

EFEITOS DO CANABIDIOL SOBRE PROTEÍNAS ENCEFÁLICAS E NA FREQUÊNCIA VENTILATÓRIA EM TILÁPIAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE DE CONFINAMENTO

Mylena Cavalcante Mourão¹; Anthoniel Hendel Silva de Souza²; Alexandre Junior Quemel Pedrosa³; Kalena Thais da Silva Oliveira⁴; Joelson da Silva Farias⁵; Brenda Maria Pereira Alho da Costa⁶; Jackson Oliveira Andrade⁷; Marcelo Ferreira Torres⁸; Luis André Luz Barbas⁹; Caroline Azevedo Rosa¹⁰

^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10}IFPA *campus* Castanhal

RESUMO

A saúde e o bem-estar são fundamentais na aquicultura. Tilápias-do-Nilo tratadas com canabidiol (CBD) e submetidas ao estresse de confinamento foram avaliadas quanto às proteínas encefálicas e frequência ventilatória. O estresse promoveu alterações de proteínas encefálicas, enquanto a frequência ventilatória permaneceu estável. A dose de 5 mg/kg mostrou-se mais promissora, indicando que os efeitos do CBD dependem da concentração administrada.

Palavras-chave: canabidiol; estresse; tilápia; bem estar

INTRODUÇÃO

O estresse compromete o bem-estar dos peixes ao alterar a homeostase, sendo frequentemente desencadeado por práticas comuns na aquicultura, como contenção e alta densidade, que ativam respostas neuroendócrinas, através da liberação de cortisol (Selye, 1936; Araújo, 2023). Em seguida, ocorrem alterações fisiológicas, como o aumento dos níveis de glicose plasmática, além da ativação de respostas celulares ao estresse, incluindo a expressão de proteínas de choque térmico (HSPs), especialmente a HSP70, considerada um importante biomarcador de estresse (Tort et al., 2006). Embora mecanismos adaptativos sejam ativados, sua persistência pode prejudicar o crescimento, imunidade e saúde (Ellis et al., 2002). Nesse contexto, compostos bioativos têm sido investigados como estratégias mitigadoras do estresse em peixes (Belo et al., 2005). Entre eles, o canabidiol (CBD) destaca-se por seu potencial modulador do sistema endocanabinoide e efeitos ansiolíticos já descritos em vertebrados (Iffland & Grotenhermen, 2017). Assim, este estudo avaliou os efeitos de diferentes concentrações de CBD sobre parâmetros bioquímicos (níveis teciduais de proteínas totais) e fisiológicos (frequência ventilatória) em tilápias-do-Nilo submetidas ao estresse de contenção.

METODOLOGIA

O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal do Pará (CEUA - IFPA), sob o parecer nº 6791070324.

Após 30 dias de aclimação, as tilápias foram distribuídas em cinco grupos (n=12): SE (sem estresse), CTR (salina 0,9%) e grupos tratados com CBD nas doses de 5, 15 e 30 mg/kg (Fig 1). Os grupos tratados foram submetidos ao estresse de confinamento.

O paradigma do estresse por contenção consistia no confinamento do animal em uma estrutura opaca de PVC montada dentro do aquário, permitindo a redução do espaço em aproximadamente 10% do volume do aquário original, limitando quase completamente a movimentação do peixe (Fig 2). Nessa condição, as tilápias permaneceram por 30 minutos.

Após o período de contenção, foi realizada a contagem da frequência ventilatória (FV), com o auxílio de um cronômetro. Para calcular a FV, o tempo que o peixe leva para realizar 20 sucessivos movimentos operculares foi contabilizado. Em seguida, foram calculados quantos batimentos operculares por minuto (bat/min) cada peixe realizou através de uma estimativa.

A administração do óleo de canabidiol (100 mg/mL, frasco de 30 mL) foi autorizada pela ANVISA através da Autorização Especial Simplificada (AEP) para Instituição de Ensino

e Pesquisa (SEI/ANVISA - 2673333) e doado pela indústria farmacêutica Easelabs Laboratório Farmacêutico Ltda.

