transection. Through these experimental studies several therapeutic modalities have been proposed, in order to prevent the neuronal death caused by injuries and pathological processes. For this reason, many substances with neuroprotective properties, have been tested in the regeneration process, synaptic plasticity and to prevent neuronal death after nervous system injury. Among the wide variety of substances with potential neuroprotective action, some are derived from the *Cannabis sativa*. One, cannabidiol (CBD) is the major non-psychotropic component produced by the glands found on the surface of plant leaves. The present study aimed to investigate the neuroprotective potential of CBD. We used Wistar neonatal rats, that were divided into the following experimental groups: sciatic nerve axotomy and CBD treatment (CBD group), axotomy and vehicle treatment (PB group) and a control group, without treatment (no-treatment group). Thus, Nissl staining in spinal cord cross sections showed that the CBD groups (15 e 30mg/kg) had a higher neuronal survival (21%, $p < 0,0001$) when compared to the CBD 5mg/kg group, PLB and no treatment groups. Immunohistochemical analysis, done by ipsi/contralateral ratio of integrated density of pixels quantification, of anti-synaptophysin labeling showed that CBD groups had a greater immunostaining pattern when compared to the other experimental groups (30%, $p < 0,0003$) reflecting a higher preservation of synapses after CBD treatment. Immunolabeling Anti-GFAP and anti-Iba 1 revealed a lower immunostaining in CBD group, showing that CBD treatment decreases the astrogliosis process in 30% ($p = 0,0149$) and reduce reactive microgliosis in 27% ($p = 0,0086$), when compared to the others

experimental groups. Aimed to detect apoptotic cells, we used TUNEL reaction. Quantitative analysis showed that the CBD treatment reduced the apoptotic nuclei detectable, when compared to other experimental groups. These results show that CBD presents promising neuroprotective property and should be better investigated aiming its future clinical use.

1 - Introdução

1.1 Organização morfofuncional do Sistema Nervoso

O sistema nervoso, embora apresente, didaticamente, vários critérios de divisão (dentre eles anatômico, embriológico e funcional), funciona como uma unidade. (Machado, 1998).

O sistema nervoso consiste de uma porção central (Sistema Nervoso Central – SNC) e uma periférica (Sistema Nervoso Periférico – SNP). Funcionalmente, pode ser dividido em sistema nervoso somático e sistema nervoso visceral (Noback, 1977). Suas funções envolvem o processamento de informações sensoriais, controle motor, a mediação de respostas autonômicas, a elaboração de respostas emocionais, aprendizagem e memória. As células que compõem o SNC são os neurônios, a macroglia (astrócitos e oligodendrócitos), a microglia, os macrófagos perivasculares, que são as primeiras células a apresentarem uma resposta imune no SNC e as células que formam as meninges, envoltórios do Sistema nervoso (Kandel *et al.*, 2000).

Os neurônios são as células especializadas na condução do impulso nervoso e constituem a unidade fundamental do SNC. Essas células são altamente excitáveis, comunicam-se entre si e com outras células efetadoras através de atividade elétrica, que provoca modificações no seu potencial de membrana (Machado, 1998). Um neurônio típico é constituído de um corpo (soma), dendritos e um axônio. O corpo celular do neurônio é considerado o centro metabólico, sendo responsável pela síntese de praticamente todas as proteínas neuronais, bem como pela degradação e renovação dos constituintes celulares, incluindo os de membrana. Os dendritos, por sua vez, são especializados em receber e gerar estímulos, sendo geralmente curtos e ramificados (Machado, 1998). O axônio tem origem no corpo do neurônio em uma região denominada cone de implantação. Possui comprimento variável podendo ter, no humano, de poucos milímetros a mais de um metro, como é caso dos axônios dos neurônios que formam o nervo isquiático. O axônio gera alteração no potencial de ação, sendo especializado na condução de impulso elétrico. A velocidade de condução varia de acordo com o diâmetro e o grau de

mielinização da fibra (Machado, 1998; Kandel *et al.*, 2000). A mielinização das fibras no sistema nervoso central é feita pelos oligodendrócitos; já no sistema nervoso periférico esse papel é desempenhado pelas células de Schwann. O processo de mielinização dos axônios ocorre durante a última fase do desenvolvimento fetal e primeiros anos pós-natais (Machado, 1998; Kandel *et al.*, 2000). O axônio, em seu segmento terminal, apresenta estruturas chamadas botões sinápticos, que entraram em contato com outros neurônios ou células efectoras. Os axônios também são responsáveis pelo transporte de substâncias como as neurotrofinas e fatores de crescimento. Esse transporte se faz do centro metabólico (corpo) para os terminais do axônio e também dos terminais para o corpo celular, sendo denominado fluxo axoplasmático antérogado e retrógrado, respectivamente (Machado, 1998). A célula, como um todo, recebe terminais ou botões sinápticos de outros neurônios, formando sinapses.

O SNC contém uma ampla variedade de neurônios, com diferentes morfologias e funções. Dentre esses, podemos citar os neurônios sensitivos e os motoneurônios, que têm função de conduzir impulsos aferentes e eferentes, respectivamente. O SNP é constituído pelos nervos e gânglios e sua função é conectar o SNC às diversas partes do corpo (Kandel *et al.*, 2000).

Macroscopicamente, o SNC pode ser dividido em substância cinzenta, contendo corpos celulares de neurônios, fibras amielínicas e capilares sanguíneos e substância branca que contém fibras nervosas mielizadas (Machado, 1998; Kandel *et al.*, 2000). A distribuição da substância branca e cinzenta difere conforme a região do SNC. No encéfalo a substância cinzenta localiza-se perifericamente, revestindo um centro de substância branca. Já na medula espinal a distribuição se faz de forma contrária: a substância cinzenta ocupa uma posição central e a substância branca está disposta perifericamente (Machado, 1998). A medula espinal está situada dentro do canal vertebral, porém, sem ocupá-lo em toda sua extensão, não possui calibre uniforme, isso porque apresenta duas dilatações denominadas intumescência cervical e intumescência lombar. Essas intumescências correspondem às áreas em que fazem conexão as grandes raízes nervosas que formam os plexos braquial e lombossacral, responsáveis

pela inervação dos membros superiores e inferiores (Machado, 1998; Kandel *et al.*, 2000). Na medula espinal a substância cinzenta, localizada internamente, apresenta a forma da letra H denominada H medular. Nela reconhecemos, de cada lado, três colunas ou cornos, são as colunas anterior, lateral e posterior. A substância branca, localizada perifericamente, é formada pelas fibras que ascendem e descendem na medula, formando os funículos anterior, lateral e posterior. Nas regiões anterior e posterior da medula fazem conexões as raízes ventrais e dorsais dos nervos espinais. As duas raízes se unem em um ponto distal ao gânglio espinal, presente na raiz dorsal, assim o nervo espinal é misto, com um componente sensitivo e um motor (Machado, 1998).

A citoarquitetura da medula mostra que os neurônios apresentam distribuições diferentes na substância cinzenta, podendo assim dividi-la em extratos ou lâminas, chamadas de lâminas de Rexed. Essas lâminas são numeradas de I a X no sentido dorsoventral: as lâminas de I a IV correspondem às raízes que penetram pela raiz dorsal da medula e são, portanto, sensitivas, as lâminas V e VI ocupam uma posição intermediária ocupadas, principalmente, por interneurônios; já nas lâminas VII, VII e X, estão localizados os neurônios internunciais que geram circuitos intramedulares e na lâmina IX localizam-se os corpos dos neurônios motores, também denominados motoneurônios (Rexed, 1964). Os corpos dos motoneurônios destinados à inervação da musculatura axial ocupam uma posição ventromedial na substância cinzenta, já os corpos dos motoneurônios destinados à inervação da musculatura do esqueleto apendicular, representado pelos membros superiores e inferiores, ocupam uma posição pósterolateral na substância cinzenta (Machado, 1998; Kandel *et al.*, 2000). Quando os corpos dos neurônios estão agrupados no sistema nervoso central, são chamados de núcleos e, quando agrupados fora do SNC, são chamados gânglios. Da mesma forma, o conjunto de fibras dentro e fora do SNC recebem denominações diferentes. Assim, quando estão agrupadas no SNC formam os tractos, fascículos e lemniscos. Por sua vez, as fibras que se unem fora do SNC, formaram os nervos periféricos (Machado, 1998; Kandel *et al.*, 2000).

Logo após deixarem o tronco encefálico, a medula espinal ou os gânglios sensitivos, as fibras nervosas se unem para formar os nervos periféricos espinais e cranianos. Essas fibras, que formam os grandes nervos periféricos, como o nervo isquiático, são unidas através de um revestimento de tecido conjuntivo denominado epineuro. No interior dos nervos, as fibras se organizam em fascículos e cada fascículo recebe um envoltório de tecido conjuntivo chamado perineuro. No interior de cada fascículo, cada fibra recebe um revestimento chamado endoneuro (Machado, 1998).

No presente trabalho foi utilizado um modelo experimental de lesão do nervo isquiático, um nervo periférico. O nervo isquiático é o maior nervo do corpo humano e faz parte do plexo lombosacral. Este, por sua vez, é formado pelas raízes ventrais dos nervos espinais (L 4, L 5, S 1, S 2, S 3 e S 4). O plexo lombosacral é formado no interior do músculo psoas maior e está localizado anteriormente ao músculo piriforme. (Dangelo e Fattini, 2011). O nervo isquiático é formado por dois ramos, o nervo tibial, formado pelas raízes ventrais dos nervos espinais (L 4, L 5, S 1, S 2 e S 3) e pelo nervo fibular comum, formado pelas raízes ventrais dos nervos espinais (L 4, L 5, S 1 e S 2). Embora, normalmente, a divisão em nervo tibial e nervo fibular comum ocorra na altura da fossa poplíteia, essa divisão pode ocorrer em qualquer nível desde sua origem (Dangelo e Fattini., 2011). O nervo isquiático do rato difere do humano, pois apresenta mais um segmento em sua formação, o segmento L 6 (Paxinos e Watson; 1997). O nervo isquiático emerge pelo forame isquiático maior e percorre toda a extensão da região posterior do membro inferior, desde a região glútea até a região plantar. Na região glútea e na coxa não emite nenhum ramo de grande relevância e não inerva nenhum músculo, próximo à fossa poplíteia divide em seus ramos terminais: nervo tibial, que será responsável por inervar todos os músculos da face posterior da perna que realizam os movimentos de flexão plantar e inversão; e nervo fibular comum, responsável pela inervação dos músculos da região anterior da perna, responsáveis pelos movimentos de dorsiflexão e eversão (Dangelo e Fattini, 2011). Qualquer lesão do nervo

isquiático, seja parcial ou total, leva a alterações funcionais na capacidade de locomoção e sustentação do indivíduo.

1.2 Embriogênese do sistema nervoso

Durante a embriogênese do Sistema Nervoso, neurônios são gerados em excesso e, através de um processo de ajuste finamente regulado, grande porcentagem destes é eliminada (Oppenheim & Chu-Wang, 1978; Oppenheim, 1991). Huh e colaboradores (2008) sugerem que esse processo é dependente não só do suprimento adequado de fatores neurotróficos, como também da atividade neuronal, onde conexões impróprias são eliminadas e outras, apropriadas, são estabelecidas. Desta forma, muitos neurônios entram em processo de morte celular programada (MCP), que depende da ativação de determinados genes e síntese de proteínas específicas, sendo eliminados sem que ocorra o desencadeamento de processo inflamatório. Por sua vez, outros neurônios estabelecerão sinapses entre si e/ou com órgãos alvo, sobrevivendo assim pelo adequado suprimento de fatores neurotróficos (Hamburger, 1958; Levi-Montalcini, 1987; Oppenheim, 1991).

Outro estudo também mostrou que há perda natural de aproximadamente 50% da população de motoneurônios medulares, sendo que, morfológicamente, estes neurônios apresentavam características do processo de apoptose, como o desarranjo nuclear, cromatólise e a dissolução dos corpúsculos de Nissl (Oppenheim & Chu-Wang, 1983). Os motoneurônios que sobrevivem, formam e estabelecem os circuitos medulares, onde cada motoneurônio recebe um número significativo de aferências (cerca de 100.000 *inputs* por motoneurônio). Neste sentido, a presença de neurotrofinas torna-se fundamental para a diferenciação e sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento, além de contribuir para a manutenção da correta função dos neurônios adultos.

1.3 Reação do tecido nervoso após a lesão e capacidade regenerativa

Uma característica dos mamíferos neonatos, particularmente durante a primeira semana pós-natal, é a vulnerabilidade dos neurônios motores e sensitivos frente à axotomia periférica, devido à sua imaturidade morfológica e funcional (Lowrie *et al.*, 1994). Lowrie & Vbrová (1992) mostraram que a morte neuronal após a axotomia começa no terceiro dia após a lesão, atingindo seu ápice uma semana após axotomia. Este fato confirmou os experimentos de Kashihara *et al.*, (1987), nos quais ficou demonstrado que na lesão axonal, onde há a desconexão entre o corpo celular e o órgão alvo, há significativa diminuição do suprimento de fatores neurotróficos ao pericário, o que resulta na morte celular de praticamente todas as células lesadas.

Estudos mostram que as neurotrofinas são internalizadas e retrogradamente transportadas até o corpo celular após uma lesão periférica (Sendtner *et al.*, 1990). Neste sentido, Oliveira *et al.*, (2002), empregando ratos cujo nervo isquiático fora axotomizado e o coto proximal tratado com fatores neurotróficos, mostraram que os animais tratados com Fator Neurotrófico Ciliar (CNTF), apresentavam uma sobrevivência significativamente maior de motoneurônios medulares. Diversas evidências foram obtidas indicando que neurotrofinas, como o CNTF, desempenham um papel fundamental no processo de resposta à lesão no SNC (Ip *et al.*, 1993; Asada *et al.*, 1995).

Além da hipótese das neurotrofinas serem necessárias para sobrevivência neuronal na fase neonatal, existem ainda evidências de que a interação dos cones de crescimento com as fibras musculares também sejam fundamentais para a sobrevivência dos motoneurônios. Este contato induz o início do processo de estabelecimento das junções neuromusculares, fazendo com que os neurônios passem de um período de crescimento para um período de atividade sináptica. Tais alterações fisiológicas são fundamentais para o amadurecimento celular e resultam em um estado relativamente independente do motoneurônio quanto ao fornecimento de fatores neurotróficos (Vbrová & Lowrie, 1989).

O sistema nervoso é muito sensível a lesões e sua capacidade regenerativa é limitada. Assim, na maioria dos casos, o reparo tecidual não ocorre ou ocorre de forma incompleta, causando danos irreversíveis (Moran e Graeber, 2004). Embora o sistema nervoso do neonato apresente maior capacidade regenerativa do que o adulto, a regeneração também é um processo complexo e limitado. A axotomia de um nervo periférico causa uma resposta tissular complexa no SNC, afetando tanto o corpo celular quanto o microambiente circunjacente ao neurônio axotomizado, e se manifesta através de diversas alterações (Moran e Graeber, 2004). Dentre estas alterações, estão as que ocorrem no corpo celular, denominadas, em conjunto, de cromatólise, caracterizada pelo aumento no volume do corpo celular, deslocamento do núcleo para a periferia e dissolução da substância de Nissl (Aldskogius e Svensson, 1993), a alteração do padrão de expressão de diversas proteínas (Barron, 1983; Linda *et al.*, 1992; Piehl *et al.*, 1993; Piehl *et al.*, 1998), e a retração dos terminais e botões sinápticos em contato com o corpo do neurônio axotomizado, sendo que o grau de retração varia de acordo com o tipo de botão sináptico (Linda *et al.*, 2000; Culheim *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2004). Essas alterações observadas no neurônio lesado levam a uma mudança no estado funcional, onde ele passa de um estado de transmissão sináptica para um estado de regeneração (Barron, 1983; Linda *et al.*, 2000).

