Emprego do CBD como agente antioxidante na fusão axonal em ratos Lewis

Palavras-Chave: lesão nervosa periférica, fusão axonal, neurorrafia, canabidiol.

Autores:

Flora Cardoso da Silveira, FCF – UNICAMP

Kevin Silva Muler, IB – UNICAMP

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, IB – UNICAMP

Profª. Drª. Alline Cristina Campos, FMRP – USP/RP

Profª. Drª. Luciana Politti Cartarozzi (orientadora), IB – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Danos graves aos membros são um problema frequente, especialmente em contextos de guerra, e frequentemente envolvem lesões no sistema nervoso periférico (SNP) (Stansbury et al., 2007). Nervos periféricos como o isquiático são essenciais para a condução de estímulos motores e sensoriais entre o sistema nervoso central (SNC) e os tecidos periféricos. Assim, lesões nervosas periféricas (PNIs), quando extensas e irreversíveis, podem comprometer de forma significativa a funcionalidade dos membros (Ghergherehchi et al., 2021). Embora os axônios do SNP apresentem certo potencial regenerativo, a recuperação funcional plena é frequentemente ineficaz. Um dos principais obstáculos à regeneração eficiente é a ocorrência da degeneração Walleriana, processo desencadeado após a secção do axônio, no qual ocorre degradação da porção distal por mecanismos endógenos, resultando em denervação dos tecidos-alvo. O selamento do axolema, embora neuroprotetor, é um evento que impede a reconexão espontânea dos segmentos proximais e distais do axônio, sendo mediado por acúmulo de membrana, dependente de cálcio e de proteínas (Freeman, 2014).

Nesse processo, as células de Schwann têm papel fundamental: ao detectarem a lesão, sofrem desdiferenciação, expressam fatores neurotróficos e interrompem a produção de mielina, além de formarem bandas de Bungner que guiam a regeneração axonal. O ambiente lesado também recruta células imunes, especialmente macrófagos, que, em conjunto com as células de Schwann, removem detritos e liberam fatores tróficos. Apesar desses mecanismos, a regeneração axonal é lenta e limitada, principalmente em lesões proximais, podendo ser acompanhada de atrofia muscular, reinervação aberrante ou dor neuropática (Gaudet et al., 2011). As técnicas cirúrgicas atuais, como a neurorrafia ou enxertos, não impedem a degeneração Walleriana e dependem da regeneração completa dos axônios para a reconexão funcional (Bittner et al., 2012; Ghergherehchi et al., 2019).

Diante dessas limitações, novas estratégias têm sido investigadas, como o uso do polietilenoglicol (PEG), um polímero fusogênico capaz de promover a fusão entre membranas celulares. Estudos em modelos animais demonstraram que, quando aplicado em protocolos específicos, o PEG pode unir segmentos axonais cortados, prevenindo a degeneração Walleriana e acelerando a recuperação funcional (Neumann et al., 2019). A eficácia da fusão axonal é potencializada pela presença de antioxidantes, que atuam reduzindo a oxidação do axoplasma e retardando o selamento da membrana. O azul de metileno (MB) é um dos antioxidantes mais utilizados nesses protocolos, promovendo melhora significativa na recuperação funcional (Ghergherehchi et al., 2021).

No entanto, há crescente interesse na exploração de novos agentes antioxidantes. O canabidiol (CBD), um fitocanabinoide não psicoativo da Cannabis sativa, tem sido amplamente estudado por suas propriedades anti-inflamatórias, neuroprotetoras e antioxidantes (Campos et al., 2016). Estudos sugerem que o CBD pode reduzir a morte neuronal, modular a reatividade glial e preservar a funcionalidade sináptica após lesões (Perez et al., 2013). Seu potencial antioxidante decorre da presença de grupos hidroxila em sua estrutura, que permitem a neutralização de radicais livres e redução do estresse oxidativo (Borges et al., 2013). Assim, considera-se promissor o uso combinado de CBD e PEG em protocolos de fusão axonal, visando à preservação estrutural dos axônios e à aceleração da recuperação funcional após lesões nervosas periféricas.

OBJETIVOS:

Estudo do canabidiol como substância antioxidante e seu possível uso em tratamentos de lesões nervosas periféricas. Busca, por análises estatísticas e comportamentais com modelos animais, verificar se a substância pode contribuir com uma melhor e mais rápida regeneração de nervos periféricos, assim como a recuperação funcional e sensorial dos tecidos afetados.