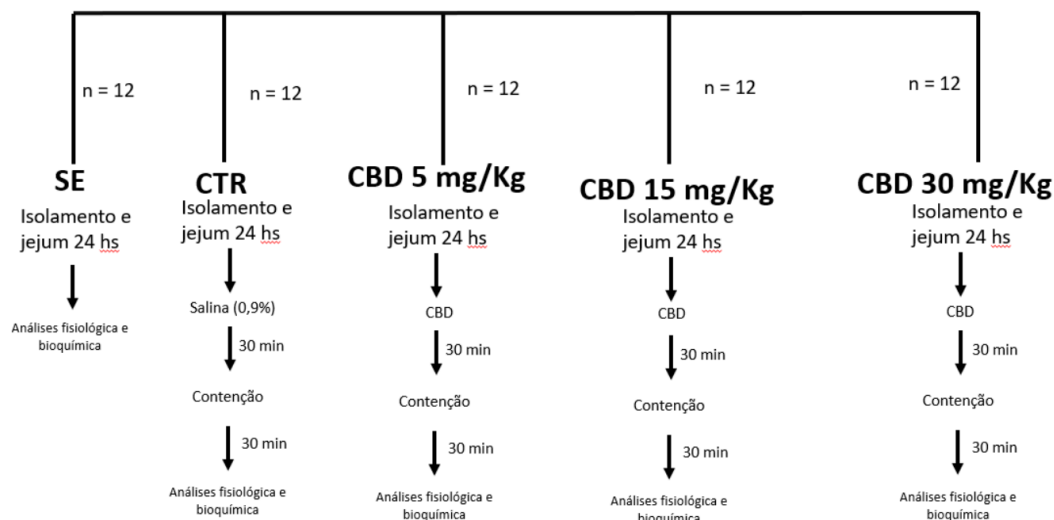


Figura 1 – Esquema representativo do delineamento experimental. Os animais foram distribuídos em cinco grupos (n=12/grupo). O grupo SE foram peixes sem manipulação e sem estresse, para comparação dos valores basais. Os outros grupos foram peixes que receberam tratamento após a indução do estresse de confinamento. Após 30 min de farmacocinética realizou-se a coleta de material para as análises fisiológicas e bioquímicas e sacrifício dos animais.



Figura 2 – Esquema experimental. 1. Administração i.p. da solução salina (salina 0,9%) ou diferentes doses de CBD (5, 15 ou 30 mg/Kg); 2. Farmacocinética, tempo estimado para distribuição do fármaco no organismo; 3. Teste de contenção; conforme metodologia adaptada de Camargo-dos-Santos *et al.* 2022; 4. Contagem da frequência ventilatória (FV), para calcular batimentos operculares por minuto. Metodologias adaptadas de Barreto e Volpato, 2004 e Camargo-dos-Santos *et al.*, 2022.

Após a conclusão dos testes de contenção e da análise de FV, os animais foram sacrificados de acordo com normas da CEUA e encaminhados para as análises bioquímicas, onde foram avaliadas os níveis de proteínas totais no plasma e em regiões selecionadas no cérebro - telencéfalo, teto óptico e cerebelo - conforme as instruções do Kit de Proteínas Totais Doles®, através de espectrofotometria UV-Vis a 550 nm.

Os valores do grupo SE foram comparados ao CTR pelo teste t não pareado. Já os grupos tratados (CTR vs CBD) foram analisados por ANOVA de 1 via com pós-teste de Tukey, e as proteínas cerebelares pelo teste de Kruskall-Wallis.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para proteínas plasmáticas, o teste t mostrou que não houve diferenças estatísticas entre os grupos SE e CTR. Para as proteínas teciduais no telencéfalo, teto óptico e cerebelo, houve diferenças entre os grupos ($p < 0,05$) (Fig. 3).

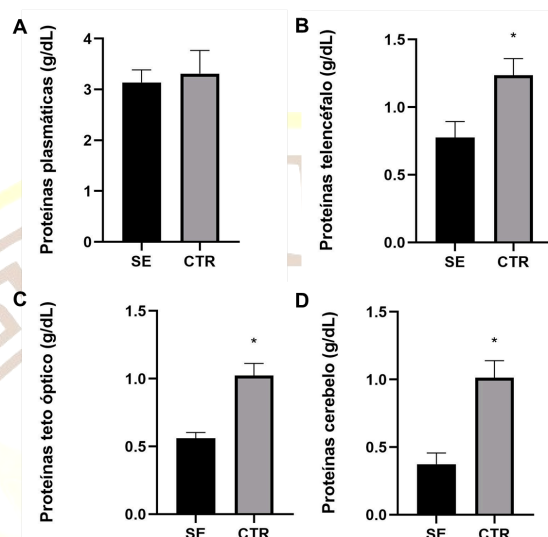


Figura 3 – Média das análises de proteínas totais plasmática e encefálicas em tilápias que não foram submetidas a tratamento e ao protocolo de estresse (SE) e tilápias submetidas ao teste de confinamento e tratada com salina 0,9% (CTR). (A) Proteínas plasmáticas; (B) Proteínas telencéfalo; (C) Proteínas do teto óptico; (D) Proteínas cerebelo. *indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo sem estresse (SE), de acordo com teste de t para amostras independentes.