Paralelamente, estão as alterações que ocorrem no microambiente, como por exemplo, nas células gliais. Entre as principais alterações, estão as que ocorrem no metabolismo dos astrócitos próximos aos neurônios axotomizados, que formam os processos perisinápticos (Derouiche e Frostsher, 2001). Essas alterações são denominadas astrogliose, gliose reativa ou astrogliose reativa (McCall *et al.*, 1996; Pekny, 2001), que é caracterizada principalmente pelo aumento na expressão da proteína denominada GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), além de aumentar a expressão de outras proteínas e receptores (Tetzlaff *et al.*, 1988; Rohlmann *et al.*, 1994; Hermansson *et al.*, 1995; Koyama *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 2003). No SNC a regeneração axonal é dificultada, pois há secreção, pelos astrócitos, de moléculas inibitórias. Além disso, há a interrupção no fornecimento de fatores neurotróficos (Moran e Graeber,

2004) e a formação de uma cicatriz glial, que age física e quimicamente, podendo levar à morte neuronal. A perda da homeostase no SNC está relacionada com a ativação de células gliais, dentre elas os astrócitos, os quais ficam mais reativos após a injúria (Wroblewski *et al.*, 2000). A microglia também se torna ativada após lesão e tem função de fagocitose e secreção de moléculas pró-inflamatórias (DeLeo *et al.*, 2006). Já no SNP, a regeneração nervosa é facilitada devido às características do microambiente e é dependente de uma série de eventos necessários para reajustar o microambiente do nervo lesado, no intuito de reestabelecer a homeostasia (Moran e Graeber, 2004).

Para melhor compreensão dos mecanismos e limitações da regeneração do SNC, tanto na fase neonatal como na fase adulta, diversos modelos de lesão têm sido propostos por diversos autores, como a transecção ou esmagamento de nervo periférico (Liebermann, 1971; Chen, 1978; Reisert *et al.*, 1984; Svensson e Aldskogius, 1993), a avulsão da raiz ventral ou dorsal da medula (Koliatsos *et al.*, 1994; Pihel *et al.*, 1995), a incisão no funículo anterior da medula (Risling *et al.*, 1983; Linda *et al.*, 1992). Em um estudo utilizando um modelo experimental de transecção do nervo isquiático em ratos neonatos, foram mostradas as diversas alterações que ocorrem após a transecção do nervo, incluindo-se a retração dos terminais sinápticos. Assim, a morte dos motonêuronios, após axotomia, pode ser, em grande parte, causada pela dependência do transporte de fatores neurotróficos e atividade neuronal nessa fase. (Tiraihi e Rezaie, 2004).

1.4 Canabidiol e sistema endocanabinóide

Através de estudos experimentais relacionados às lesões do SN, diversas modalidades terapêuticas têm sido propostas, com intuito de evitar e impedir as alterações que levam à morte neuronal, seja na fase neonatal ou adulta. Para isso, muitas substâncias com propriedades neuroprotetoras têm sido utilizadas no processo de regeneração, plasticidade sináptica e para evitar a morte neuronal após lesões proximais.

Dentre a grande variedade de substâncias estudadas e utilizadas para esses fins, estão alguns derivados da planta *Cannabis sativa* como o canabidiol (CDB), principal componente não-psicotrópico das glândulas encontradas na superfície de suas folhas (Scuderi *et al.*, 2009).

O interesse terapêutico pelos canabinóides aumentou a partir da descoberta dos primeiros receptores canabinóides endógenos. O primeiro receptor canabinóide foi identificado em 1988, sendo denominado CB1 (Devane *et al.*, 1988). Este foi assim chamado porque, em 1993, foi identificado um segundo receptor canabinóide denominado CB2 (Munro *et al.*, 1993). Os receptores canabinóides, caracterizados até o momento, agem inibindo a atividade das adenilato-ciclases e estimulandoas *MAPK* (*mitogen-activated protein kinases*). No caso específico dos receptores CB1, a modulação se faz sobre canais de Ca^{2+} voltagem dependentes, os quais inibem e canais de K^{+} , os quais atuam estimulando (McAllister e Glass, 2002). Ambos receptores estão acoplados à proteína G, presente na membrana celular. Esses dois receptores diferem na sua sequência de aminoácidos, mecanismo de sinalização, distribuição nos tecidos e a sensibilidade a certos agonistas e antagonistas (Howlett, 2002).

Os receptores CB1 são os mais abundantes até agora encontrados no sistema nervoso central, embora também estejam presentes no sistema nervoso periférico (Marzo *et al.*, 2004). Já os receptores CB2 estão mais presentes no sistema nervoso periférico e, principalmente, no sistema imune, promovendo um efeito imunossupressor quando ativados (Cota *et al.*, 2003). Embora hoje já se saiba que os receptores CB2 também são expressos por células neuronais e gliais no SNC (Brusco *et al.*, 2008).

Uma vez identificados esses receptores endógenos no organismo, surgiu à hipótese da existência de ligantes canabinóides endógenos para esses receptores. Essa hipótese foi confirmada em 1992, quando foram isolados os dois primeiros canabinóides endógenos, a anandamida (N-araquidonil etanolamina) e o 2-AG (2 - araquidonil glicerol), que também são chamados endocanabinóides (Devane *et al.*, 1992). A maior parte dos endocanabinóides identificados, até o momento, são derivados de ácidos graxos de cadeia longa, principalmente do ácido araquidônico. Assim, a anandamida e o 2-AG são formados por

vias dependentes de fosfolipídios, cujas enzimas de síntese são a *N*-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D seletiva (NAPEPLD) e a *sn*-1-diacilglicerol lipase seletiva (DAG Lipase), respectivamente (Bisogno et al., 2003; Okamoto et al., 2004).

A maior parte dos endocanabinóides atua sob demanda, seja em resposta aos estímulos fisiológicos (despolarização neuronal) ou a condições patológicas (Pagotto et al., 2006). Os endocanabinóides anandamida e 2-AG têm a ação interrompida por processo de recaptação pelos neurônios, seguida de seu metabolismo. Essa etapa parece ocorrer por simples difusão ou através de processo facilitado, por uma proteína transportadora. Ambos os endocanabinóides são rapidamente metabolizados e hidrolizados pela FAAH (*fatty acid amide hydrolase*) e pela MAG lipase (*monoacyl glycerol*), em compostos inativos (Bisogno et al., 2002; Di Marzo et al., 2005). Os receptores canabinóides, juntamente com seus ligantes endógenos, com as enzimas que os sintetizam e degradam formam o sistema endocanabinóide (Mackie, 2006). Entre as várias funções desempenhadas por esse sistema está a ação neuromodulatória (Azad et al., 2004; Mackie et al., 2007; Wang e Ueda., 2009).

Arevalo-Martin e colaboradores (2012) mostraram, em um estudo experimental em ratos Wistar machos adultos que, após lesão moderada e severa da medula espinal, houve um aumento nos níveis tanto de anandamida como 2-AG. Mostraram, também, que após a administração do AM 630 e AM681, antagonistas dos receptores CB1 e CB2, sozinhos ou combinados, piorou a recuperação motora espontânea de ratos, de acordo com a avaliação locomotora de Basso Beattie e Bresnahan (BBB). Ainda nesse mesmo estudo, mostraram aumento na expressão de MHC-II por monócitos e microglia e redução do número de fibras serotoninérgicas, além do aumento da perda da mielina na medula espinal, noventa dias após a lesão. Esses resultados sugerem que os endocanabinóides são parte de uma resposta neuroprotetora inicial após a lesão do sistema nervoso central, que envolve a recuperação espontânea após a lesão. Em outro estudo, também utilizando um modelo animal de lesão da medula espinal, foi demonstrado que houve um aumento na expressão de receptores CB1 por

neurônios e oligodendrócitos, aumento da reatividade astrocitária e aumento na expressão de receptores CB2 por infiltrados imunes e astrócitos. Esses dados foram confirmados pelas técnicas RT-PCR e imunoistoquímica (Garcia-Ovejero et al., 2009).

Agonistas de receptores canabinóides inibem a transmissão sináptica glutamatérgica e reduzem a produção de fator de necrose tumoral, que causa danos neuronais. Além disso, alguns canabinóides sintéticos ou da planta, que não tem ação sobre os receptores canabinóides, têm mostrado serem neuroprotetores, possivelmente por sua ação direta no sistema excitatório glutamatérgico ou atuando como antioxidantes (Mechoulam et al., 2002).

O canabidiol, principal componente não-psicotrópico da *Cannabis sativa*, pode interagir com o sistema endocanabinóide, mas com uma ação distinta (Booz, 2012). Foi primeiro isolado em 1940 e sua estrutura química foi determinada somente em 1963 (Mechoulam et al., 2007; Izzo et al., 2009). O canabidiol exibe uma variedade de ações, incluindo efeitos anti-epilético, anti-inflamatório, sedativo, antipiscótico, hipnótico, antioxidante e propriedades neuroprotetoras (Zuardi et al., 2006; Scuderi et al., 2009). O canabidiol tem um mecanismo complexo de ação, principalmente porque interage com a atividade de muitos neurotransmissores e neuromoduladores, incluindo a dopamina, acetilcolina, GABA, histamina, serotonina, glutamato, noradrenalina, prostaglandinas e peptídeos opióides (Dewey, 1986; Baker et al., 2003). Tem seu efeito facilitado pela ação em dois receptores, o CB1 e o CB2 (Conte et al., 2009). No sistema endocanabinóide, o canabidiol tem mostrado uma ação em inibir a inativação de endocanabinóides, por inibir a enzima FAAH (*fatty acid amide hydrolase*), responsável pela inativação da anandamida e do 2-Aracdonil glicerol. Isso permite que essas moléculas atuem por mais tempo nos receptores canabinóides. Uma vez que tais moléculas endógenas estão aumentadas em certas condições patológicas, o canabidiol atua melhorando a ação desses endocanabinóides (Fernandez-Ruiz et al., 2012).

García-Arencibia e colaboradores (2007) mostraram, utilizando modelo de animal macho adulto com a lesão unilateral dos neurônios dopamienérgicos da via nigroestriatal, causada pela toxicidade através da aplicação 6-hidroxidopamina, que o canabidiol apresenta efeito neuroprotetor.

As ações neuroprotetoras do canabidiol foram também examinadas utilizando-se cultura de neurônios corticais de ratos expostos a níveis tóxicos de neurotransmissor excitatório glutamato. Os resultados indicaram uma redução da toxicidade do glutamato nos animais tratados com canabidiol (Hampson *et al.*, 1998). Estudos utilizando modelos animais e voluntários saudáveis também sugerem um efeito ansiolítico do canabidiol (Zuardi *et al.*, 2006).

Assim, Conte e colaboradores (2009), em um estudo utilizando 17 pacientes com esclerose múltipla, uma doença inflamatória desmielinizante do sistema nervoso central, demonstraram que o canabidiol apresenta efeito positivo na redução da dor neuropática nos pacientes.

Em um estudo utilizando um modelo experimental da doença de Alzheimer, *in vivo* e *in vitro*, demonstrou-se que a administração, tanto do canabidiol como do Win 55,212-2 um agonista canabinóide, reduziu os níveis de β -amilóide, bem como a atividade da microglia. Também mostraram que a atividade da microglia não foi reduzida quando o canabidiol e o Win55212-2 foram administrados juntamente com antagonistas dos receptores CB1 e CB2, indicando assim, que ação desses dois canabinóides parece ser independente desses receptores. (Martín-Moreno et al., 2011).

Kwiatkoski e colaboradores (2012), investigaram o efeito da administração do canabidiol (20mg/kg) em um modelo experimental de lesão na medula espinal de ratos. Observaram que o canabidiol melhorou a recuperação funcional locomotora do animal, sete dias após a lesão, além disso, o canabidiol reduziu a extensão da lesão, como mostrado na análise histológica pela expressão da proteína Fos-b, no corno ventral da medula espinal.

2 - Justificativa

Embora o sistema nervoso do neonato apresente uma maior capacidade regenerativa do que o adulto, essa regeneração também é um processo complexo e limitado. A axotomia de um nervo periférico causa uma resposta tissular complexa no SNC, afetando tanto o corpo celular quanto o microambiente circunjacente ao neurônio axotomizado e se manifesta através de diversas alterações (Moran e Graeber, 2004). Dentre elas destacam-se aquelas que ocorrem no corpo celular, denominadas cromatólise (Aldskogius e Svensson, 1993). Essas alterações observadas no neurônio lesado levam a uma mudança no seu estado funcional, onde este passa de um estado de transmissão sináptica para um estado de regeneração (Barron, 1983; Linda *et al.*, 2000). Com o intuito de evitar as sequelas e diminuir as incapacidades relacionadas às lesões no sistema nervoso, principalmente na fase neonatal, onde os neurônios apresentam uma vulnerabilidade devido à imaturidade morfológica e funcional, uma ampla variedade de substâncias tem sido estudada e utilizada. O canabidiol, um dos principais canabinóides da planta *Cannabis sativa*, apresenta uma variedade de ações, incluindo efeitos neuroprotetores, ainda pouco compreendidos. Apresenta vantagem sobre outras substâncias derivadas da mesma planta, por apresentar características não psicotrópicas, evitando muitos efeitos colaterais. Assim sendo, o melhor conhecimento de seu potencial neuroprotetor pode representar uma estratégia adicional para o tratamento de lesões neurodegenerativas, incluindo-se aquelas ocorridas no período neonatal, quando os neurônios motores medulares se mostram sensíveis à falta de contato com o órgão alvo.

3 - Objetivos

3.1-OBJETIVOS GERAIS

Investigar o efeito neuroprotetor do canabidiol sobre motoneurônios alfa medulares em ratos neonatos da linhagem Wistar, após serem submetidos à transecção do nervo isquiático.

3.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o impacto do tratamento com canabidiol (5, 15 e 30mg/kg) sobre a sobrevivência neuronal, por cinco dias (P2/P7), após a transecção do nervo isquiático;
- Avaliar a expressão de sinaptofisina (quantificação de sinapses), nos animais submetidos à transecção do nervo isquiático, tratados e não tratados com o canabidiol;
- Avaliar os efeitos do tratamento do canabidiol na expressão da proteína GFAP (glial fibrillary acidic protein), marcador da astrogliose reativa após a injúria do nervo isquiático;
- Avaliar os efeitos do tratamento do canabidiol na expressão da proteína IBA-1 (ionized calcium binding adaptor molecule) para avaliar seus efeitos sobre a microglia após a lesão do nervo isquiático;
- Analisar morte neuronal apoptótica no período pós-natal, através da técnica do TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick end labeling).

4 - Materiais e Métodos

4.1-Grupos experimentais

Para realização deste estudo foram utilizados ratos neonatos (P2) pertencentes à linhagem Wistar, obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB). Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, tendo sido aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA, protocolo nº 2371-1). Esses animais foram divididos em três grupos, sendo que um grupo foi submetido à axotomia do nervo isquiático e tratamento com o canabidiol (grupo canabidiol), um grupo submetido à axotomia e tratamento veículo (grupo PB), e um último, grupo controle, com axotomia sem tratamento (grupo sem tratamento). O lado não lesado de cada animal foi utilizado como controle interno para análise dos resultados. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Regeneração Nervosa do Departamento de Anatomia (Instituto de Biologia) com temperatura controlada (23°C) e ciclo de claro/escuro de 12h.

4.2-Procedimento cirúrgico para transecção do nervo isquiático

Os ratos foram anestesiados por hipotermia. Após incisão da pele, na região média da coxa, a musculatura dessa região foi cuidadosamente afastada, expondo-se o nervo isquiático para realização da lesão. A transecção do nervo isquiático foi realizada com uma microtesoura, sendo removido um segmento de 2mm do coto distal do nervo. A musculatura foi reposicionada e a pele suturada. Após a cirurgia, os ratos foram mantidos com a mãe no biotério do laboratório de Regeneração Nervosa do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP até o momento do sacrifício.