METODOLOGIA:

Os experimentos foram realizados com ratas Lewis fêmeas provenientes do CEMIB/UNICAMP, alojadas no Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Regeneração Nervosa (IB/UNICAMP). Todos os procedimentos foram aprovados pela CEUA/IB/UNICAMP (protocolo nº 6427-1/2024). Inicialmente, os animais foram submetidos à transecção do nervo isquiático, seguida de neurorrafia simples (NR) ou do protocolo de fusão axonal, que incluiu a aplicação de azul de metileno (AM), canabidiol (CBD), nanopartículas de CBD marcadas com Lumogen Red (CBDnano; 0,1 ou 1 mg/mL), ou apenas o meio de suspensão (grupo controle, MEIO). Após a cirurgia, os animais foram acompanhados por duas semanas. Em uma segunda fase, novos animais (n=5 por grupo) serão acompanhados por oito semanas.

Durante a cirurgia, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (i.p.) e mantidos com isoflurano (1–1,5%). O nervo isquiático foi exposto por incisão lateral na coxa e completamente seccionado no terço médio. Nos grupos com fusão axonal, foi seguido um protocolo padronizado: priming

com solução hipotônica por 2 min, proteção com AM ou CBD por 2 min, coaptação das extremidades por micro-suturas, aplicação de polietilenoglicol (PEG) por 2 min e lavagem final com solução salina por 2 min. Após o fechamento da ferida, foi administrado analgésico (tramadol 5 mg/kg, s.c.) por três dias.

A avaliação funcional incluiu eletroneuromiografia (ENMG) e análise da marcha. Para a ENMG, eletrodos foram posicionados no coto proximal do nervo (estimulação) e no músculo tibial anterior (registro), com medições realizadas antes da lesão, imediatamente após o procedimento e, na segunda fase, oito semanas após a cirurgia. A marcha foi analisada com o sistema CatWalk, com gravações pré-cirurgia e semanais até a eutanásia.

A eutanásia foi realizada por superdosagem anestésica, seguida de perfusão transcardíaca com solução salina tamponada e paraformaldeído. Foram coletados nervos isquiáticos, medula espinal e músculo sóleo, lavados em tampão fosfato 0,1M e criopreservados em soluções de sacarose (10%, 20% e 30%). Os tecidos foram embebidos em meio de inclusão, congelados em n-hexano a -38ºC e armazenados a -20ºC. Cortes longitudinais (12 µm) do nervo isquiático foram obtidos em criostato, montados em lâminas gelatinizadas e mantidos a -20ºC até a análise.

As lâminas foram processadas para imunofluorescência ou coloração com Sudan Black. Na imunofluorescência, as secções foram bloqueadas com BSA 3% e incubadas overnight com anticorpo anti-Neurofilamento, seguido de incubação com anticorpo secundário e montagem com glicerol/PB 0,1M. Para o Sudan Black, as lâminas foram desidratadas, coradas por 20 min e lavadas. A análise foi feita em microscópio de fluorescência e óptico Leica DM 5500B com câmera digital acoplada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Na primeira fase do experimento, os animais foram submetidos à transecção do nervo isquiático seguida de neurorrafia simples ou do protocolo de fusão axonal com diferentes agentes antioxidantes (azul de metileno, CBD e CBDnano em duas concentrações). A eficácia imediata da fusão foi avaliada intraoperativamente por eletroneuromiografia (ENMG), com registro dos potenciais de ação musculares compostos (CMAPs) no músculo tibial cranial (Figura 1). Como esperado, o grupo que recebeu apenas a neurorrafia simples não apresentou resposta elétrica após a lesão, enquanto os grupos tratados com PEG e agentes antioxidantes apresentaram potenciais residuais, indicando reconexão funcional inicial entre os cotos nervosos, em especial os grupos tratados com azul de metileno e CBDnano a 1 mg/mL.

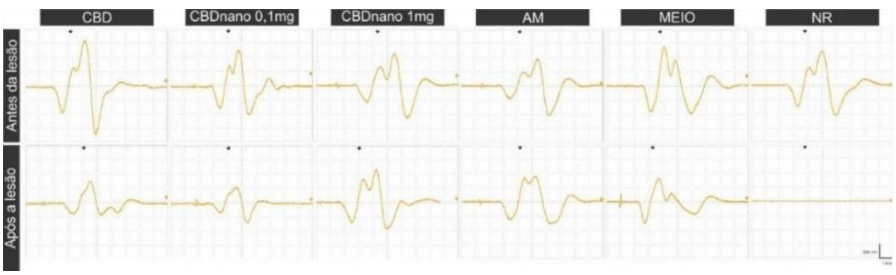

Figura 1. Registros dos potenciais de ação musculares compostos em todos os grupos experimentais obtidos durante a cirurgia, antes da transecção do nervo isquiático e após a transecção e neurorrafia e/ou fusão axonal. Observe a ausência de registro no grupo NR, que não passou pelo procedimento de fusão axonal.