Na ANOVA para os grupos tratados, a análise das concentrações de proteínas revelou que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais quanto às proteínas plasmáticas, no telencéfalo e no cerebelo. Para o teto óptico, a ANOVA de uma via indicou diferença significativa entre os tratamentos ($F_{3,44} = 6,872$), porém esta diferença ocorreu entre os grupos CBD 15 mg/kg e CBD 30 mg/kg, que apresentaram valores mais elevados em comparação ao grupo CBD 5 mg/kg (CBD-5 vs. CBD-15, $t = 4,882$, $p = 0,0066$; CBD-5 vs. CBD-30, $t = 6,031$, $p = 0,0006$) (Fig. 4).

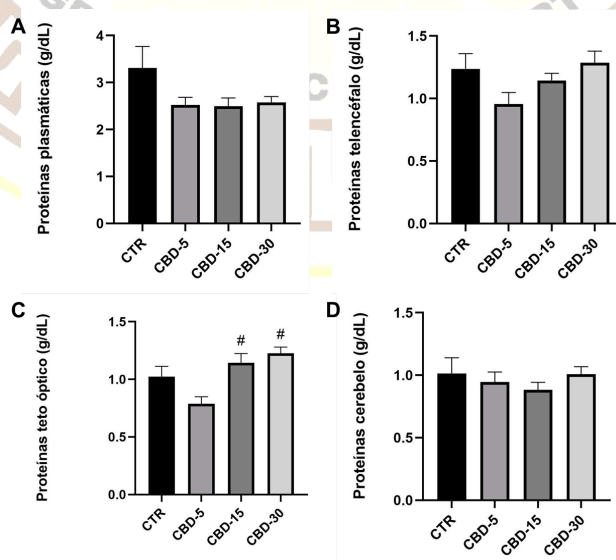


Figura 4 – Média das análises de proteínas totais (g/dL) plasmática e encefálicas em tilápias que foram submetidas ao paradigma de confinamento, e tratadas com salina 0,09% (CTR) ou CBD 5 mg/Kg, CBD 15 mg/Kg, CBD 30 mg/Kg. (A) Proteínas plasmáticas; (B) Proteínas telencéfalo; (C) Proteínas do teto óptico; (D) Proteínas cerebelo. #indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo CBD 5 mg/Kg, de acordo com análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.

Para a análise da FV (Tabela 1), o teste t mostrou que não houve diferenças estatísticas entre os grupos SE e CTR.

Tabela 1 – Frequência ventilatória (FV) em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) que não foram submetidas a tratamento e ao protocolo de estresse (SE) e tilápias submetidas ao teste de confinamento após exposição a dose salina 0,9% (CTR). Os valores correspondem à média $\pm$ EPM.

Parâmetro	Grupos	
	SE	CTR
FV (bat/min)	194,98 $\pm$ 6,70	181,73 $\pm$ 8,42

A ANOVA também não revelou diferença significativa entre os grupos tratados com salina e com diferentes doses de CBD (Tabela 2).

Tabela 2 – Frequência ventilatória (FV) em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) que foram submetidas ao paradigma de confinamento, e tratadas com salina 0,09% (CTR), CBD 5 mg/Kg, CBD 15 mg/Kg ou CBD 30 mg/Kg. Os valores são a média $\pm$ EPM.

Parâmetro	Grupos			
	CTR	CBD-5	CBD-15	CBD-30
FV (bat/min)	181,73 $\pm$ 8,42	178,43 $\pm$ 8,77	163,58 $\pm$ 6,25	163,21 $\pm$ 9,47

Observamos que o grupo SE apresentou elevação de proteínas totais no cerebelo em comparação ao grupo CTR, sugerindo a ativação de mecanismos associados à plasticidade neural e ao enfrentamento de condições desafiadoras. Embora o cerebelo seja classicamente relacionado à coordenação motora, evidências indicam sua participação em ajustes comportamentais frente ao estresse, possivelmente por meio da modulação de vias intracelulares e remodelação sináptica (Rodriguez et al., 2005; Abrahão et al., 2021). Em contraste, a FV não difere entre os grupos SE e CTR, mantendo-se estável após 30 minutos do confinamento. Esse resultado sugere que os animais estressados foram capazes de manter a homeostase respiratória sem necessidade de ajustes ventilatórios, possivelmente devido a um equilíbrio entre demanda metabólica e oferta de oxigênio, ou ainda à baixa intensidade do estressor, o que corrobora parcialmente achados prévios que relatam aumento da FV apenas em condições de estresse mais pronunciadas (Barreto & Volpato, 2004).