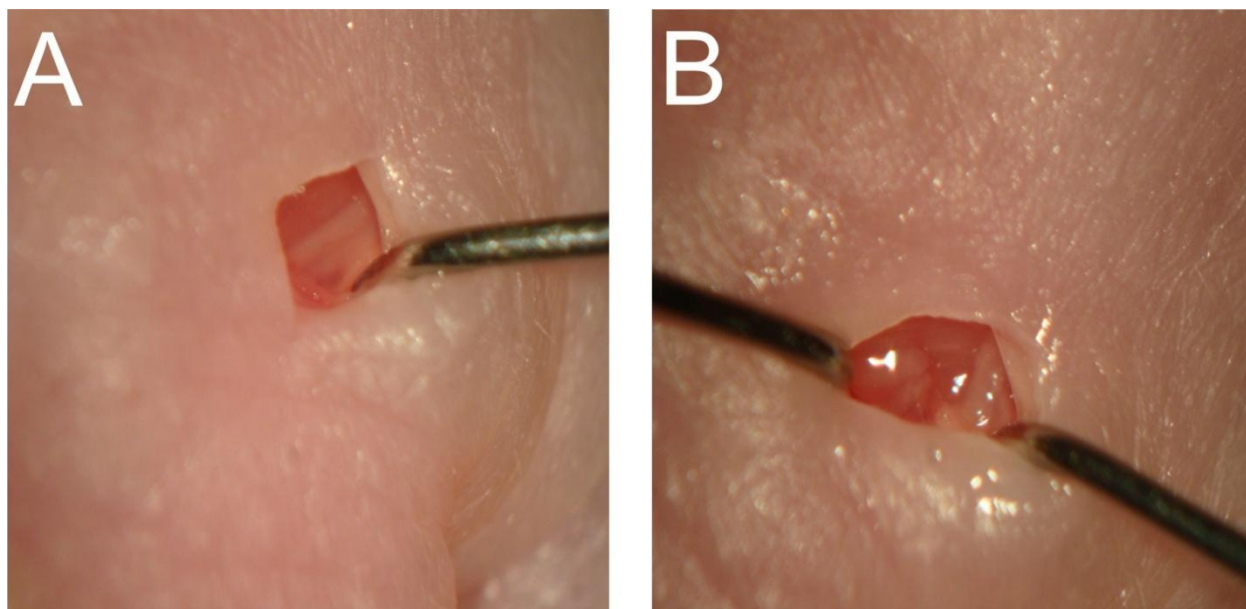


Figura 1: Procedimento cirúrgico para transecção do nervo isquiático. Em A, a incisão da pele da região póstero-medial da coxa esquerda, e o afastamento da musculatura. Em B, o nervo isquiático encontra-se exposto após a transecção e a retirada de um segmento de 2 mm do coto distal.

4.3- Preparação e administração do canabidiol

O canabidiol foi diluído em tween 2% em salina tamponada estéril (PBS) e, em seguida, aplicado, por via intraperitoneal, na concentração de 5, 15 e 30mg/kg, para a técnica de coloração de Nissl e 15mg/kg para as demais técnicas. A droga foi administrada no volume de 50 microlitros logo após a lesão por cinco dias consecutivos de P2 até P7. Os animais do grupo placebo receberam o mesmo veículo do canabidiol. O peso dos animais foi monitorado dia a dia, para o ajuste da dose.

4.4- Sacrifício dos animais

Os animais foram sacrificados em P7 (7 dias de vida), sendo perfundidos com salina tamponada seguida de formalina para a fixação, seguindo-se o protocolo de imunoistoquímica. Para isso os

animais foram anestesiados com Kensol (xilazina, 5mg/Kg) e Vetaset (quetamina, 100mg/Kg) e submetidos à toracotomia seguida de perfusão transcardíaca, com o auxílio de bomba perfusora do tipo peristáltica. Visando a lavagem total dos órgãos e vasos, primeiramente os animais foram perfundidos com uma solução salina tamponada e heparinizada (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio – PB 0,1M; pH 7,38). Em seguida, os animais destinados à análise imunoistoquímica, coloração de Nissl (contagem de sobrevivência neuronal) e técnica do TUNEL, foram perfundidos com solução fixadora (formaldeído 10% em PB 0,1M; pH 7,38). Após a fixação, o conjunto contendo a intumescência lombar e raízes nervosas foi dissecado e imerso na mesma solução fixadora por 12h, mantido a uma temperatura de 4°C. Passadas 12h, as medulas foram lavadas com PB 0,1M por 3 vezes de 5 minutos cada. Em seguida, colocadas em solução de sacarose (10, 20 e 30% em PB 0,1M) por 12h, sendo congeladas em tissue-tek e armazenadas a -20°C até a realização da microtomia.

4.5 - Imunoistoquímica

Cortes histológicos (12µm de espessura) foram obtidos em criostato (Microm HM525). As secções foram transferidas para as lâminas gelatinizadas e estocadas a -20°C até a realização das imunomarcações.

Para a realização da imunoistoquímica, as lâminas foram inicialmente climatizadas e imersas em PB 0,01M, sendo posteriormente incubadas em câmara úmida com 150µl de solução de soro fetal bovino 5% em PB por 30 minutos. A seguir, as secções foram lavadas em PB 0,01M e os anticorpos primários aplicados, com período de incubação de 18 a 24 horas. Os anticorpos primários empregados foram anti-IBA1, anti-GFAP e anti-sinaptofisina, de acordo com a Tabela 1.

Após a primeira incubação, as lâminas foram lavadas em PB 0,01M e incubadas com o anticorpo secundário conjugado Cy3 por 45 minutos. Os espécimes foram lavados em PB 0,01M e montados em glicerol/PB 0,01M (3:1), sendo observados em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TS100 acoplado a uma câmera digital Nikon DXM1200F), utilizando-se os filtros para fluoresceína ou rodamina (CY-3).

Tabela 1. Lista de anticorpos primárias utilizados para imunoistoquímica.

Anticorpo	Animal	Diluição	Fonte/nº código
Sinaptosifina	Camundongo	1:200	DakoCytomation/M 0776
GFAP	Coelho	1:1500	Abcam/7779
Iba-1	Coelho	1:700	Wako/019-19741

4.6 - Análise quantitativa da imunoistoquímica

As lâminas imunomarcadas com anti-GFAP, anti-sinaptofisina e anti- IBA1 foram observadas e documentadas com o microscópio de fluorescência invertido (Nikon-Eclipse T100) conectado a um sistema de aquisição de imagens (câmera Nikon e software Metamorph).

Para a quantificação, foram selecionadas três imagens representativas de cada animal de todos os grupos. A densidade integrada de pixels, que representa a intensidade da imunomarcção das proteínas, foi medida em 8 áreas ao redor de cada motoneurônio presente no núcleo motor lateral do corno anterior da medula espinal, para o anticorpo anti-sinaptofisina. Para os anticorpos anti-GFAP e anti-IBA-1, foi medida uma área representativa da região onde se localizava os motonêuronios medulares, da região lateral do corno ventral da medula espinal lombar, de acordo com Oliveira *et al.* (2004). Para isso, utilizou-se o software IMAGEJ (versão 1.33u, National Institutes of Health, USA). A densidade

integrada de pixels foi calculada para cada animal e então estabelecida a média para cada grupo $\pm$ erro padrão.

4.7 - Análise estatística em imunoistoquímica

Os resultados foram inicialmente avaliados através do método de análise de variância - ANOVA de uma via. Foi realizado o pós-teste Bonferroni. Em todas as análises foi considerada uma significância mínima de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

4.8 - Avaliação da Sobrevivência dos Motoneurônios medulares

Para a contagem de motoneurônios, o material foi processado da mesma maneira que para imunoistoquímica, como descrito anteriormente. Secções transversais da intumescência lombar foram coradas com corante de Nissl por 50 segundos, desidratadas, diafanizadas e, em seguida, montadas com Etellan (Merck) e lamínula. Assim, motoneurônios presentes no núcleo motor lateral do corno anterior, no lado ipsilateral (lesado) e contralateral (não lesado), foram contados em cortes alternados de cada espécime, em aproximadamente 20 secções. Toda a área lesada da intumescência lombar foi avaliada, sendo o intervalo entre as secções de 48 μ m. Apenas as células com núcleo e nucléolo visíveis foram contadas. Para corrigir contagens duplas de neurônios, devido ao fato da mesma célula poder estar presente em duas secções, foi utilizada a fórmula de Abercrombie (Abercrombie & Johnson, 1946):

$$N = nt / (t + d)$$

Onde N é o número corrigido de neurônios contados, n é o número de células contadas, t é a espessura das secções (48µm) e d é o diâmetro médio dos neurônios. Como a diferença no tamanho afeta significativamente o número de células, o valor de d foi calculado especificamente para cada grupo experimental (ipsilateral e contralateral). Neste sentido, o diâmetro dos motoneurônios, para cada grupo, foi mensurado (Image Tool software, versão 3.00) e a média calculada.

4.9 - Reação do TUNEL para detecção de células apoptóticas

A detecção dos neurônios apoptóticos foi realizada através da técnica do TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick end labeling). Para realização desta técnica, o material foi processado da mesma maneira que para imunistoquímica e para contagem de motoneurônios medulares, como descrito anteriormente.

As secções foram retiradas do freezer, aproximadamente vinte minutos previamente à utilização, para climatização. Após, foram pós-fixadas em uma solução de etanol/ácido acético (2:1) por cinco minutos a -20°C e lavadas duas vezes por cinco minutos em PBS 0,01M. As lâminas foram então transferidas para uma câmara úmida e uma solução tampão de equilíbrio (Chemicon, s7110-1) foi aplicada, sendo os espécimes incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. A solução tampão de equilíbrio foi retirada e os cortes foram incubados em uma solução de reação, contendo enzima TdT (Chemicon, s7110-4) por 30 minutos a 37°C. Em sequência, foram lavados em PBS por 10 minutos e incubados em solução de fluoresceína (Chemicon, s7110-5 e 6) por 30 minutos. As lâminas foram então lavadas e montadas com glicerol e lamínula. As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio fluorescência (Eclipse TS100, Nikon) equipado com câmera digital (DMX 1200F, Nikon).

5 - Resultados

5.1 - Efeito do tratamento com canabidiol na sobrevivência dos motoneurônios medulares

O efeito do tratamento com canabidiol foi analisado determinando-se a porcentagem de sobrevivência neuronal, sendo esta taxa a razão percentual entre o número de motoneurônios do lado ipsilateral e contralateral à lesão.

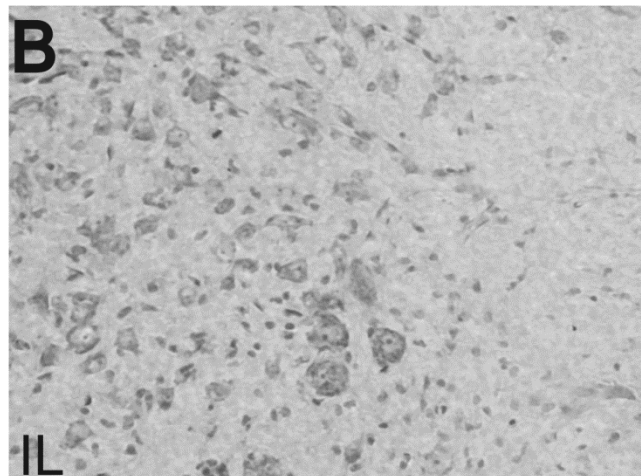
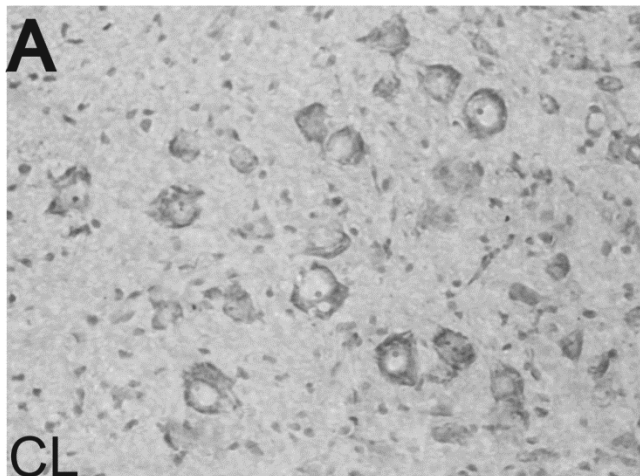
Não houve diferenças estatísticas no número absoluto de motoneurônios nos lados contralateral à lesão entre os diferentes grupos experimentais (Axotomia sem tratamento , Axotomia + veículo, Axotomia + Canabidiol 5mg, Axotomia + Canabidiol 15mg e Axotomia + Canabidiol 30 mg).

Dessa forma, foi possível uma avaliação da porcentagem de sobrevivência neuronal, em relação ao lado contralateral dos diferentes grupo experimentais.

Após cinco dias da axotomia do nervo isquiático, os animais dos cinco grupos experimentais mostraram uma redução significativa do número de motonêuronios medulares, presentes no núcleo motor lateral do corno ventral da medula espinal, do lado ipsilateral a lesão. Porém, quando comparados os cinco grupos observa-se que os grupos axotomia sem tratamento e axotomia + veículo e canabidiol 5mg/kg apresentam um número estatisticamente menor de motonêuronios do lado ipsilateral à lesão do que aos dos grupos axotomia tratados com canabidiol 15/30mg/kg (Fig. 2 e 3).

Ao se comparar os cinco grupos experimentais, calculando-se a razão percentual entre o número de motoneurônios presentes no lado ipsilateral e contralateral, as seguintes porcentagens de sobrevivência neuronal para cada grupo foram obtidas: Grupos axotomia sem tratamento 34,9%, axotomia + veículo 36,5% e axotomia + canabidiol 5mg/kg - 37% de sobrevivência e grupo axotomia + canabidiol 15/30mg/kg - 58% de sobrevivência (Figs. 2 e 3).

Axotomia



Axotomia + Placebo

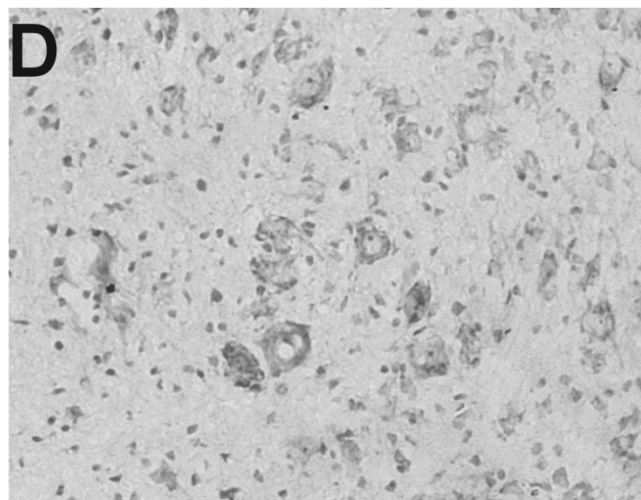
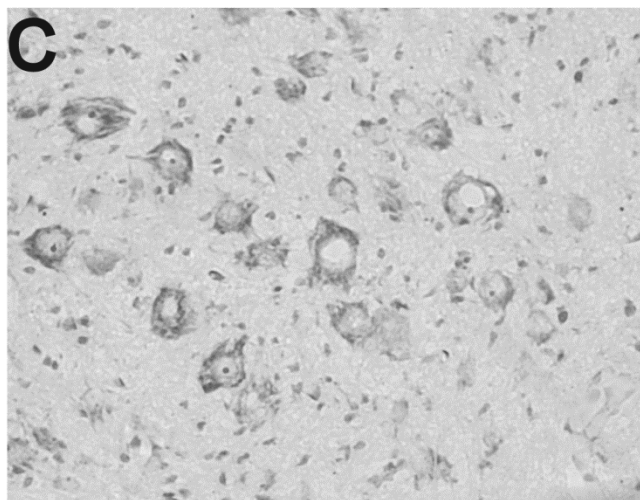
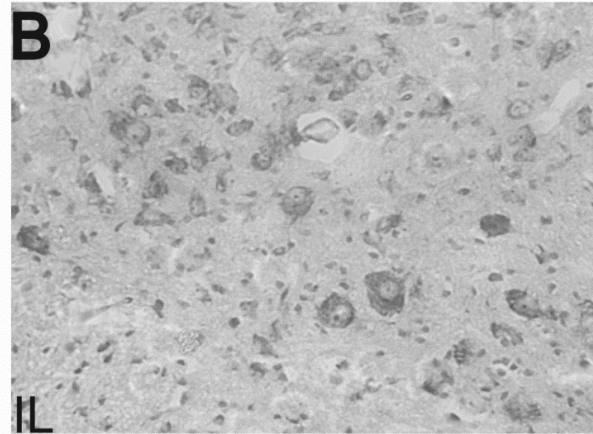
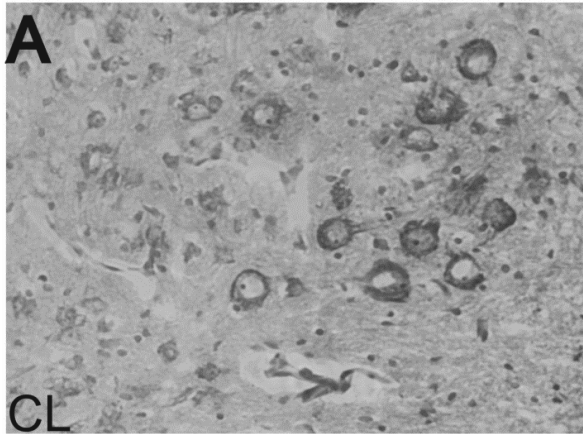
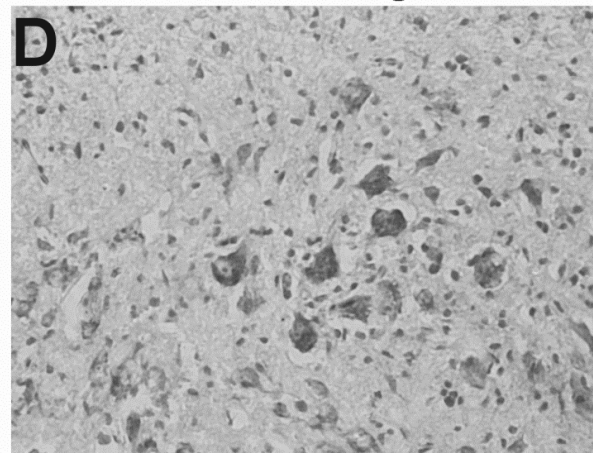
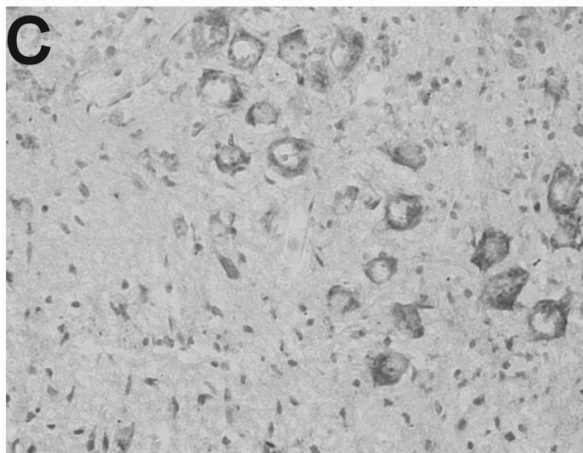


Figura 2: Cortes histológicos da região da medula lombar do núcleo motor lateral do corno ventral corados com a técnica de Nissl, cinco dias após a transecção do nervo isquiático. A, B correspondem aos lados cotralateral e ipsilateral da lesão, respectivamente, do grupo Axotomia s/ tratamento e C, D lados cotralateral e ipsilateral à lesão do grupo Axotomia + veículo. Observa-se número semelhante de neurônios motores nos dois grupos experimentais. Barra de escala = 50µm.