Durante o período de duas semanas pós-operatórias, o desempenho funcional foi acompanhado por meio do sistema CatWalk (Figura 2). Observou-se redução significativa no uso do membro posterior direito (lado da cirurgia) em todos os grupos, especialmente no grupo neurorrafia simples. Os animais tratados com azul de metileno apresentaram recuperação mais rápida da marcha, seguidos pelos grupos tratados com CBD e, em especial, com CBDnano 1 mg/mL, que demonstraram padrão de apoio mais simétrico e melhora progressiva ao longo do tempo. Esses dados reforçam os achados eletrofisiológicos, sugerindo que a fusão axonal com agentes antioxidantes contribui para a preservação funcional precoce do nervo.

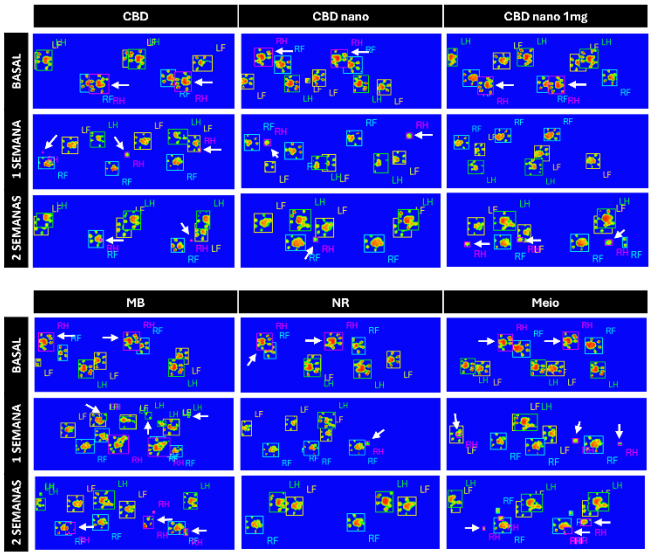

Figura 2. Marchas gravadas pelo CatWalk dos animais dos respectivos grupos, pré-cirurgia ("basal"), 1 semana e 2 semanas após cirurgia, onde: LF = *left front* (membro esquerdo anterior), LH = *left hind* (esquerdo posterior), RF = *right front* (direito anterior) e RH = *right hind* (direito posterior). As setas brancas indicam as marcações do membro afetado pela cirurgia (direito posterior).

Ao final de duas semanas, os animais foram eutanasiados e os nervos isquiáticos dissecados para análise histológica (Figura 3). Os cortes longitudinais foram corados com Sudan Black, para identificação de mielina, e submetidos à imunofluorescência para neurofilamento. Nas análises com Sudan Black, observou-se que os segmentos proximais à lesão mantinham mielina bem preservada em todos os grupos. Já nas porções distais, a perda de mielina e a presença de estruturas degenerativas foram evidentes, especialmente nos grupos sem fusão. Por outro lado, os grupos tratados com CBDnano, em particular na concentração de 1 mg/mL, apresentaram preservação parcial da mielina na região distal, sugerindo redução da degeneração Walleriana.

As lâminas imunomarcadas com anti-neurofilamento confirmaram os achados estruturais. O grupo NR apresentou queda acentuada na densidade de neurofilamentos distais, enquanto os grupos tratados com PEG e antioxidantes mostraram axônios mais organizados e maior densidade na região da lesão e além. Novamente, o grupo CBDnano 1 mg/mL apresentou a melhor preservação morfológica, indicando maior eficácia na manutenção da integridade axonal.