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de proteínas totais no cerebelo entre o grupo CTR e os grupos tratados com CBD, indicando ausência de efeito do composto sobre essa região. Ainda assim, tendências dose-dependentes sugerem que doses mais elevadas podem modular a resposta proteica cerebral, possivelmente por meio da ativação do sistema endocanabinoide, que atua de forma “on demand” na regulação da homeostase neural (Alger & Kim, 2011; Bailone et al., 2022). Esse padrão pode refletir processos adaptativos, como plasticidade sináptica e ajustes celulares frente ao estresse. Em relação à FV, também não foram detectadas diferenças entre o grupo CTR e os grupos tratados com CBD, reforçando que o protocolo experimental não foi suficiente para induzir alterações ventilatórias detectáveis. Considerando que a FV isoladamente pode não refletir a intensidade do estressor (Barreto & Volpato, 2004), e que ajustes hematológicos, como o aumento da hemoglobina, podem compensar a demanda por oxigênio (Martins et al., 2012), a

estabilidade desse parâmetro sugere manutenção da homeostase respiratória mesmo sob diferentes condições experimentais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estresse de contenção em tilápias-do-Nilo foi capaz de promover alterações bioquímicas nas regiões encefálicas, evidenciando respostas específicas no telencéfalo, teto óptico e cerebelo, possivelmente relacionadas a mecanismos de adaptação, neuroplasticidade e proteção celular. Por outro lado, a frequência ventilatória não apresentou alterações significativas, indicando que esse parâmetro não refletiu de forma sensível as mudanças fisiológicas desencadeadas pelo estressor nas condições avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, V. O. *et al.* Neuroplastic responses to environmental challenges in teleosts: from behavior to molecules. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 123, p. 107–120, 2021.
- ALGER, Bradley E.; KIM, Jimok. Supply and demand for endocannabinoids. *Trends in Neurosciences*, [S.l.], v. 34, n. 6, p. 304–315, jun. 2011.
- ARAÚJO, F. L. Respostas fisiológicas ao estresse em peixes: mecanismos hormonais e implicações na aquicultura. *Revista Brasileira de Fisiologia Animal Aquática*, v. 15, n. 2, p. 102–115, 2023.
- BAILONE, Ricardo Lacava *et al.* The endocannabinoid system in zebrafish and its potential to study the effects of Cannabis in humans. *Laboratory Animal Research*, [S.l.], v. 38, n. 5, 2022.
- BARRETO, Rodrigo Egydio; VOLPATO, Gilson Luiz. Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. *Behavioural Processes*, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 43–51, 2004.
- BELO, M. A. A. *et al.* Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of Comparative Pathology*, v. 133, n. 2–3, p. 146–154, 2005.
- CAMARGO-DOS-SANTOS, Bruno, BELLOT, Marina S., GUERMANDI, Isabela I, *et al.* Cannabidiol improves Nile tilapia cichlid fish welfare. *Scientific Reports*, v. 12, n. 17650, 2022.
- ELLIS, T. *et al.* The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, v. 61, n. 3, p. 493–531, 2002.
- IFFLAND, Kerstin; GROTENHERMEN, Franjo. An update on safety and side effects of cannabidiol: a review of clinical data and relevant animal studies. *Cannabis and Cannabinoid Research*, v. 2, n. 1, p. 139–154, 2017.
- SELYE, Hans. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, v. 138, n. 32, 1936.
- TORT, L. *et al.* Heat shock proteins (HSPs) as stress biomarkers in fish. *Italian Journal of Zoology*, v. 73, n. 1, p. 293–301, 2006.
- MARTINS, C. I. M. *et al.* Indicadores comportamentais de bem-estar em peixes de criação. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 38, p. 17–41, 2012.
- RODRÍGUEZ, F. *et al.* Cognitive and emotional functions of the teleost fish cerebellum. *Brain Research Bulletin*, v. 66, n. 4–6, p. 365–370, 2005.