Axotomy + Canabidiol 5mg



Axotomy + Canabidiol 15mg



Axotomy + Canabidiol 30mg

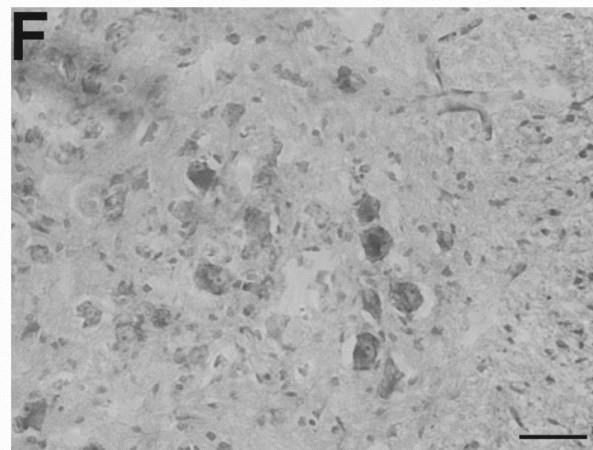
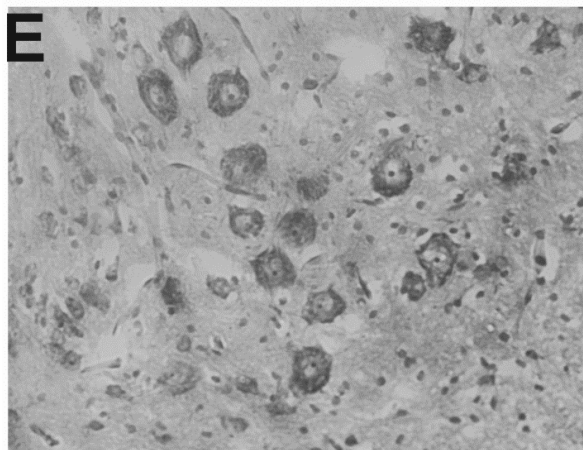


Figura 3: Efeito neuroprotetor do tratamento com canabidiol nos motonêuronios medulares, cinco dias após a transecção do nervo isquiático. Cortes histológicos da região da medula lombar do núcleo motor lateral do corno ventral, corados com a técnica de Nissl (N=6). A, B correspondem aos lados cotralateral e ipsilateral à lesão, respectivamente, do grupo Axotomia + tratamento com canabidiol 5mg/kg. C, D lados cotralateral e ipsilateral à lesão do grupo Axotomia + tratamento com canabidiol 15mg/kg e E, F - lados cotralateral e ipsilateral à lesão do grupo Axotomia + tratamento canabidiol 30mg/kg. Observa-se número maior de neurônios motores no grupo tratado com canabidiol 15/30mg/kg. Barra de escala = 50 μ m.

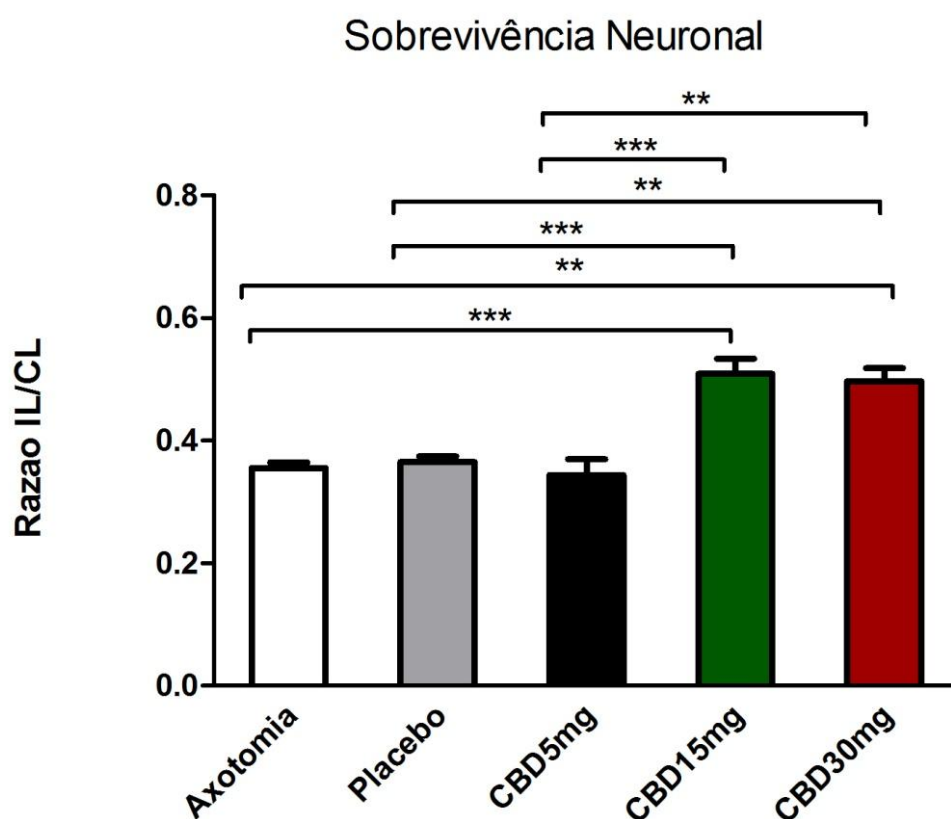


Figura 4: Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal, após cinco dias da transecção do nervo isquiático. O grupo tratado com canabidiol 15/30mg/kg apresentou aumento significativo da sobrevivência neuronal, comparativamente aos grupos não tratados (***) $p=0,0001$).

5.2 - Imunoistoquímica para proteína sinaptofisina

Para analisar as mudanças sinápticas, sejam pela sua manutenção ou pela sua redução, após a transecção do nervo isquiático, utilizou-se a técnica de imunoistoquímica, com o emprego do anticorpo primário anti-sinaptofisina. O núcleo motor lateral, do corno ventral da medula espinal foi avaliado, cinco dias após a lesão.

A figura 5 mostra que, embora após a axotomia do nervo periférico, ocorra também uma redução da quantidade de sinapses do lado contralateral à lesão, possivelmente pelas fibras que cruzam o plano mediano, entre os grupos experimentais mostrou-se uma similaridade da imunomarcacão para o lado contralateral. Já o lado ipsilateral à lesão mostrou uma diminuicão da imunomarcacão da proteína sinaptofisina nos três grupos experimentais (Fig.5), indicando uma reducão dos terminais sinápticos ao redor dos corpos dos motoneurônios medulares, cujos axônios foram transeccionados. Porém, quando comparados os grupos experimentais axotomia sem tratamento e axotomia + veículo observa-se um padrão de marcação similar. Já o grupo axotomia + canabidiol mostrou um padrão de marcação maior que os outros grupos, indicando que o canabidiol exerceu um efeito na preservacão de sinapses (Fig.5).

Estes resultados foram confirmados através da análise quantitativa da cobertura sináptica, através da densidade integrada de pixels, que reflete a intensidade da imunomarcacão. Foi calculada a razão percentual da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateral de cada grupo

experimental, grupo axotomia sem tratamento 53,88%, axotomia + veículo 62,74% e axotomia + canabidiol 77,50% ($p=0,0003$; Fig.6).

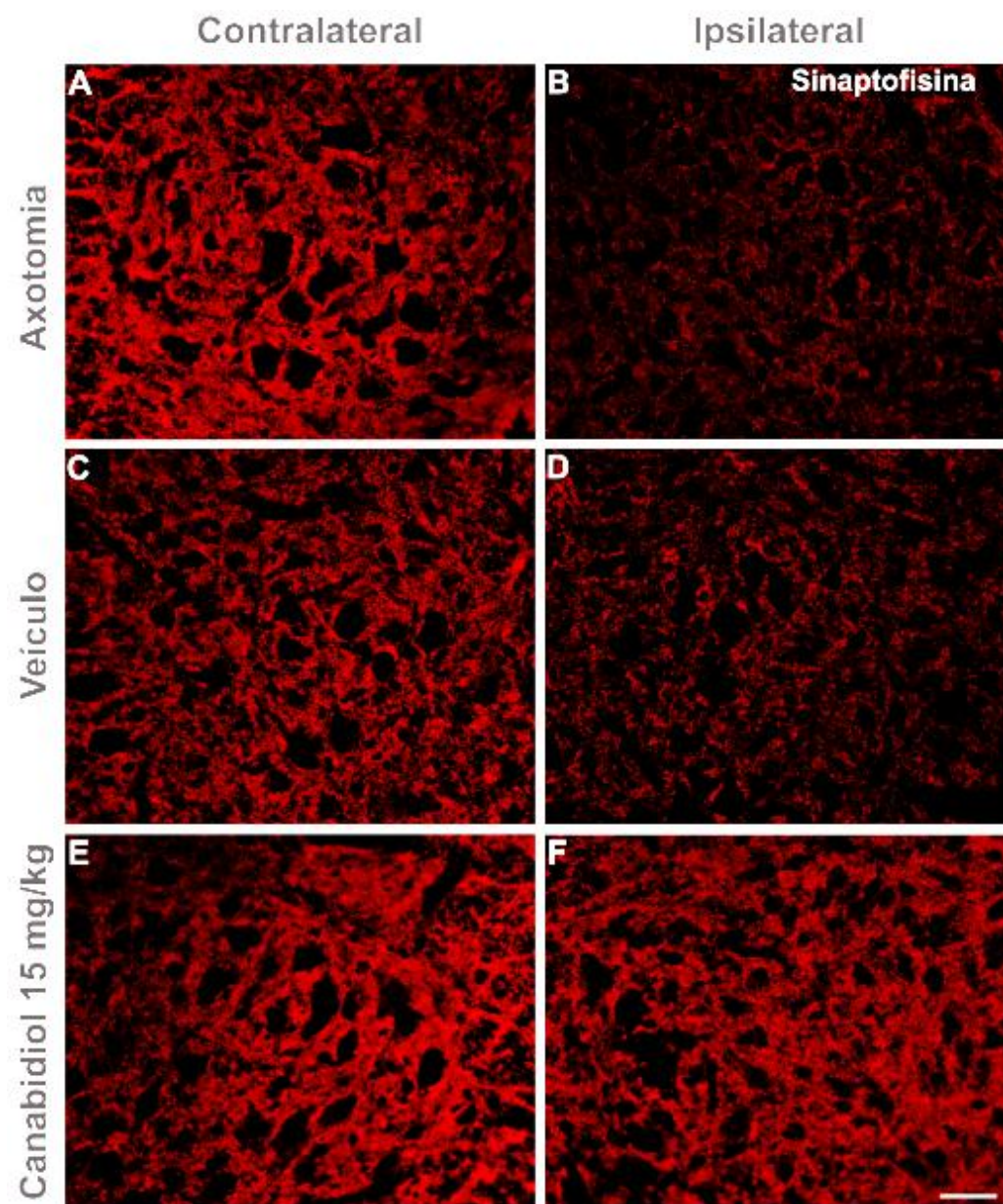


Figura 5: Análise imunoistoquímica do corno ventral da medula espinal para anti-sinaptofisina, cinco dias após axotomia do nervo isquiático. Observa-se que o padrão de inumomarcção entre os grupos axotomia sem tratamento e axotomia + veículo são similares, enquanto o grupo axotomia tratado com

canabidiol apresenta uma maior imunorreatividade, indicando que houve maior preservação das sinapses. Barra de escala = 50 μ m.

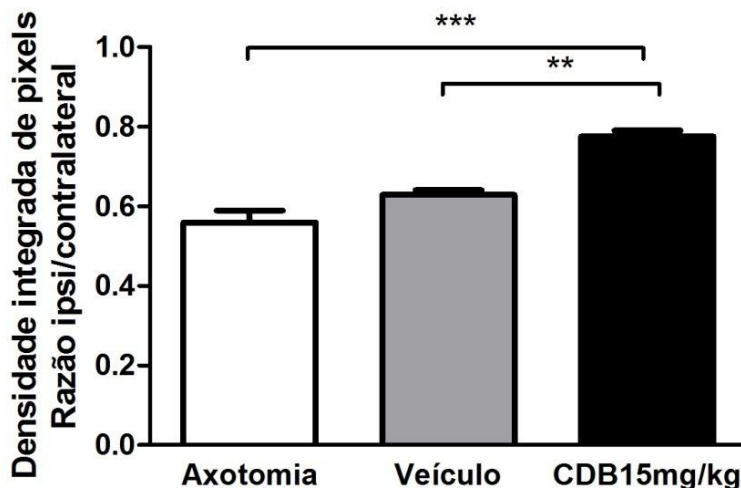


Figura 6: Representação gráfica da quantificação da cobertura sináptica, cinco dias após a lesão. Observa-se redução significativa do processo de perda sináptica, no grupo tratado com canabidiol – 15mg/Kg (***) $p=0,0003$).

5.3 - Imunoistoquímica para proteína GFAP (glial fibrillary acidic protein).

Para analisar as mudanças no microambiente ao redor dos motoneurônios medulares lesados, utilizou-se a técnica de imunoistoquímica para avaliar a imunoreatividade anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein), marcador da astrogliose reativa. A Figura 7 mostra que o padrão de imunomarcacão para expressão da proteína GFAP, marcador de reatividade astrogliar, do lado contralateral à lesão, foi igual para os três grupos experimentais. Porém, quando comparados os lados ipsilaterais, observou-se que o grupo axotomia tratado com canabidiol mostrou redução no padrão dessa imunomarcacão, indicando uma redução na astrogliose reativa.

Essa observação foi confirmada através da análise quantitativa da expressão da proteína GFAP (astroglíose reativa), através da densidade integrada de pixels, que reflete a intensidade da imunomarcação. Foi calculada a razão percentual da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateral de cada grupo experimental, axotomia sem tratamento 44,06%, axotomia + canabidiol 44,99% e axotomia + canabidiol 31,14% ($p=0,0149$; Fig.7).