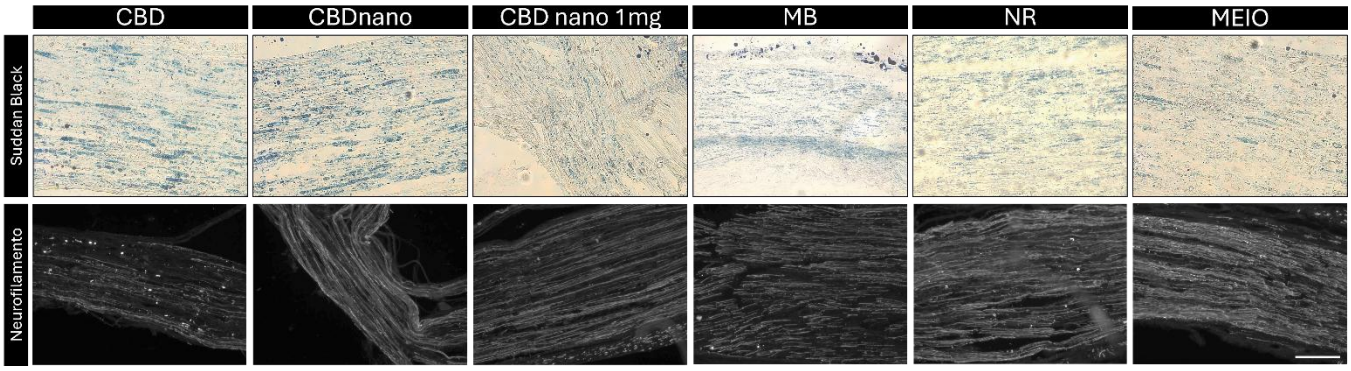

Figura 3. Imagens dos segmentos distais dos nervos isquiáticos de animais dos diferentes grupos experimentais coradas Suddan Black (mielina) e imunomarcados para anti-neurofilamento (axônios). Na coloração com Suddan Black, a cor azul indica presença de mielina. Repare nos segmentos distais figuras de degeneração, entremeadas com segmentos de axônios intactos. Já a marcação com anti-neurofilamento, mostra a preservação axonal no segmento distal, evidente especialmente nos grupos submetidos à fusão axonal. Barra de escala = 100 µm.

CONCLUSÃO:

Os dados obtidos nesta primeira fase indicam que o protocolo de fusão axonal foi corretamente estabelecido e que o CBD, especialmente na formulação nanoparticulada mais concentrada, possui potencial como agente antioxidante no contexto da fusão axonal. Resultados promissores quanto à preservação funcional e estrutural do nervo justificam a continuidade do projeto com acompanhamento a longo prazo e expansão da análise para outros marcadores histológicos.

BIBLIOGRAFIA

BITTNER, G. D.; KEATING, C. P.; KANE, J. R.; BRITT, J. M.; SOAETH, C. S.; FAN, J. D.; ZUZEK, A.; WILCOTT, R. W.; THAYER, W. P.; WINOGRAD, J. M.; GONZALEZ-LIMA, F.; SCHALLERT, T. Rapid, effective, and long-lasting behavioral recovery produced by microsutures, methylene blue, and polyethylene glycol after completely cutting rat sciatic nerves. J Neurosci Res. n. 90 (ed. 5), p. 967 – 980. 2012.

BORGES, R.S.; JR, J.B.; VIANA, R.B.; BAETAS, A.C.; ORESTES, E.; ANDRADE, M.A.; HONÓRIO, K.M.; SILVA, A.B.F. Understanding the molecular aspects of tetrahydrocannabinol and cannabidiol as antioxiants. Molecules. Vol. 18, p. 12663-12674. 2013.

CAMPOS, A. C.; FOGAÇA, M. V.; SONEGO, A. B.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. Pharmacol Res. Vol. 112, p. 119-127. 2016.

FREEMAN M. R. Signaling mechanisms regulating Wallerian degeneration. Curr Opin Neurobiol. n. 27, p. 224-231. Ago, 2014.

GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. J Neuroinflammation n. 8, 110. 2011.

GHERGHEREHCHI, C. L.; MIKESH, M.; SENGELAUB D. R.; JACKSON D. M.; SMITH T.; NGUYEN J.; SHORES J. T.; BITTNER G. D. Polyethylene glycol (PEG) and other bioactive solutions with neurorrhaphy for rapid and dramatic repair of peripheral nerve lesions by PEG-fusion. J Neurosci Methods. 15; 314:1-12. Fev, 2019.

GHERGHEREHCHI, C. L.; SHORES, J. T.; ALDERETE, J; WEITZEL, E. K.; BITTNER, G. D. Methylene blue enhances polyethylene glycol-fusion repair of completely severed rat sciatic nerves. Neural Regeneration Research 16(10), p. 2056-2063. Out, 2021.

NEUMANN B., LINTON C., GIORDANO-SANTINI R., HILLIARD M. A. Axonal fusion: An alternative and efficient mechanism of nerve repair. Prog Neurobiol. n. 173, p. 88-101. Fev, 2019.

PEREZ M.; ENITEZ, S. U.; CARTAROZZI, L. P.; BEL, E. D.; GUIMARÃES, F. S.; OLIVEIRA, A. L. R. Neuroprotection and reduction of glial reaction by cannabidiol treatment after sciatic nerve transection in neonatal rats. European Journal of Neuroscience. Vol. 38, p. 3424-3434. 2013.

STANSBURY, L., BRANSTETTER, J., LALLISS S. Amputation in military trauma surgery. Journal of Trauma – injury, infection and critical care. Vol. 63, p. 940-944. 2007.