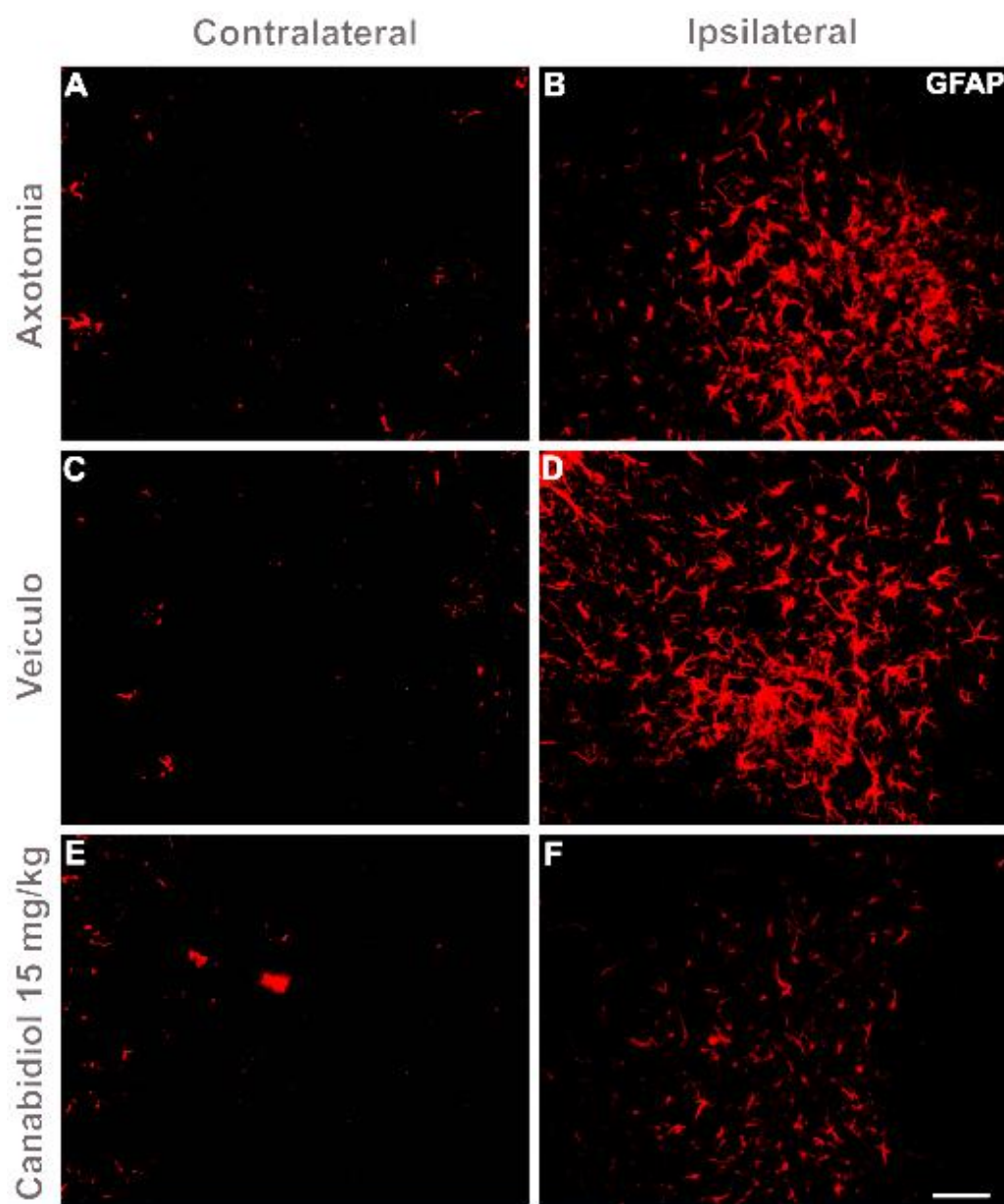


Figura 7: Imunomarcção anti-anti-GFAP, no corno anterior da medula espinal, cinco dias após a axotomia do nervo isquiático. Observa-se que o padrão de imunomarcção entre os grupos axotomia sem tratamento e axotomia + veículo são similares, enquanto o grupo axotomia, tratado com canabidiol, apresenta uma imunomarcção menos intensa no lado ipsilateral à lesão, indicando menor astrogliose reativa. Barra de escala = 50µm.

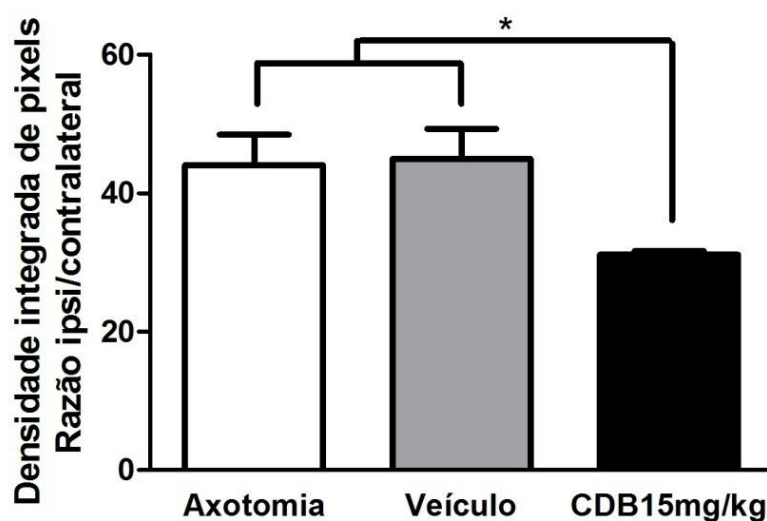


Figura 8: Representação gráfica da quantificação da astrogliose reativa, cinco dias após a lesão. Observa-se redução significativa da astrogliose reativa no grupo que foi tratado com canabidiol (* $p=0,0149$).

5.4- Imunoistoquímica para proteína Iba-1 (ionized calcium binding adaptor molecule).

Para analisar as mudanças no microambiente ao redor dos motoneurônios medulares em relação à resposta microglial, avaliou-se a expressão da proteína Iba-1 (ionized calcium binding adaptor molecule), marcador desse tipo celular.

A Figura 9 mostra que o padrão de imunomarcção para expressão da proteína Iba-1, do lado contralateral à lesão foi similar para os três grupos experimentais. Contudo, quando comparados os

lados ipsilaterais, observou-se que o grupo axotomia tratado com canabidiol mostrou uma redução no padrão dessa imunomarcção, o que indica redução na microgliose.

Esta observação foi confirmada através da análise quantitativa da expressão da proteína Iba-1, através da densidade integrada de pixels, que reflete a intensidade da imunomarcção. Foi calculada a razão percentual da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateral de cada grupo experimental, axotomia sem tratamento 35,77%, axotomia + veículo 34,17% e axotomia + canabidiol 25,36% ($p=0,0086$; Fig.9).

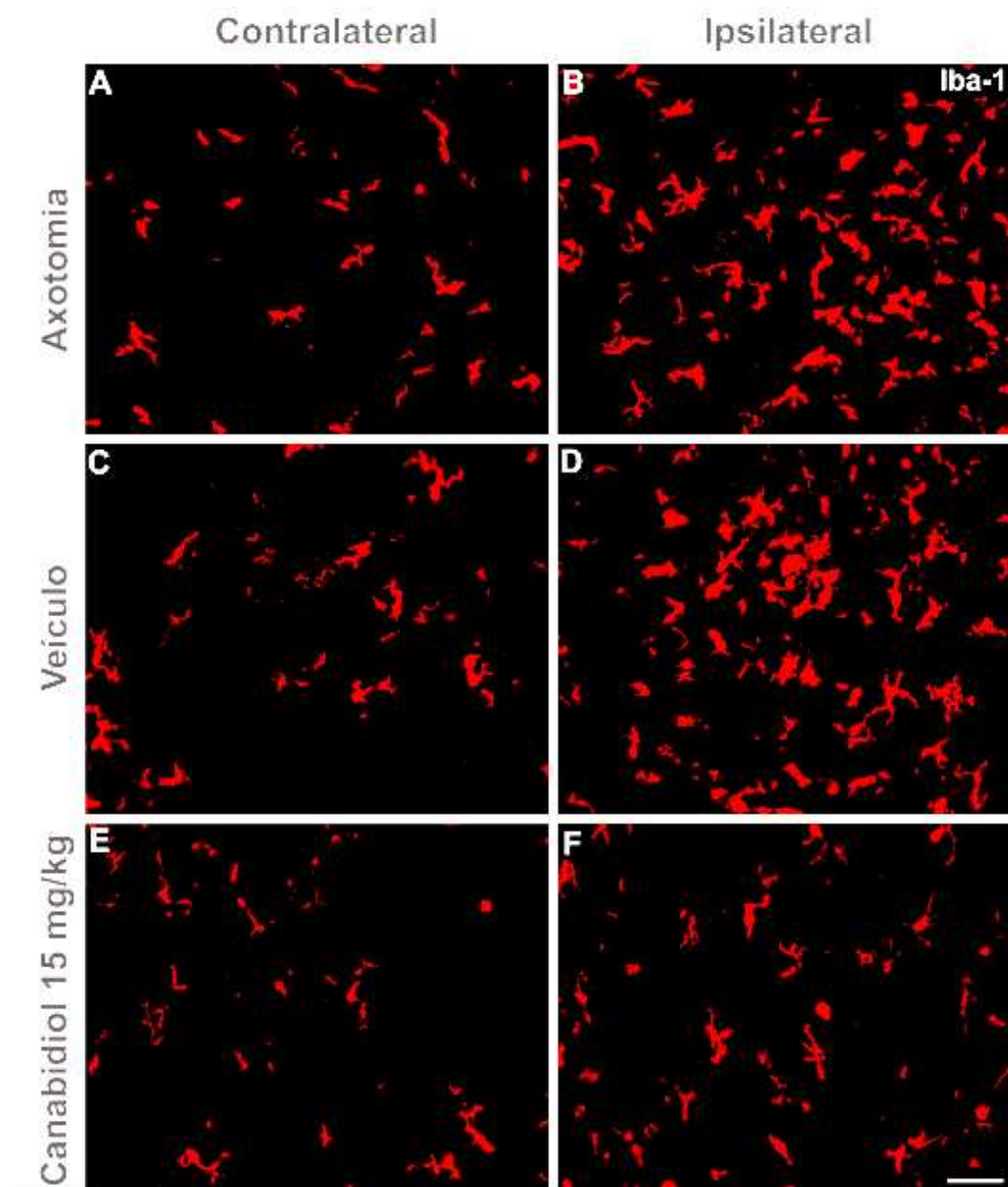


Figura 9: Imunoreatividade anti-Iba-1 no corno ventral da medula espinal, cinco dias após a axotomia do nervo isquiático. Observa-se que o padrão de inumomarcção, entre os grupos axotomia sem tratamento e axotomia + veículo são similares, enquanto o grupo axotomia tratado com canabidiol apresenta uma inumomarcção menos intensa. Tal fato indica que houve redução da reação microglial, em resposta ao tratamento com canabidiol. Barra de escala = 50 μ m.

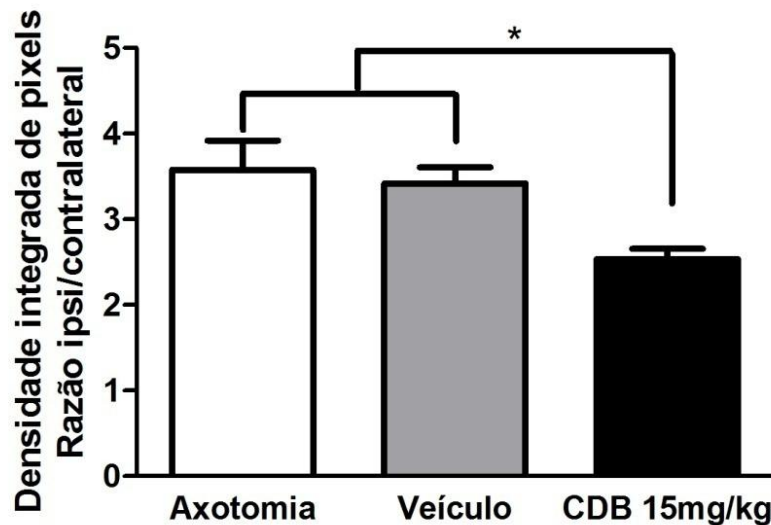


Figura 10: Representação gráfica da quantificação da microgliose reativa, cinco dias após a lesão. Observa-se uma redução significativa da imunoreatividade anti-Iba-1 no grupo que foi tratado com canabidiol (** $p=0,0086$).

5.5 - Reação do TUNEL para detecção de células apoptóticas

Para analisar a morte neuronal apoptótica pós-natal, seguida da transecção do nervo isquiático, utilizou-se a reação de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick end labeling), que marca células em possível processo apoptótico. As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio fluorescência (Eclipse TS100), equipado com câmera digital (DMX 1200F) e conectado a um sistema de aquisição de imagens (software Metamorph).

Para análise da presença de células apoptóticas, foram capturadas seis imagens que correspondentes, repectivamente, às regiões ventral, média e dorsal dos lados contralateral e ipsilateral à lesão, na região

lombar da medula espinal de cada um dos animais (n=4/grupo) dos diferentes grupos experimentais. Dessa forma buscou-se representar toda a medula lombar e não somente a região do grupo dos motonêuronios lesados, como mostram as Figuras 11,12 e 13. Tal abordagem se justifica uma vez que, na fase neonatal, a transecção de nervo periférico leva não só a morte dos motonêuronios axotomizados, mas também de internêuronios medulares, possivelmente pela sua dependência de conexões sinápticas e fatores neurotróficos.

Através dessas imagens foi feita uma análise quantitativa da presença de células apoptóticas em cada grupo experimental. Ao se comparar os três grupos experimentais, observou-se que o grupo axotomia + canabidiol apresenta menor número 25% de células em processo de apoptose na região média da medula, (Figs.11,12,13).

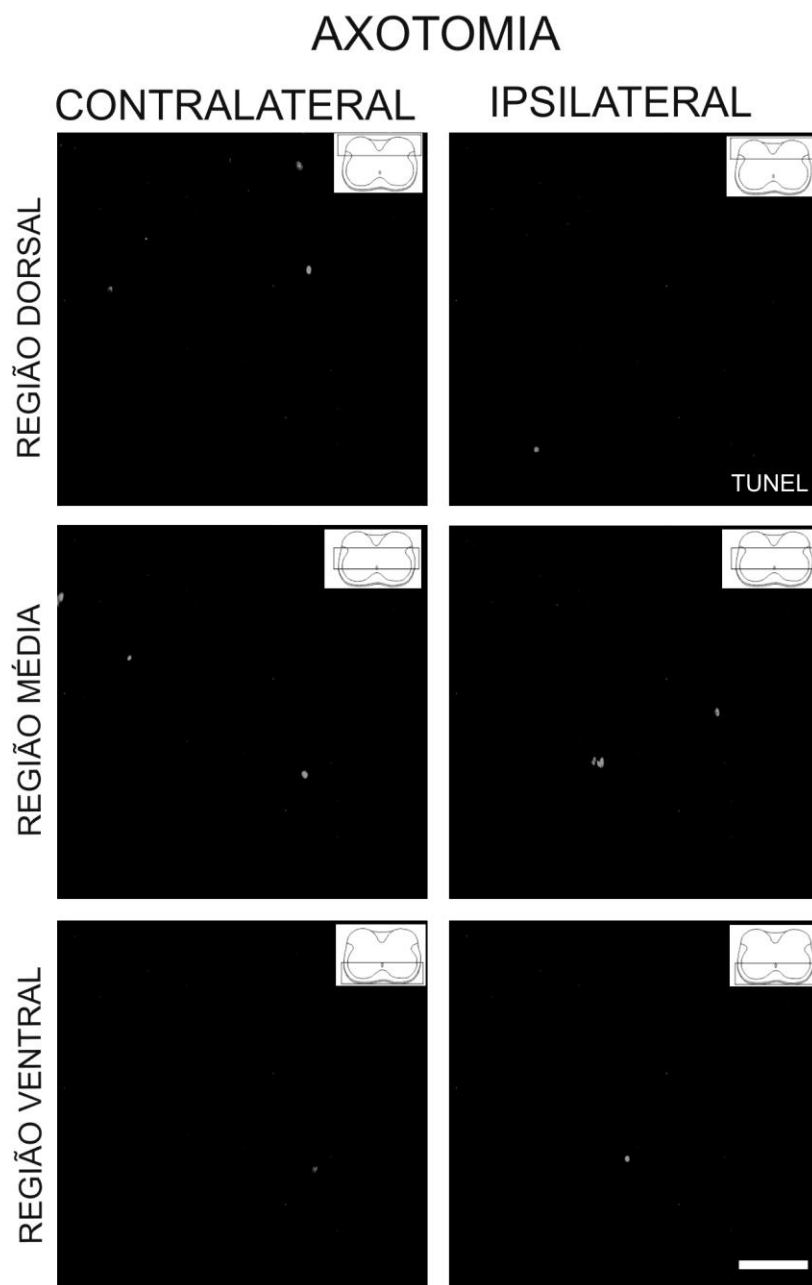


Figura 11: Análise da reação de TUNEL nas regiões ventral, média e dorsal do lado contralateral e ipsilateral à lesão, no grupo axotomia sem tratamento. Observa-se a presença de células em processo de apoptose nas regiões dos lados ipsilateral e contralateral à lesão. Barra de escala = 50 μ m.

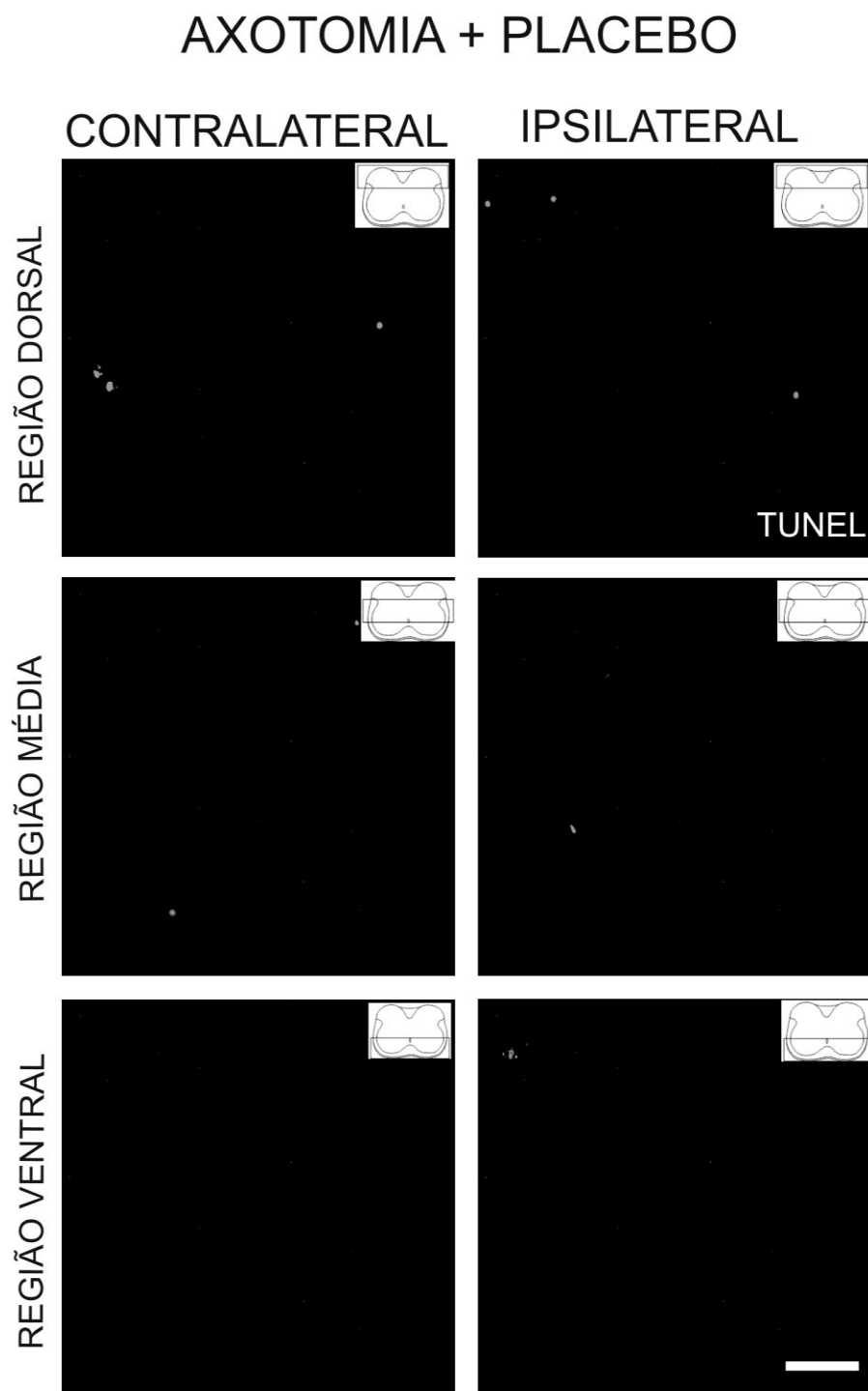


Figura 12: Análise da reação de TUNEL nas regiões ventral, média e dorsal do lado contralateral e ipsilateral à lesão no grupo axotomia + veículo. Observa-se a presença de células em processo de apoptose nas regiões dos lados ipsilateral e contralateral à lesão. Barra de escala = 50 μ m.

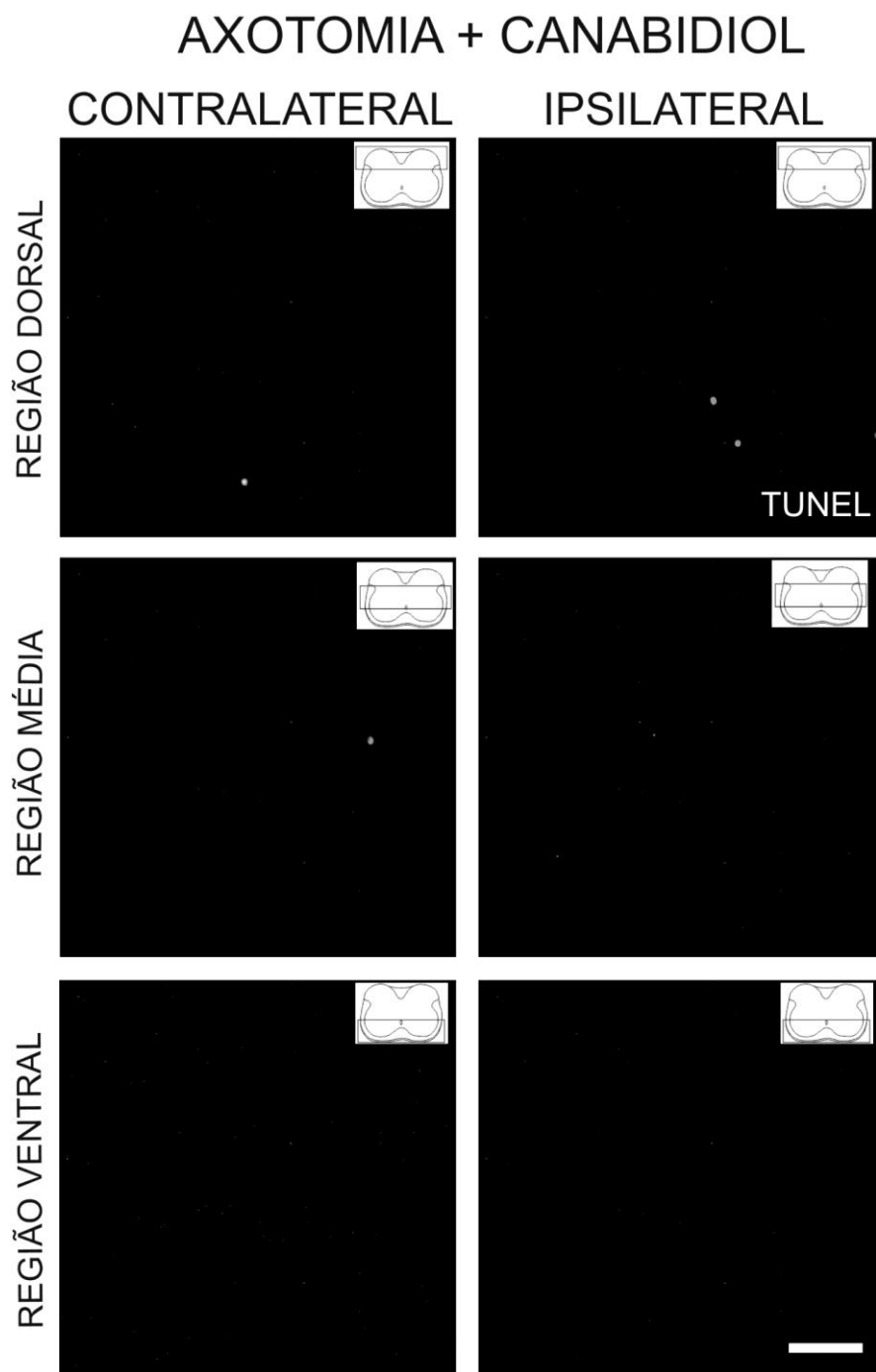


Figura 13: Análise da reação de TUNEL nas regiões ventral, média e dorsal do lado contralateral e ipsilateral à lesão no grupo axotomia + tratamento canabidiol. Observa-se a menor presença de células em processo de apoptose nas nos lados ipsilateral e contralateral à lesão, comparativamente aos grupos controle. Barra de escala = 50 μ m.

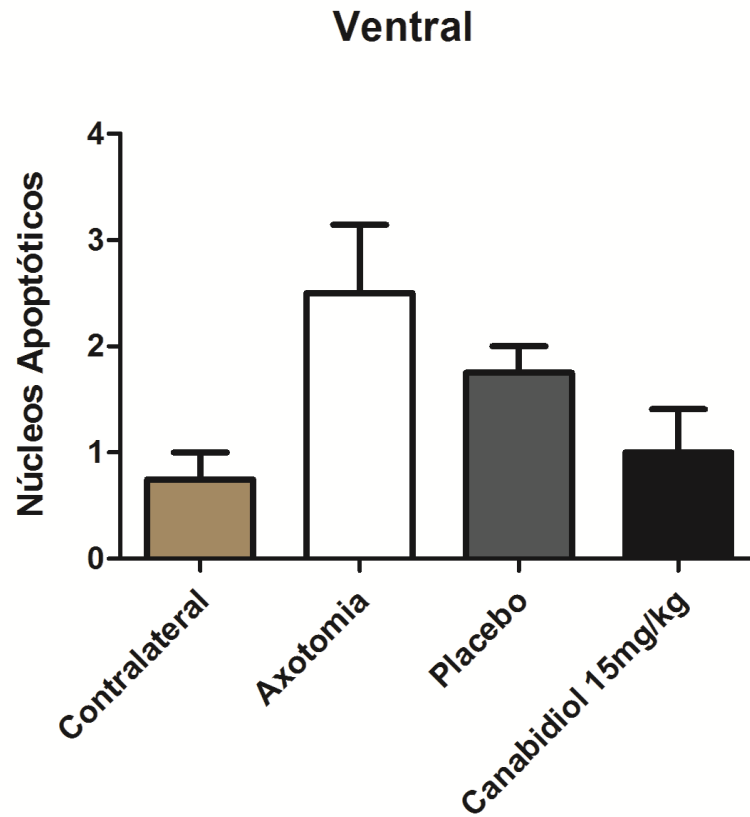


Figura 14: Representação gráfica do numero de células em apoptose na região ventral da medula espinal, cinco dias após a lesão. Observa-se que não houve redução significativa entre os grupos experimentais.

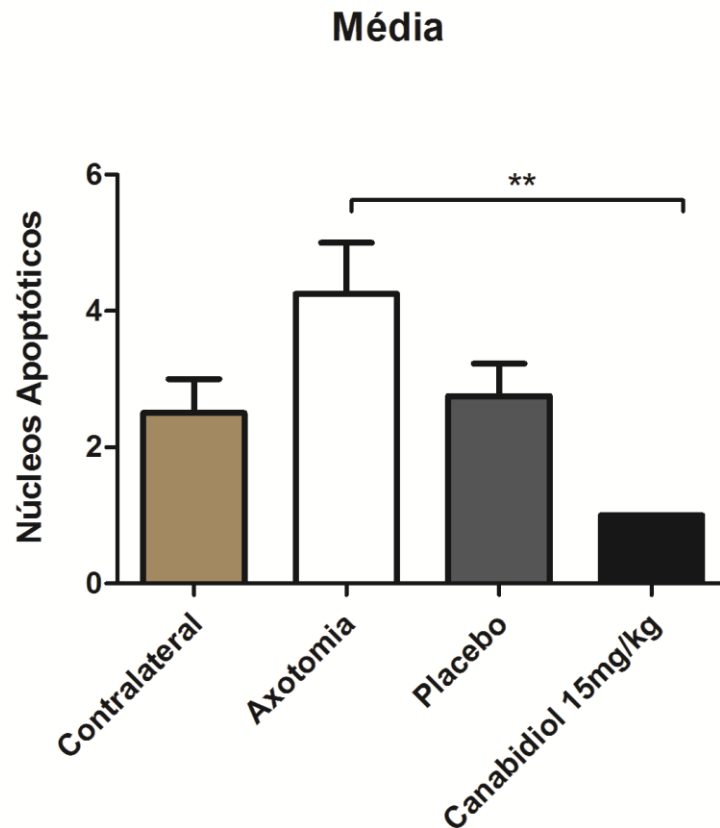


Figura 15: Representação gráfica do numero de células em apoptose na região média da medula espinal cinco dias após a lesão. Observa-se que houve redução significativa no número de células em apoptose entre o grupo tratado com canabidiol e o grupo axotomia sem tratamento (** $p=0,0063$).

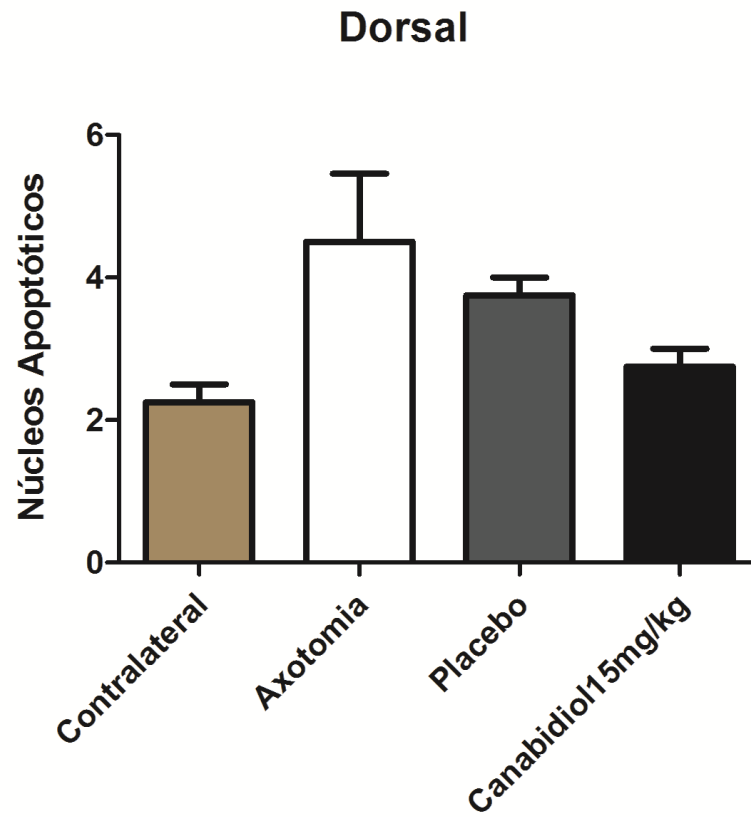


Figura 16: Representação gráfica do numero de células em apoptose na região dorsal da medula espinal, cinco dias após a lesão. Observa-se que não houve redução significativa entre os grupos experimentais.

6 - Discussão

O Sistema Nervoso (SN) está sujeito a diversos tipos de danos e lesões, seja por fatores extrínsecos ao organismo, como acidentes e traumas ou por fatores intrínsecos, como por exemplo, doenças neurodegenerativas. Embora o SN apresente certa capacidade regenerativa, esta apresenta-se limitada, muitas vezes deixando sequelas e alterações que podem ser irreversíveis, levando até mesmo à incapacidade (Moran e Graeber, 2004). Embora na fase neonatal, o SN apresente maior capacidade regenerativa, também está sujeito a diversas situações que levam a degenerações permanentes. Além disso, nesta fase, os neurônios ainda se apresentam imaturos morfológica e funcionalmente (Lowrie *et al.*, 1994), de forma que tais situações também podem levar as células do SN à morte. Ainda nesta fase, também ocorre morte celular programada de uma parcela significativa dos neurônios que são gerados em excesso, através do processo de apoptose (Oppenheim & Chu-Wang, 1978; Oppenheim, 1991).

Para entender melhor esses mecanismos complexos, que atingem tanto os neurônios lesados como seu microambiente, diversos modelos experimentais têm sido propostos; dentre eles, a transecção de nervo periférico (Lieberman, 1971; Chen, 1978; Reisert *et al.*, 1984; Aldskogius e Svensson, 1993). Do mesmo modo, diferentes tratamentos também têm sido estudados, no intuito de intervir nesses tipos de lesões. Dentre eles, algumas substâncias se apresentaram promissoras como, por exemplo, derivados canabinóides, como o canabidiol, principal componente não-psicotrópico da resina das glândulas encontradas na superfície das folhas da planta *Cannabis sativa* (Scuderi *et al.*, 2009).

No presente trabalho, foi utilizado o modelo de transecção do nervo isquiático para estudar os mecanismos e eventos que ocorrem após uma lesão axonal periférica. Wolf e Missler (1992) relataram que a transecção do nervo isquiático causa a morte dos motonêuronios espinais em ratos recém-nascidos e que esse tipo de morte ocorre predominantemente por apoptose. Esses dados são semelhantes aos encontrados em nosso trabalho, que mostrou, através da técnica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), a presença de células em processo de apoptose nos cortes transversais da medula espinal, em nível lombar. Outro fato importante é que a axotomia do

nervo isquiático leva não só à morte dos motonêuronios medulares, mas também de internêuronios medulares, como mostrado em outros trabalhos (Oliveira *et al.*, 1997; Lawson & Lowrie, 1998). Em nosso estudo também se pôde observar, através da técnica de TUNEL, a presença de células em processo de apoptose em outras regiões da medula, como a região dorsal e média, onde é característica a presença de interneurônios. O presente trabalho mostrou, mais uma vez, que o grupo que recebeu o tratamento com canabidiol apresentou um menor número de células em processo de apoptose.

Interessantemente, demonstramos que o grupo experimental que recebeu o tratamento com o canabidiol, apresentou menor número de células em processo de apoptose na região média da medula espinal, em relação ao grupo controle. Essa região corresponde às lâminas IV a VI de Rexed e contém interneurônios que contribuem para a integração sensório-motora. Esses recebem inputs dos neurônios sensitivos, presentes nos gânglios dorsais e fazem sinapse com os motoneurônios presentes na lâmina IX. A preservação desses interneurônios é, portanto, de grande importância para a recuperação funcional dos circuitos medulares, após uma lesão que gere perda neuronal. Estudos subsequentes serão necessários para comprovar essa hipótese. Neste aspecto, o modelo de esmagamento do nervo isquiático será uma alternativa mais adequada, pois permitirá a regeneração axonal em direção ao órgão alvo.

No presente estudo, optamos pelo emprego da transecção e ressecção de um segmento do coto distal. Isto impede que o mesmo tenha influência sobre a resposta retrógrada resultante da axotomia. Assim, fica mais evidente a eficácia da droga ou molécula a ser avaliada como neuroprotetora.

Os canabinóides podem ter efeitos na plasticidade sináptica, como já relatado por Kim e Thayer (2001). Isso foi observado, pois drogas canabinóides inibiram a atividade da adenilato ciclase e prejudicaram a memória (Hampson e Deadwyler., 1998; Heyser et al., 1993). Também, através de outro estudo, utilizando modelo experimental em ratos Wistar adultos, pesquisadores avaliaram as mudanças morfológicas causadas pela administração crônica de um agonista canabinóide sintético, o

WIN 55,212-2, em diferentes regiões do sistema nervoso (hipocampo, córtex frontal, corpo striatum e cerebelo). Demonstraram, através de microscopia eletrônica e imunoistoquímica, que a administração deste não levou ao aumento na expressão de GFAP, marcador da astrogliose reativa, em nenhuma das regiões analisadas. Por outro, lado foi observado aumento na expressão da proteína sinaptofisina, assim como do número de vesículas sinápticas no cerebelo e hipocampo. Os resultados obtidos nesse estudo fornecem evidências que os canabinóides produzem um efeito neuroprotetor a longo prazo, em diferentes modelos de lesão do sistema SNC (Tagliaferro et al., 2006). Wolff e Missler (1992) relataram que a apoptose dos motoneurônios axotomizados pode estar associada ao processo de eliminação sináptica, que é uma reação característica do neurônio após a axotomia.

Os presentes resultados também mostraram, através da análise da expressão da proteína sinaptofisina, que a imunomarcagem foi menor no lado ipsilateral à lesão do que no lado contralateral nos três grupos experimentais. Interessantemente, no grupo que recebeu o tratamento com o canabidiol, a expressão da proteína sinaptofisina foi maior no lado ipsilateral, quando comparado aos grupos que não foram tratados, indicando uma maior preservação sináptica. Tal achado pode ser interpretado de diferentes formas. Uma delas é que o canabidiol atua sobre os neurônios pré-sinápticos e sobre os próprios motoneurônios de forma neuroprotetora, levando à manutenção de sinapses. Outra alternativa é que o canabidiol tenha reduzido a perda natural de inputs, que ocorre durante a primeira semana pós-natal, durante a fase de ajuste fino dos circuitos medulares. Em ambos os casos, acreditamos que tal preservação seja positiva e propicie melhor regeneração axonal subsequente.

Um aspecto que precisa ser melhor avaliado, em análises futuras, é se o canabidiol apresenta algum tipo de seletividade em relação à preservação de inputs excitatórios ou inibitórios. Sabe-se que a presença excessiva de terminações excitatórias, após axotomia, pode levar à excitotoxicidade por glutamato, desencadeando vias pró-apoptóticas. A eliminação seletiva desses terminais tem sido mostrada como fundamental para a preservação de motoneurônios em diferentes situações de lesão. Por

outro lado, uma forma de minimizar os efeitos excitotóxicos de terminações glutamatérgicas, é a preservação de um maior número de sinapses inibitórias, glicinérgicas e/ou GABAérgicas. É possível que o canabidiol tenha um efeito seletivo sobre a estabilização de tais inputs, tendo-se em vista a melhor sobrevivência neuronal observada após sua administração.

Os mecanismos pelos quais o canabidiol exerce seus efeitos neuroprotetores ainda não são bem compreendidos. Uma hipótese é que possa ter efeito anti-inflamatório e antioxidante, como já demonstrado (Hampson et al, 1998;. Pertwee, 2004;. Mechoulam et al, 2007). Embora os efeitos do canabidiol possam estar ligados aos receptores canabinóides CB1 e CB2 (Howlett, 2002), essa ação também pode ser independente dos mesmos. Sabe-se que ativação de tais receptores canabinóides, que são receptores acoplados a uma proteína G, inibe a enzima adenilato ciclase, aumentando a atividade de canais de potássio e inibindo canais de cálcio, modulando, desta forma, a liberação de outros neurotransmissores (Piomelli et al, 2003).

Kaminski e Cols (1992) indentificaram a presença de receptores canabinóides CB1 e CB2 no baço, e Specter e Coffey (1993) indentificaram esses mesmos receptores em linfócitos, agindo como imussupressores nesse sistema. Nesse sentido, no presente trabalho também foi constatado que o grupo axotomizado e tratado com canabidiol apresentou menor reatividade tanto astrocitária como microglial, quando comparada aos animais que não receberam tratamento, indicando, assim, que essa molécula pode exercer uma ação inibitória da gliose reativa. Na mesma linha de raciocínio, HSIN-YING et.al. (2012) utilizaram um modelo experimental *in vitro* de cultura primária de microglia de ratos para avaliar o efeito pró-apoptótico do canabidiol. Através de citometria de fluxo e da técnica de TUNEL, demonstraram que o tratamento com canabidiol induziu um aumento no número de células com DNA fragmentado e ativação de caspase 8 e 9. Apesar de não termos evidenciado aumento de TUNEL marcação, é possível que tais efeitos tenham se refletido numa menor quantidade de células microgliais reativas.

Nesse aspecto, é importante ressaltar que tanto os astrócitos como a microglia apresentam receptores CB1 e CB2 e atuam como fagócitos durante a evolução do processo pós-lesão. Além disso, tanto astrócitos como microglia têm sido ligados ao processo de eliminação de sinapses. Assim, a diminuição de tal reatividade glial pode, adicionalmente a um efeito direto sobre os próprios neurônios, ter indiretamente contribuído para a estabilização sináptica no microambiente medular após a lesão periférica.

García-Arencibia e colaboradores (2007), em um trabalho usando um modelo experimental de doença de Parkinson, através da aplicação local de 6-hidroxidopamina, mostraram que essa indução levou à morte de grande parte dos neurônios nigroestriatais dopaminérgicos e que aplicação do canabidiol, logo após a indução, gerou um efeito neuroprotetor, possivelmente pela sua ação antioxidante. Possivelmente, esse efeito pode ser independente de receptores canabinóides. Tais resultados reforçam os obtidos no presente estudo que mostrou que os animais que receberam o tratamento com canabidiol nas doses de 15 e 30 mg/Kg, por cinco dias consecutivos, logo após a transecção do nervo isquiático, apresentaram maior sobrevivência neuronal.

Em outro estudo, usando um modelo *in vivo* de hipóxia isquêmica em ratos Wistar neonatos, pela ligadura da artéria cerebral média, ativação de receptores canabinóides foram implicados no processo degenerativo. Esses achados foram comprovados por ressonância magnética e reforçados por análise histológica, utilizando coloração de Nissl. Para avaliar se tais efeitos eram dependentes dos receptores canabinóides CB1 e CB2, um agonista canabinóide (Win55212-2) sozinho ou combinado com antagonistas de receptores canabinóides CB1 e CB2 foram administrados. Os resultados mostraram que administração do canabidiol reduziu em 66% a perda neuronal e que a administração tanto de antagonista do receptor CB1, quanto antagonista do receptor CB2, reverteram à ação de Win55212-2. Isso demonstra que sua ação parece ser dependente desses receptores canabinóides (Fernández-López *et al.*, 2007). Tais dados são relevantes e podem estar associados com os achados de nosso trabalho,

onde, analisando a sobrevivência dos motonêuronios medulares após a axotomia do nervo isquiático, foi mostrado que os animais tratados com canabidiol apresentaram sobrevivência 30% maior dos motonêuronios medulares.

Castillo e colaboradores (2010), em outro estudo também utilizando um modelo experimental de hipóxia isquêmica, porém *in vitro*, obtiveram resultados semelhantes aos acima descritos. Adicionalmente, porém, demonstraram que o canabidiol diminui os níveis de caspase-9 (via pró-apoptótica), reduz a expressão de glutamato (excitotoxicidade glutamatergica), a concentração de TNF- α , COX-2 e iNOS. Porém, a administração do antagonista do receptor CB1 não reverteu à ação do canabidiol. Por outro lado, o emprego do antagonista do receptor CB2 reverteu seu efeito. Esses dados reforçam os encontrados em nosso trabalho mostrando que o canabidiol pode exercer seu efeito neuroprotetor por atuar tanto em receptores canabinóides CB1 e CB2 ou por atuar independentemente desses receptores, exercendo seus efeitos nas diversas etapas que levam a morte celular. Contudo, experimentos complementares deverão ser realizados em nosso laboratório para comprovar tais suposições.

Em um estudo utilizando um modelo experimental de diabetes em ratos adultos, pesquisadores mostraram que o canabidiol protege neurônios da retina de degenerarem, através da inibição da formação de espécies reativas de oxigênio, que promovem a formação de nitrato de tirosina. O nitrato de tirosina, por sua vez, promove o acúmulo de glutamato na retina levando a morte das células neuronais. Foi mostrado, através da técnica de TUNEL que o canabidiol reduziu a morte dos neurônios, eliminando quase completamente a formação de nitrato de tirosina. A redução na morte das células neuronais também foi confirmada pela técnica de imunistoquímica para caspase-3. Nesse trabalho também foi demonstrado que o tratamento com canabidiol reduziu a reatividade astrogliar (El-Remessy et al., 2010). Esses resultados reforçam os encontrados em nosso estudo, que mostrou que o canabidiol reduz a morte por apoptose dos neurônios da região média da medula espinal, quando comparado ao

grupo controle. Além disso, também corroboram nossos achados demonstrando que o canabidiol reduz a reatividade dos astrócitos, em comparação aos outros grupos experimentais.

Pazos e colaboradores (2012) avaliaram o efeito neuroprotetor do canabidiol em um modelo experimental de hipóxia cerebral isquêmica, utilizando ratos Wistar neonatos, pela privação de oxigênio e glicose através redução do fluxo sanguíneo. Observaram que a hipóxia isquêmica leva a um prejuízo funcional e que o tratamento com canabidiol, 30 dias após a lesão, levou os animais experimentais a apresentarem um comportamento funcional semelhante ao grupo controle. Ainda mostraram, utilizando as técnicas de Western Blotting e ressonância magnética, que o canabidiol reduziu o volume da lesão em 14%, 34 dias após a lesão, e 30% sete dias após a lesão. A análise histológica também mostrou que o canabidiol reduz o número de neurônios necróticos, quando comparado ao grupo controle. Concluíram, portanto, que o efeito neuroprotetor do canabidiol também está associado à modulação do estresse oxidativo, inflamação e excitotoxicidade. Esse resultados estão de acordo com os encontrados em nosso trabalho onde os grupos tratados com canabidiol mostraram maior sobrevivência neuronal 5 dias após a lesão e menor marcação TUNEL positiva. O canabidiol foi aprovado no tratamento de inflamação, dor e espasticidade associadas à esclerose múltipla, doença neurodegenerativa caracterizada pela desmielinização e perda de oligodendrócitos. Isto se baseia na comprovada capacidade do canabidiol em preservar células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs). Assim, diferentes doses de CDB protegeram OPCs do estresse oxidativo através da diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio. Seu emprego também protegeu as OPCs de apoptose induzida LPS/IFN γ , através da inibição da indução da via caspase-3. Adicionalmente, a ação da tunicamicina, que leva à morte das OPCs, foi atenuada pelo canabidiol, sugerindo um papel desse canabinóide na modulação do estresse do retículo endoplasmático (Mecha et al., 2012).

Os resultados acima descritos podem reforçar aqueles de nosso trabalho que mostrou redução da reatividade microglial e astrogial, características do processo inflamatório no sistema nervoso após a injúria.

Levando-se em conta os resultados de nosso estudo, conjuntamente com os achados da literatura, reforçamos os efeitos neuroprotetor e anti-apoptótico do canabidiol, além de seu potencial anti-inflamatório e redutor da gliose reativa. Ressaltamos que estudos complementares acerca da seletividade, em relação à preservação sináptica, bem como o emprego de modelos experimentais de regeneração nervosa, serão de fundamental importância no sentido de substanciar o possível emprego dessa molécula em condições clínicas, em pacientes com lesões nervosas centrais e periféricas.

7 - Conclusões

- O tratamento com canabidiol 15/30mg/Kg promoveu neuroproteção, demonstrada pela significativamente superior sobrevivência de motoneurônios medulares.
- O tratamento com canabidiol promoveu maior preservação das sinapses medulares (~30%), quando comparado aos outros grupos experimentais.
- A administração de canabidiol resultou em diminuição da astrogliose reativa (~30%) e da reação microglial (~27%), com impacto positivo sobre a preservação sináptica no microambiente dos neurônios motores.
- Tratamento com canabidiol resultou em menor número de células em processo de apoptose na região média da medula, local que contém interneurônios com função de integração sensório-motora.
- O canabidiol apresenta-se como uma droga neuroprotetora, com diferentes efeitos positivos sobre o SNC após lesão, se constituindo numa alternativa para o tratamento de condições patológicas que levem à perda neuronal.

8 - Referências Bibliográficas

Aldskogius, H.; Svensson, M. Neuronal and glial responses to axon injury. In: MALHOTRA, S.K. (ed.) **Advances in structural biology**. (vol 2), JAI Press, Greenwich, p. 191-223, 1993.

AREVALO-MARTIN, A; GARCIA-OVEJERO, D; SIERRA-PALOMARES, Y; PANIAGUA-TORIIA, B; GONZALEZ-GIL, I; ORTEGA-GUTIERREZ, S; MOLINA-HOLGADO, E. Early Endogenous Activation of CB1 and CB2 Receptors after Spinal Cord Injury Is a Protective Response Involved in Spontaneous Recovery. **Plos One**. November 2012, Volume 7, Issue 11, e49057.

Asada, H., Ip, N.Y., Razack, N., Parfitt, M.N., Plunkett, R.J. (1995) Time course of ciliary neurotrophic factor mRNA expression is coincident with the presence of protoplasmic astrocytes in traumatized rat striatum. *J. Neurosci. Res.*, **40**, 22-30.

Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ. The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol* 2003;2:291–8.

Barron, K.D. Comparative observations on the cytologic reactions of central and peripheral nerve cells to axotomy. In: Kao, C.C.; Bunge, R.P.; Reier, P.J. (eds.). **Spinal cord reconstruction**, New York: Rave Press, p.7-39, 1983.

Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V. Fatty acid amide hydrolase, na enzyme with many bioactive substrates. Possible therapeutic implications. *Curr Pharm Des*. 2002;8:533-547.

Bisogno T, Howell F, Williams G, et al. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 2003;163:463-468.

BOOZ, G. W. Cannabidiol as an Emergent Therapeutic Strategy for Lessening the Impact of Inflammation on Oxidative Stress. **Free Radic Biol Med.** 2011 September 1; 51(5): 1054–1061.

BRUSCO, A; TAGLIAFERRO, P; SAEZ, T; ONAIVI, E. S. Postsynaptic localization of cb2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. **Synapse** 62:944–949 (2008).

CASTILLO, A; TOLÓN, M.R; FERNADÉZ-RUIZ, J; ROEMRO, J; MARTÍNEZ-ORGADO, J. The neuroprotective effect of cannabidiol in na in vitro modelo f newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB2 and adenosine receptors. **Neurobiology of Disease** 37 (2010) 434-440.

Chen, D.H. Qualitative and quantitative study of synaptic displacement in chromatolyzed spinal motoneurons of the cat. **J. Comp. Neurol.**, v.177, p.635-664, 1978.

Conte, A.; Bettolo, C.M.; Onesti, E.; Frasca, V.; Lacovelli, E.; Gilio, F.; Giacomelli, E.; Gabrieli, M.; Aragona, M.; Tomassini, V.; Pântano, P.; Pozzilli, C.; Inghilleri, M. Cannabinoid-induced effects on the nociceptive system: A neurophysiological study in patients with secondary progressive multiple sclerosis. **Eur J. of Pain.**, v.13, p.472–477, 2009.

Cullhiem, S.; Wallquist, W.; Hammarberg, H.; Linda, H.; Piehl, F.; Carlstedt, T.; Risling, M. Properties of motoneurons underlying their regenerative capacity after axon lesions in the ventral funiculus or at the surface of the spinal cord. **Brain Res. Rev.**, v.40, p.309-316, 2002.

Dangelo, JG; Fattini, CA. *Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar*: para o estudante de medicina. 3.ed. Atheneu: São Paulo, 2011.

DeLeo JA, Tawfik VL, LaCroix-Fralish ML. The tetrapartite synapse: path to CNS sensitization and chronic pain. *Pain*. 2006;22:17-21.

Derouiche, A.; Frotsher, M. Preripheral astrocyte processes: Monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins. **Glia**, v.36, p.330-341, 2001.

Dewey WL. Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev* 1986;38:151–78.

Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosc* 2005;8:585-589.

EL-REMESSY, A.B; KHALIFA, Y; OLA, S; IBRAHIM, A.S; LIO, G.I. Cannabidiol protects retinal neurons by preserving glutamine synthetase activity in diabetes. **Molecular Vision** 2010; 16:1487-1495.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, D; PAZOS, M.R; TOLÓN, M.R; MORO, M.A; ROMERO, J; LIZASOAIN, I; MARTÍNEZ-ORGADO, J. The cannabinoid agonist win55212 reduces brain damage in an in vivo model of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborn rats. **Pediatric Research** 62: 255-260, 2007.

FERNÁNDEZ-RUIZ, J; SAGREDO, O; PAZOS, M.R; GARCÍA, C; PERTWEE, R; MECHOULAM, R; MARTÍNEZ-ORGADO, J. Cannabidiol for neurodegenerative disorders: important new clinical applications for this phytocannabinoid? **Br J Clin Pharmacol.** 2013 Feb;75(2):323-333.

García-Arencibia, M.; Gonzáles, S.; Lago, E.; Ramos, J.A.; Mechoulam, R.; Fernández-Ruiz, J. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: Importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. **Brain Res.**, v.1134, p.162-170, 2007.

GARCIA-OVEJERO, D; AREVALO-MARTIN, A; PETROSINO, S; DOCAGNE, F; HAGEN, C; BISOGNO, T; WATANABE, M; GUAZA, C; DI MARZO, V; MOLINA-HOLGADO, E. The endocannabinoid system is modulated in response to spinal cord injury in rats. **Neurobiology of Disease** 33 (2009) 57–71.

Hamburger, V. (1958) Regression versus peripheral control of differentiation on motor hypoplasia. *Am. J. Anat.*, 102, 365-409.

Hampson, R.E., Deadwyler, S.A., 1998. Role of cannabinoid receptors in memory storage. *Neurobiol. Dis.* 5, 474–482.

Hampson, A.J.; Grimaldi M.; Axelrod J.; Wink; D. Cannabidiol and (-) Δ^9 tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p.8268–8273, 1998.

Hermansson, M.; Olson, T.; Westermark, B.; Funa, K. PDGF and its receptors following facial nerve axotomy in rats: expression in neurons and surrounding glia. **Exp. Brain Res.**, v.102, p. 415-422, 1995.

Heyser, C.J., Hampson, R.E., Deadwyler, S.A., 1993. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on delayed match to sample performance in rats: alterations in short-term memory associated with changes in task specific firing of hippocampal cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264, 294–307.

Howlett AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68–69(Aug):619–31.

Huh, G.S.; Boulanger, L.M.; DU, H.; Riquelme, P.A.; Brotz, T.M.; Shatz, C.J. Functional Requirement for Class I MHC in CNS Development and Plasticity. **Scien.**, v.290, p.2155–2159, 2000.

Ip, N.Y., Stitt, T.N., Tapley, P., *et al.* (1993) Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the trks in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron*, **10**, 137-149.

Izzo A A, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol. Sci.* 2009; 30:515–527.

J.R. Wolff, M. Missler, Synaptic reorganization in developing and adult nervous systems, *Anat. Anz.* 174 (1992) 393–403.

Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessell, T.M. **Principles of neural science**. 4.ed. McGraw-Hill, 2000.

Kashihara, Y., Kuno, M. & Miyata, Y. Cell death of axotomized motoneurons in neonatal rats and its prevention by peripheral reinnervation. *J. Physiol.*, 386, 135-148. 1987.

Kim, D., Thayer, S.A., 2001. Cannabinoids inhibit the formation of new synapses between hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 21 (10), RC146.

Koliatsos, V.E.; Price, W.L.; Pardo, C.A.; Price, D.L. Ventral root avulsion: an experimental model of death of adult motor neurons. *J. Comp. Neurol.*, v.342, p.35-44, 1994.

Koyama, Y.; Baba, A. Endothelin-induced protein tyrosine phosphorylation of cultured astrocytes: its relationship to cytoskeletal actin organization. **Glia**, v.26, p.324-332, 1999.

Levi-Montalcini, R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science*, **237**, 1154-1162.

Lieberman, A.R. The axon reaction: a review of the principal features of the perikaryal responses to axon injury. **Int. Rev. Neurobiol.**, v.14, p.49-124, 1971.

Linda, H.; Piehl, F.; Dagerlind, A.; Verge, V.M.; Arvidsson, U.; Cullheim, S.; Risling, M.; Ufhake, B.; Hokfelt, T. Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal cord under normal conditions and after different types of lesions, with special reference to motoneurons. **Exp. Brain Res.**, v.91, p.284-295, 1992.

Linda, H.; Shupliakov, O.; Örnung, G.; Ottersen, O.P.; Storm-Mathisen, J.; Risling, M.; Cullheim, S. Ultrastructural evidence for a preferential elimination of glutamate-immunoreactive synaptic terminals from spinal motoneurons after intramedullary axotomy. **J. Comp. Neurol.**, v.425, p.10-23, 2000.

Lowrie, M.B., Lavalette, D., Davis, C.E. Time course of motoneurons death after neonatal sciatic nerve crush in the rat. **Dev. Neurosci.**, 16, 279-284. 1994.

Lowrie MB & Vbrová G. Dependence of postnatal motoneurons on their targets: review and hypothesis. *Trends in Neurosciences*, 15: 80-84. 1992.

Machado, A.B.M. **Neuroanatomia funcional**. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.

McCall, M.A.; Gregg, R.G.; Behringer, R.R.; Brenner, M.; Delaney, C.L.; Galbreath, E.J.; Zhang, C.L.; Pearce, R.A.; Chiu, S.Y.; Messing, A. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (*Gfap*) alters neuronal physiologi. **Neurobiol.**, v.93, p.6361-6366, 1996.

McAllister SD, Glass M. CB1 and CB2 receptor mediated signalling: a focus on endocannabinoids. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 2002;66:161-171.

MECHA, M; TORRAO, A.S; MESTRE, L; CARRILLO-SALINAS, F.J; MECHOULAM, R; GUAZA, C. Cannabidiol protects oligodendrocyte progenitor cells from inflammation-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. **Citation: Cell Death and Disease** (2012) 3, e331.

MECHOULAM, R; PANIKASHVILI, D; SHOHAMI, E. Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. **TRENDS in Molecular Medicine** Vol.8 No.2 February 2002.

Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., Hanus, L.O., 2007. Cannabidiol—recent advances. *Chem. Biodivers.* 4, 1678–1692.

Moran, L.B.; Graeber, M.B. The facial nerve axotomy model. **Brain Res. Rev.**, v.44, p.154-178, 2004.

NOBACK, C.R; DEMAREST, R.J. **The nervous system: Introduction and review.** Chapters 1 and 2. Edit McGraw-Hill, 1977.

Oliveira A. L. R., Risling M, Negro A, Langone F, Cullheim S. Apoptosis of spinal Interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. In: **The Journal of comparative neurology**; 447:381-393. 2002.

OLIVEIRA, A. L. R. ; RISLING, M rten ; DECKNER, M. ; LINDHOLM, T. ; LANGONE, Francesco ; CULLHEIM, Staffan . Neonatal sciatic nerve transection induces TUNEL labeling of neurons in the rat spinal cord and DRG. *NeuroReport (Oxford) JCR*, Inglaterra, v. 8, n. 13, p. 216-221, 1997.

Oliveira, A.L.R.; Thams, S.; Lidman, O.; Piehl, F.; Hökfelt, T.; KÄrre, K.; Linda, H.; Culheim, S. A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, n.51, p.17843-17848, 2004.

Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamine and its congeners. *J Biol Chem* 2004;279:5298-5305.

Oppenheim & Chu-Wang. Developmental neuron death in the rat superior cervical sympathetic ganglion: cell counts and ultrastructure. **Journal of Neurocytology**, 12(5):727-38, 1983.

Oppenheim, R.W. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.*, **14**, 453-501.

Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 2006;27:73-100.

Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, third ed. Academic Press, San Diego.

PAZOS, M.R; CINQUINA, V; GÓMEZ, A; LAYUNTA, R; SANTOS, M; FERNÁNDEZ-RUIZ, J; MARTÍNEZ-ORGADO, J. Cannabidiol administration after hypoxia-ischemia to newborn rats reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function. **Neuropharmacology**. 2012 Oct;63(5):776-83.

Pekny, M. Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin Knock-out mice. **Porg. Brain Res.**, v.132, p.23-30, 2001.

Pertwee, R.G., 2004. The pharmacology and therapeutic potential of cannabidiol. In: Di Marzo, V. (Ed.), *Cannabinoids*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 32–83.

Piehl, F.; Arvidsson, U.; Johnson, H.; Cullheim, S.; Dagerlind, A.; Ulfhake, B.; Cao, Y.; Elde, R.; Pettersson, R.F.; Terenius, L. GAP-43, aFGF, CCK and alpha- and beta-CGRP in rat spinal motoneurons subjected to axotomy and/or dorsal root severance. **Eur. J. Neurosci.**, v.5, p.1321-1333, 1993.

Piehl, F.; Hammarberg, H.; Hokfelt, T.; Cullheim, S. Regulatory effects of trophic factors on expression and distribution of CGRP and GAP-43 in rat motoneurons. **J. Neurosci. Res.**, v.51, p.1-14, 1998.

Piehl, F.; Tabar, G.; Cullheim, S. Expression of NMDA receptor mRNA in rat motoneurons is down-regulated after axotomy. **Eur. J. Neurosci.**, v.7, p.2101-2110, 1995.

Reisert, I.; Wildemann, G.; Garb, D.; Pilgrim, C. The glial reaction in the course of axon regeneration: a stereological study of the rat hypoglossal nucleus. **J. Comp. Neurol.**, v.229, p.121-128, 1984.

REXED, B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. **J. Comp. Neurol.**, v.100, p. 297-379, 1964.

Risling, M.; Cullheim, S.; Hildebrand, C. Reinnervation of the ventral root L7 from ventral horn neurons following intramedullary axotomy in adult cats. **Brain Res.**, v.280, p.15-23, 1983.

Rogers, S.D.; Christopher, M.P.; James, D.P.; Hiromi, H.; Joseph, R.G.; Patrick, W.M. Endothelin B receptors are expressed by astrocytes and regulate astrocyte hypertrophy in the normal and injured CNS. **Glia**, v.41, p.180-190, 2003.

Rohlmann, A.; Laskwi, R.; Hofer, A.; Dermietzel, R.; Wolff, J.R. Astrocytes as rapid sensors of peripheral axotomy in the facial nucleus in rats. **Neuroreport**, v.5, p.409-412, 1994.

Scuderi, C.; Filippis, D.; Luvone, T.; Blasio, A.; Steardo, A.; Esposito, G. Cannabidiol in Medicine: A Review of its Therapeutic Potential in CNS Disorders. **Phytother. Res.**, v.23, p.597– 602, 2009.

Sendtner, M., Kreutzberg, G.W., Thoenen, H. (1990) Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature*, **345**, 4401.

Svensson, M.; Aldskogius, H. Synaptic density of axotomized hypoglossal motoneurons following pharmacological blockade of the microglial cell proliferation. **Exp. Neurol.**, v. 120, n.1, p.123-131, 1993.

TAGLIAFERRO, P; RAMOS; A. J; ONAIVI; E. S; EVRARD; S. G; LUJILDE, J; BRUSCO, A. Neuronal cytoskeleton and synaptic densities are altered after a chronic treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. **Brain Research** 1085 (2006) 163 – 176.

Tetzlaff, W.; Graeber, M.B.; Bisby, M.A.; Kreutzberg, G.W. Increased glial fibrillary acidic protein synthesis in astrocytes during retrograde reaction of the rat facial nucleus. **Glia**, v.1, p.90-95, 1988.

Vbrová, G. & Lowrie, M.B. (1989) The role of nerve-muscle interactions in the pathogenesis of SMA. In: Current concepts in childhood spinal muscular atrophy. Eds. L. Merlini, C. Granata and V. Dubowitz. Berlin: Springer-Verlag. pp. 33-43.

Zuardi, A.W.; Crippa, J.A.S.; Hallak, J.E.C.; Moreira, F.A.; Guimarães, F.S. Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug. **Braz J Med Biol Res.**, v.39, p. 421-429, 2006.

Wroblewski R, Roomans GM, Kozlova EN. Effects of dorsal root transection on morphology and chemical composition of degenerating nerve fibers and reactive astrocytes in the dorsal funiculus. *Experim Neur.* 2000;164:236-45.

WU, H.Y; GOBLE, K; MECHA, M; WANG, C.C; HUANG, C.H; GUAZA, C; JAN, T.R. Cannabidiol-Induced Apoptosis in Murine Microglial Cells Through Lipid Raft. **GLIA** 60:1182–1190 (2012).

Anexo 1

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada "Papel neuroprotetor do canabidiol em ratos neonatos após a transecção do nervo isquiático":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

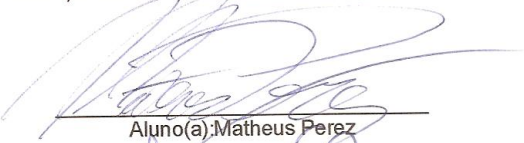
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____.

(x) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 2371-1, Instituição: _____.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição: _____.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

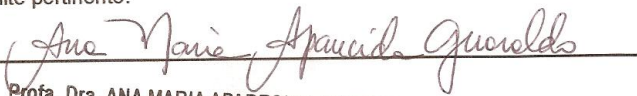

Aluno(a): Matheus Perez


Orientador(a): Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura