

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (UNIRIO)

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)

INSTITUTO BIOMÉDICO (IB)

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**YARA DOS SANTOS DABDAB**

**MORTE CELULAR INDUZIDA POR ESTÍMULO DO CANABINOIDE SINTÉTICO  
WIN 55,212-2 EM CÉLULAS DA RETINA EM DESENVOLVIMENTO.**

RIO DE JANEIRO

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (UNIRIO)

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)

INSTITUTO BIOMÉDICO (IB)

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**YARA DOS SANTOS DABDAB**

**MORTE CELULAR INDUZIDA POR ESTÍMULO DO CANABINOIDE SINTÉTICO  
WIN 55,212-2 EM CÉLULAS DA RETINA EM DESENVOLVIMENTO.**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado ao Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO, na área de concentração de Farmacologia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Guilherme Rapozeiro França

Co-Orientadora: Ana Lúcia Marques Ventura

RIO DE JANEIRO

2018

Catálogo informatizada pelo(a) autor(a)

D111 Dabdab, Yara dos Santos  
Morte Celular Induzida por Estímulo do  
Canabinoide Sintético WIN 55, 212-2 em Células da  
Retina em Desenvolvimento / Yara dos Santos Dabdab.  
-- Rio de Janeiro, 2018.  
47f.

Orientador: Guilherme Rapozeiro França.  
Coorientadora: Ana Lucia Marques Ventura .  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro,  
Graduação em Biomedicina, 2018.

1. Desenvolvimento da retina. 2. Sistema  
canabinoide. 3. Morte neural. I. França, Guilherme  
Rapozeiro, orient. II. Ventura , Ana Lucia  
Marques, coorient. III. Título.

YARA DOS SANTOS DABDAB

**MORTE CELULAR INDUZIDA POR ESTÍMULO DO CANABINOIDE SINTÉTICO  
WIN 55,212-2 EM CÉLULAS DA RETINA EM DESENVOLVIMENTO.**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado ao Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), na área de concentração de farmacologia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: ..... de ..... de 2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Guilherme Rapozeiro França (Orientador), Doutor em Biofísica, UNIRIO

---

Prof. Cassiano Felipe G. de Albuquerque, Doutor em Biociências Nucleares, UNIRIO

---

Prof. Hércules Rezende Freitas, Mestre em Biofísica, UFRJ

*Dedico este trabalho a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com meu crescimento. Principalmente aos meus familiares e amigos que se fizeram sempre presente e sempre me apoiaram de todas as formas possíveis. Em especial o dedico a aqueles que não puderam acompanhar todo o meu trajeto acadêmico, como meu avô Antônio Jorge Dabdab e meu avô João José dos Santos.*

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Deus por todas as vitórias alcançadas em minha trajetória de vida.

Agradeço principalmente aos meu pais e familiares por durante todo esse tempo terem me apoiado durante a realização desse trabalho, pois sem eles, sem sombra de dúvida a realização deste projeto seria impossível.

Aos amigos que vieram me acompanhando antes mesmo de eu entrar nessa jornada de graduação, agradeço a persistência e toda a paciência e apoio, vocês acompanharam o meu crescimento e fizeram parte dele, além disso muitas vezes vocês confiaram mais no meu potencial que eu mesma. Ainda bem que vocês estavam certos, não é mesmo?

Agradeço também a todos os amigos os quais fiz nessa caminhada na graduação os quais me auxiliaram e me motivaram a continuar perseguindo este sonho todos os dias durante os anos de graduação. Sou especialmente grata aos meus companheiros de laboratório pela colaboração deles para a realização desse trabalho. Em especial a mestranda do laboratório Carolina Lopes e a Doutoranda Thayane Martins que me ajudaram a me adaptar a rotina do laboratório e me proporcionaram o aprendizado de outras técnicas. Além deles gostaria de agradecer a Prof. Dra. Ana Lucia Marques Ventura por disponibilizar todo o material para que esse projeto de pesquisa fosse realizado.

Agradeço ao meu orientador a paciência, a disponibilidade e o empenho para me transmitir conhecimento de forma que eu pudesse desenvolver esse projeto da melhor forma possível.

*“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.”*

*Claude Lévi-Strauss*

## Resumo

A *Cannabis sativa* é uma planta conhecida desde 4.000 A.C. pelo seu potencial terapêutico. Entretanto no século passado após muitos estudos foi investigado e constatado sobre a existência de um sistema endógeno onde as substâncias químicas provenientes da *C. sativa* se ligariam promovendo todos os efeitos anteriormente já observados. Foi então elucidado pelo pesquisador Israelense Raphael Mechoulam os endocanabinoides, ajudando a caracterizar o sistema endocanabinoide, a partir do isolamento da molécula do primeiro endocanabinoide citado na literatura. Atualmente, sabe-se sobre os efeitos e as vias de síntese, de liberação e de degradação além das rotas bioquímicas decorrentes da ativação dos receptores endocanabinoides, CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, em neurônios. Entretanto, pouco se conhece a respeito dos efeitos decorrentes dessa ativação do sistema endocanabinoide no SNC durante o desenvolvimento embrionário. Esse trabalho possui como objetivo investigar o efeito de canabinoides sobre a proliferação e morte de células da retina embrionária de embrião de galinha White-Leghorn. A partir de métodos como: ensaio de viabilidade celular por colorimetria (MTT), incorporação de [<sup>3</sup>H]-Timidina, imunocitoquímica para PCNA e Western-Blotting para a identificação de proteínas do ciclo celular. Nossos resultados demonstram que a ativação do sistema endocanabinoide modula o ciclo celular, podendo provocar a morte de células em desenvolvimento da retina durante o período embrionário de forma dose e tempo dependente em idade de E7. Mostram também que as células que morrem não são as células proliferativas mas sim as que já estão no processo de diferenciação celular.

**Pavras-chave:** Morte. Retina. Canabinoide. Desenvolvimento.

## Abstract

*Cannabis sativa* is a plant known from 4.000 B.C. for its therapeutic potential. However, in the last century, many studies have investigated and proven an endogenous system where the chemical substances coming from *C. sativa* would bind together promoting all previously observed effects. It was then elucidated by the Israeli researcher Raphael Mechoulam the endocannabinoids, helping to characterize the endocannabinoid system, from the isolation of the molecule of the first endocannabinoid mentioned in the literature. Currently, is known about the effects and pathways of synthesis, release and degradation beyond the biochemical pathways resulting from the activation of endocannabinoid receptors, CB1 and CB2, in neurons. However, little is known about the effects of this activation of the endocannabinoid system in the CNS during embryonic development. This work aims to investigate the effect of cannabinoids on the proliferation and death of embryonic retina cells from White-Leghorn chicken embryo. From methods such as: cell viability testing by colorimetry (MTT), [<sup>3</sup>H]-Thymidine incorporation, immunocytochemistry for PCNA and Western Blotting for the identification of cell cycle proteins. Our results demonstrate that the activation of the endocannabinoid system modulates the cell cycle, which can cause the death of developing cells of the retina during the embryonic period in a dose-dependent and time-dependent manner at E7 age. They also show that the cells that die are not the cells but those that are already in the process of cell differentiation.

**Key-words:** Death, Retina, Cannabinoid, Development.

## Lista de ilustrações

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Desenvolvimento embrionário da retina em vertebrados . . . . .   | 12 |
| Figura 2 – Representação da ordem de desenvolvimento das células retinianas . . . . .   | 12 |
| Figura 3 – Ilustração das camadas da retina . . . . .   | 13 |
| Figura 4 – Morte celular durante o desenvolvimento embrionário de células da retina<br>neural . . . . .   | 15 |
| Figura 5 – Representação esquemática das vias de biossíntese de 2-AG . . . . .  | 17 |
| Figura 6 – Representação das vias de biossíntese de AEA . . . . .   | 18 |
| Figura 7 – Cascata de sinalização decorrente da ativação de receptores canabinoides . .   | 20 |
| Figura 8 – Hidrólise do AEA pela FAAH . . . . .   | 21 |
| Figura 9 – Vias de Degradação do 2-AG . . . . .   | 22 |
| Figura 10 – Ensaio de imunocitoquímica para PCNA . . . . .  | 27 |
| Figura 11 – Western Blotting para a Identificação da Proteína Marcadora de Ciclo Celular<br>CDK-1 em Culturas de Células de Retina Tratadas com Agonista Canabinoide. | 34 |
| Figura 12 – Comprovante de aprovação do comitê de ética . . . . .   | 44 |

## Lista de gráficos

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Gráfico 1 – | Quantificação de células PCNA/DAPI positivas. N=1 . . . . .   | 28 |
| Gráfico 2 – | Células tratadas com doses crescentes do agonista canabinoide WIN 55, 212-2   | 29 |
| Gráfico 3 – | Curva de Concentração em Culturas de Células de Retina. . . . .   | 30 |
| Gráfico 4 – | Efeito de WIN 55,212-2 sobre a viabilidade de células de retina em cultura<br>durante intervalos de tempo crescentes. . . . . | 31 |
| Gráfico 5 – | Efeito do agonista canabinoide WIN 55,212-2, ocorre durante uma janela<br>específica do desenvolvimento. . . . .              | 32 |
| Gráfico 6 – | Efeito do agonista WIN 55, 212-2 não afeta células progenitoras . . . . .   | 33 |

## Sumário

|       |  |        |
|-------|--|--------|
| 1     | Introdução . . . . .   | 11     |
| 1.1   | Desenvolvimento da Retina . . . . .  | 11     |
| 1.2   | Histologia da Retina . . . . .   | 13     |
| 1.2.1 | Proliferação e Morte durante o desenvolvimento . . . . .   | 14     |
| 1.3   | Sistema Canabinoide . . . . .  | 16     |
| 1.3.1 | Síntese dos endocanabinoides: . . . . .  | 16     |
| 1.3.2 | Liberação de endocanabinoides . . . . .  | 19     |
| 1.3.3 | Receptores . . . . .   | 19     |
| 1.3.4 | Degradação dos endocanabinoides: . . . . .   | 21     |
| 1.3.5 | Canabinoides na Retina . . . . .   | 22     |
| 2     | Objetivo Geral . . . . .   | 23     |
| 2.1   | Objetivos específicos . . . . .  | 23     |
| 3     | Materiais e métodos . . . . .  | 24     |
| 3.1   | Ensaio de viabilidade celular por colorimetria (MTT) . . . . .                                       | 24     |
| 3.2   | Incorporação de Timidina Tritiada . . . . .  | 24     |
| 3.3   | Western Blotting: . . . . .  | 25     |
| 3.4   | Imunofluorescência para PCNA: . . . . .  | 25     |
| 3.5   | Análise Estatística: . . . . .   | 26     |
| 4     | Resultados: . . . . .  | 27     |
| 4.1   | Efeito de WIN 55, 212-2 sobre a proliferação de progenitores da retina: . . .                        | 27     |
| 4.2   | Agonista canabinoide WIN-55,212-2 induz morte celular em progenitores da retina em cultura . . . . . | 29     |
| 4.3   | WIN-55,212-2 não causa a morte de células proliferantes da retina em cultura:                        | 32     |
| 4.4   | WIN modula proteínas do ciclo celular . . . . .  | 33     |
| 4.5   | Discussão: . . . . .   | 34     |
| 5     | Conclusão . . . . .  | 37     |
|       | <br>ANEXOS   | <br>43 |

## 1 Introdução

A *Cannabis sativa*, conhecida popularmente como maconha, é atualmente a droga recreativa mais consumida em países ocidentais, incluindo os europeus, os norte americanos e a Austrália (OMS, 2016). Muito tem sido dito a respeito de sua legalização e do seu potencial terapêutico. O uso da droga é datado de 4.000 A.C., potencial esse atribuído a substâncias intrínsecas à planta (OLIVEIRA e LIMA, 2016). A principal classe de substâncias responsáveis pelos efeitos, tanto terapêuticos quanto princípios psicoativos, são os canabinoides. Dentre os canabinoides encontrados nessa planta, sabe-se que o seu princípio psicoativo está diretamente correlacionado ao THC (CHAVES, 2008). Muitos estudos sobre seu potencial analgésico, antiemético, anticonvulsivante e orexígeno já foram caracterizados, entretanto pouco se sabe sobre o papel desse sistema durante o desenvolvimento embrionário, sendo assim esse o principal enfoque do presente estudo.

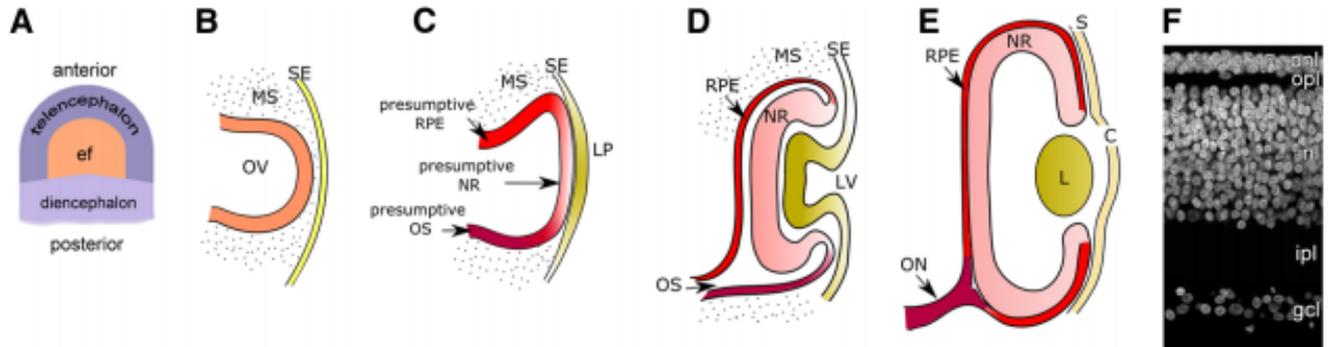
### 1.1 Desenvolvimento da Retina

O desenvolvimento da retina dos vertebrados tem início durante a fase de gastrulação onde através da indução do mesoderma pericordal ocorre a formação do campo ocular. Este, por sua vez, é dividido em dois domínios laterais, que sofrem uma invaginação dando origem a vesícula óptica. A vesícula óptica se expande através do mesênquima até atingir o ectoderma, onde há uma comunicação cruzada, ou seja uma integração dos sinais de estimulação ou inibição, entre os tecidos

O ectoderma dá origem a córnea e a vesícula óptica, os quais sofreram uma invaginação juntamente com o placódio óptico, formando o cálice óptico. Devido a essa invaginação o cálice óptico desenvolve uma bicamada celular, de forma que sua camada mais interna dá origem a retina neural enquanto a camada mais externa se diferencia em epitélio pigmentado da retina. A retina, por sua vez, irá proliferar e se diferenciar, gerando células com fenótipo neuronal e glial, organizado em camadas estratificadas (VERGARA e CANTO-SOLER, 2012)

O desenvolvimento da retina sensorial tem início ainda na vesícula óptica onde os núcleos migram para a superfície sensorial. Em seguida há a formação de uma zona neuroblástica entre as camadas internas e externas da retina, daí em diante o desenvolvimento da retina é caracterizado pela formação de outras camadas por divisão celular e migração.

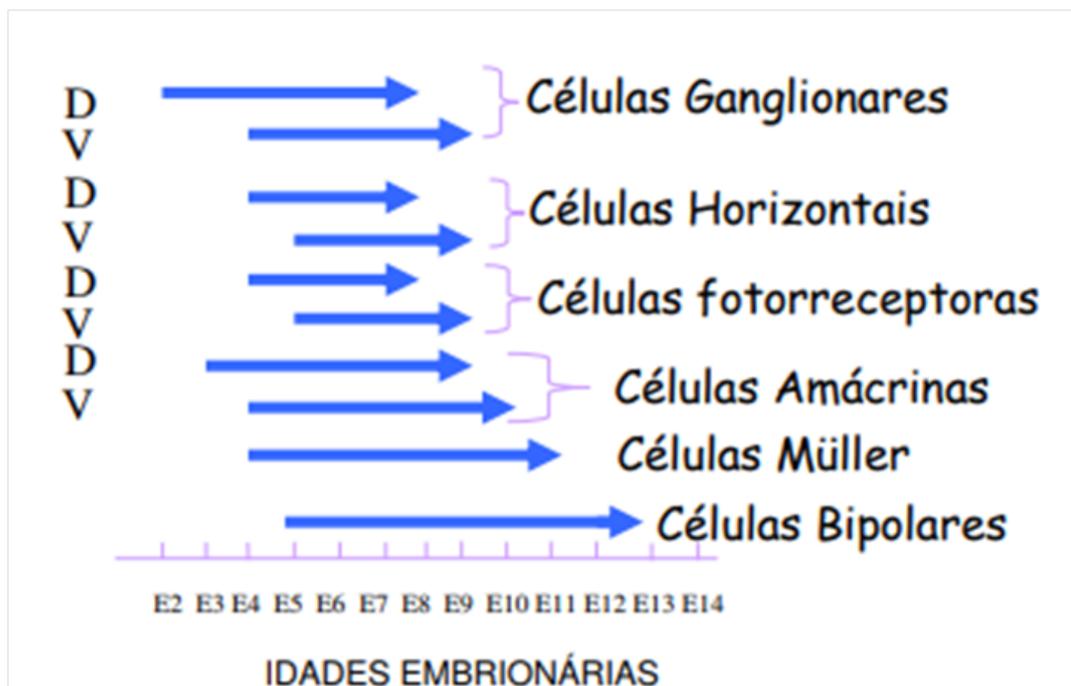
**Figura 1 – Desenvolvimento embrionário da retina em vertebrados:** (A): vê-se a camada anterior formada pelo telencéfalo e a posterior pelo diencéfalo. (B): é possível observar a formação da vesícula óptica (OV). (C): formação do epitélio pigmentar da retina (REP), da retina neural (NR) e dos domínios do placódio óptico provenientes da vesícula óptica. (D): formação do cálice óptico e da vesícula que dará origem a lente. (E): Maturação do cálice óptico e da lente. (F): corte histológico da neuroretina.



Fonte: Vergara e Canto-Soler, 2012

As primeiras células da retina a se diferenciarem são as células ganglionares, em seguida as células amácrinas, células horizontais, sendo então os fotorreceptores, neurônios bipolares e a glia de Müller as últimas células a atingirem maturação plena (GUIMARÃES, 2003).

**Figura 2 – Representação da ordem de desenvolvimento das células retinianas:** foram observadas células provenientes de duas localizações, D (dorsal) e V (ventral), da retina neural em idades embrionárias. É possível ver que as células ganglionares são as primeiras a surgirem e o último tipo celular seriam as células da glia de Müller e os neurônios bipolares..

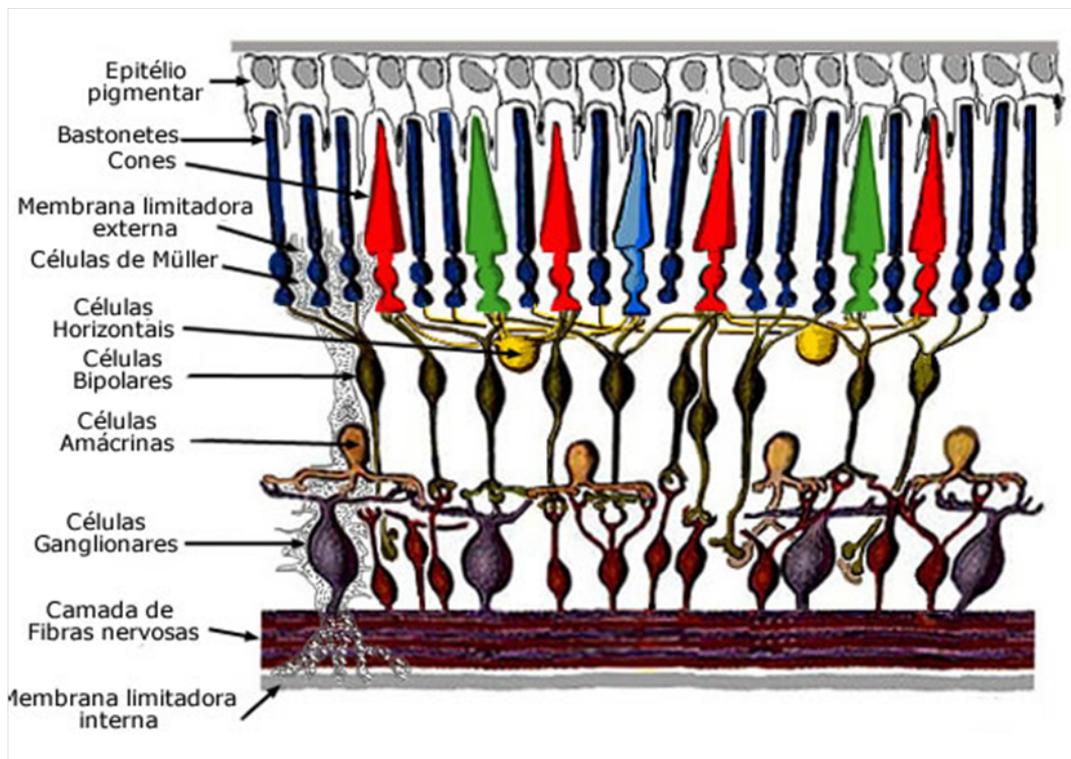


Fonte: Prada et al., 1991

## 1.2 Histologia da Retina

Durante o desenvolvimento da retina as células vão se diferenciando e migrando, separando a retina em camadas, representadas na figura 3. As camadas que compõem o tecido da retina são no total 10, sendo elas: epitélio pigmentado da retina (EPR), a camada de fotorreceptores, a membrana limitante externa (MLE), a camada nuclear externa (CNE), a camada plexiforme externa (CPE), a camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme interna (CPI), a camada de células ganglionares (CCG), a camada de fibras nervosas ópticas e a membrana limitante interna (MLI) (SLATTER, 2005).

**Figura 3 – Ilustração das camadas da retina: visualização da sua composições celular e a organização destas que leva a uma estrutura multilaminar da retina.**



Fonte: Boulton, M., Albon, J. , 2004

O EPR é formado por uma monocamada de células pigmentadas que compõem uma espécie de barreira entre o sangue e a retina (STRAUSS, 2005). Adjacente ao epitélio pigmentado encontra-se a camada de fotorreceptores, composta por cones e bastonetes. Essas são as células responsáveis pela conversão do estímulo luminoso em potenciais eletroquímicos. De forma resumida, os potenciais eletroquímicos serão transmitidos para as células bipolares, chegando as células ganglionares, que por sua vez conduzirá a informação até os centros superiores da visão através do nervo óptico (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

Além dos fotorreceptores, células bipolares e ganglionares, existem camadas compostas pelas células horizontais, amácrinas e células de Müller. As células horizontais possuem prolongamentos que realizam contatos com diversos fotorreceptores, enquanto as células amácrinas fazem

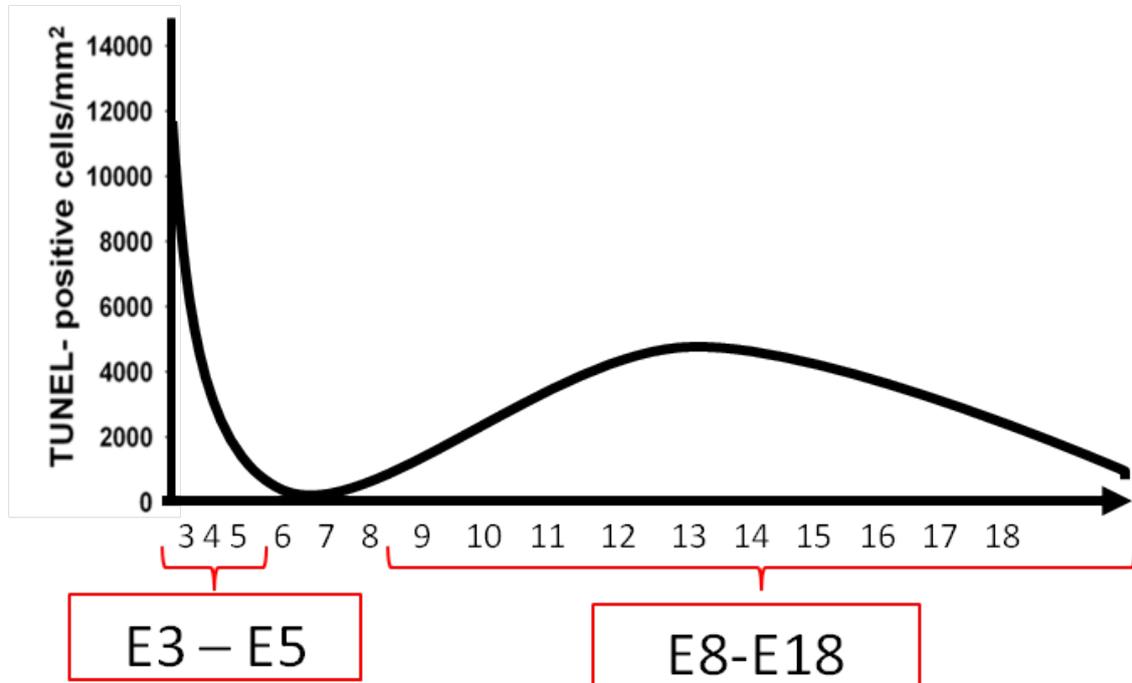
contato com células ganglionares. Já as células de Müller, o qual constitui o principal fenótipo glial encontrado na retina, possui as funções de nutrir, sustentar, isolar e modular a transmissão sináptica entre os neurônios da retina. As principais camadas que apresentam esses tipos celulares são a camada plexiforme externa, onde ocorrem as sinapses axo-dendríticas entre as células bipolares, horizontais e amácrinas; A camada nuclear interna, composta pelos núcleos de células de Müller, das células bipolares, horizontais e amácrinas; A camada plexiforme interna onde há os prolongamentos de células ganglionares, bipolares e amácrinas e sinapses entre os axônios de células bipolares e os dendritos das células ganglionares (BEAR, CONNOR e PARADISO, 2008; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

A camada de células ganglionares é composta pelo corpo das células ganglionares. Os axônios deste tipo celular não se ramificam, sendo eles enviados para a formando camada de fibras do nervo óptico, onde se agrupam para formando nervo óptico. Sendo por fim a membrana limitante interna composta por células de Müller que formam uma barreira para a retina (BEAR, CONNOR e PARADISO, 2008; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

#### 1.2.1 Proliferação e Morte durante o desenvolvimento

Durante o período embrionário enquanto a retina está se desenvolvendo existem picos de morte celular programada (Figura 4). A morte celular programada (apoptose) acontece simultaneamente a proliferação, diferenciação e sinaptogênese das células e a formação das camadas celulares da retina por migração. Alguns autores creem que essa morte celular serve para moldar a retina durante o processo proliferativo e de diferenciação (VALENCIANO; BOYA e DE LA ROSA, 2009).

**Figura 4 – Morte celular durante o desenvolvimento embrionário de células da retina neural: A imagem acima representa graficamente os picos de morte celular programadas durante o desenvolvimento embrionário da retina de vertebrados, especificamente em embriões de galinha. O primeiro pico ocorre entre as idades embrionárias de 3 a 5 dias, e o segundo pico ocorre entre as idades embrionárias de 8 a 18 dias.**



Fonte: adaptado de Valenciano, Boya e De La Rosa, 2009

Esse processo proliferativo é ditado por fatores de transcrição forkhead que são os principais genes reguladores da proliferação e diferenciação das células da retina (MOORE, 2016), além deles é possível também observar genes como os da família hedgehog (PITTACK; GRUNWAL; REH, 1997). Sabe-se que dentre genes e fatores reguladores da proliferação da retina, é possível observar fatores como, fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), sinalização Notch-delta, o gene Wnt2b, o fator de transcrição Hes1, histona desacetilase (Hdac), homeobox da retina (Rax), o gene sonic hedgehog (SHH), o fator de transcrição homeobox Vsx2, além é claro de reguladores positivos do ciclo celular como a ciclina D1 e negativos como por exemplo a p27Kip1 (LARSEN, 2016; PITTACK; GRUNWAL; REH, 1997; MORALES et al., 2005). Após a proliferação então o FGF passa a ser um dos fatores de indução de diferenciação, como fatores bHLH, Pax6. (LARSEN, 2016). Além de todos os fatores envolvidos, atualmente estudos demonstram que o sistema canabinoide estaria atuando como modulador do desenvolvimento de células do sistema nervoso central, atuando em diversos processos, dentre os quais proliferação, migração, crescimento axonal, neuroproteção, sinaptogênese e também interferir na maturação de sistemas de mediadores neurais (CHAVES, 2008).

### 1.3 Sistema Canabinoide

O sistema canabinoide é amplamente conhecido pelos efeitos psicoativos observados no SNC decorrente da estimulação de receptores canabinoides presentes no sistema nervoso pelo canabinoide delta-9-tetrahydrocannabinol, mais comumente conhecido por THC. Entretanto pouco foi observado no seu papel durante o desenvolvimento do SNC.

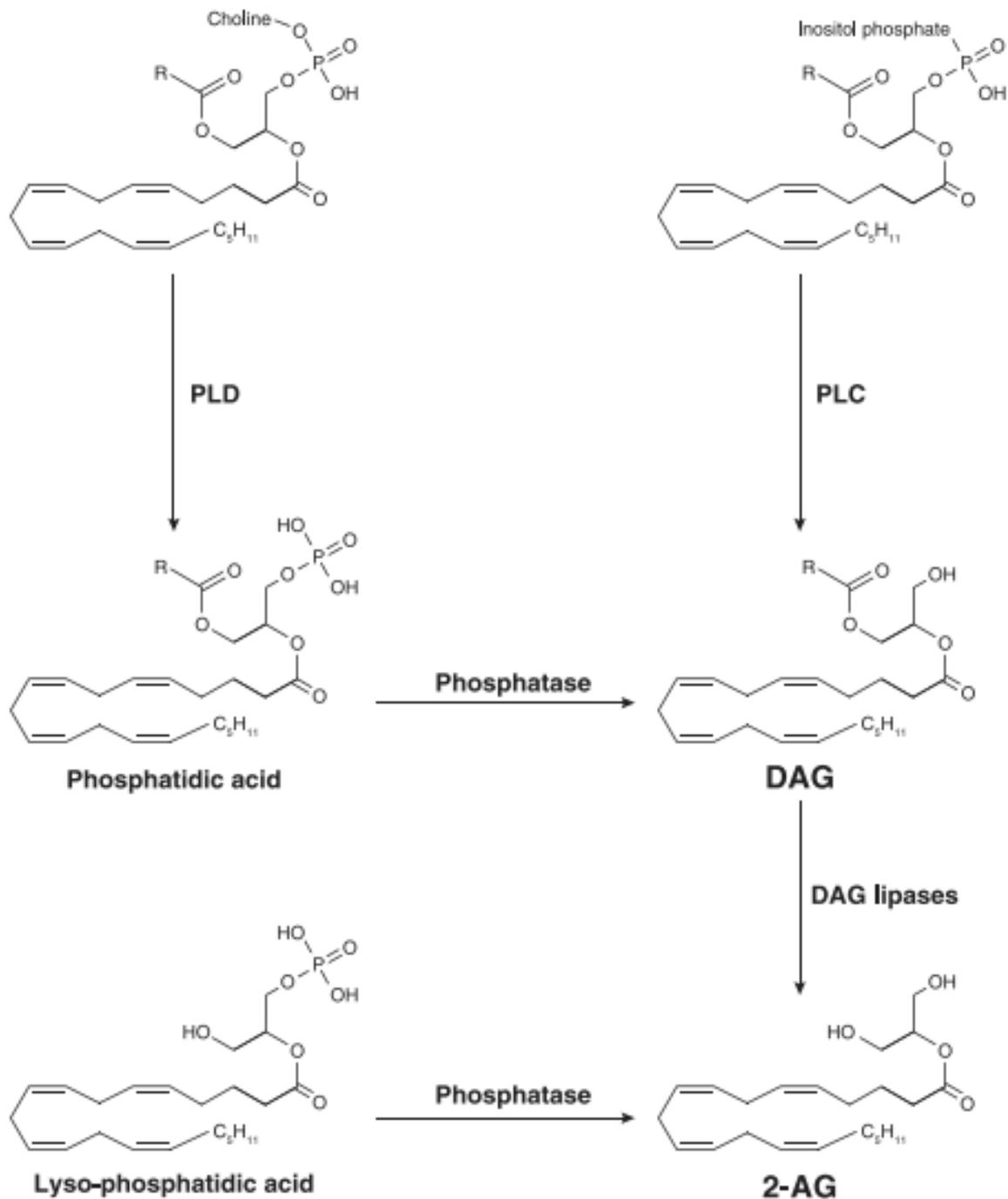
O sistema endocanabinoide é composto basicamente por receptores, enzimas de síntese e degradação, transportadores, receptores metabotrópicos e ionotrópicos e moléculas de origem lipídica e protéica. Dentre as moléculas de origem lipídica citadas há duas estruturas endógenas, que atuam nos mesmos receptores estimulados pelos canabinoides observados na *Cannabis sativa*, sendo elas a N-araquidonoiletanolamina (anandamida, AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Essas moléculas são capazes de ativar os receptores canabinoides CB1 e CB2 (DOW-EDWARDS e SILVA, 2017). Além desses lipídeos existe a hemopressina, um resíduo peptídico derivado da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina, que tem a capacidade de atuar como agonista inverso do receptor canabinoide CB1. Por inibir o receptor canabinoide CB1 esse peptídeo é capaz de exibir alguns efeitos como por exemplo alterar a nocicepção (GOMES et al., 2009).

#### 1.3.1 Síntese dos endocannabinoides:

Os endocannabinoides, de forma geral, são sintetizados por demanda em neurônios pós-sinápticos. Entretanto, cada canabinoide endógeno é obtido por enzimas e vias específicas. No caso dos endocannabinoides de origem lipídica, sua síntese tem início após um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  promovendo a ativação de lipases que irão converter os fosfolipídeos em canabinoides (SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010).

A síntese do 2-AG ocorre a partir do 1,2-diacylglicerol (DAG). O DAG pode ser sintetizado de duas formas. Uma forma seria através hidrólise do seu precursor gliceril-fosfatidilinositol por fosfolipases do tipo C (PLC), gerando DAG que será convertido em 2-AG pela DAGL. Outra forma seria pela ação combinada da fosfolipase D (PLD) e da fosfatase do enzima ácido fosfatídico fosfatase sobre o precursor gliceril-fosfatidilcolina gerando DAG. O 2-AG é obtido quando aminoácidos contidos na espécie DAG são hidrolisados pelas DAGL. Na retina é sabido que existem duas isoformas da mesma enzima responsável pela produção de 2-AG, as isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  da enzima diacylglicerol lipase (DAGL) que são responsáveis pela conversão. Outra forma de obter o 2-AG seria pela desfosforilação do ácido araquidônico-lisofosfatídico pela enzima ácido fosfatídico fosfatase (BISOGLIO et al., 2003; J-HU e MACKIE, 2015; TURCOTTE et al, 2015). A figura 5 representa as vias possíveis de biossíntese de 2-AG.

**Figura 5 – Representação esquemática das vias de biossíntese de 2-AG: O DAG (1,2-diacilglicerol) é sintetizado principalmente pela clivagem do inositol fosfato pela fosfolipase C, obtendo-se o DAG que é convertido pela enzima DAG lipase em 2-AG (2-araquidonoilglicerol).**

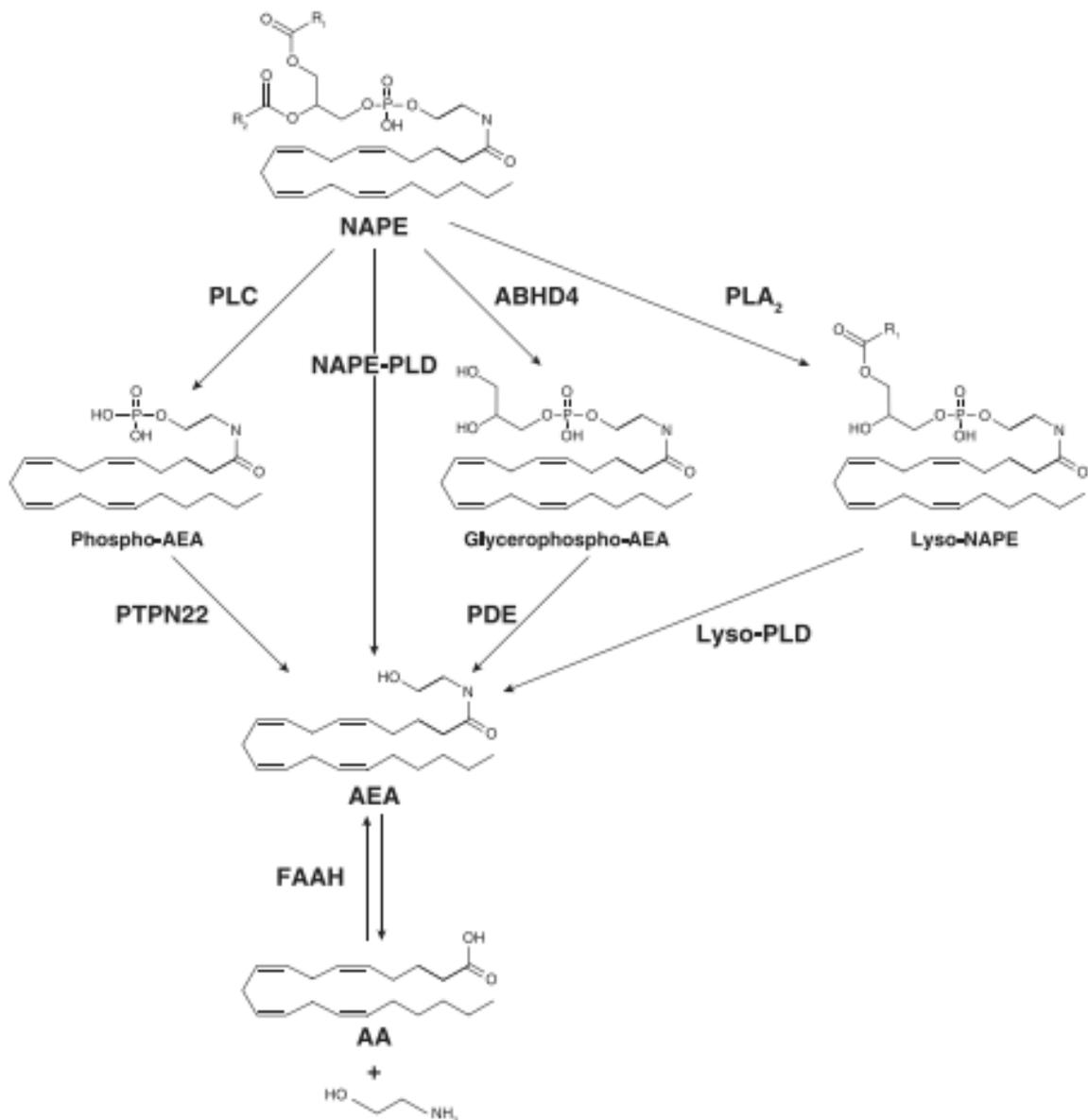


Fonte: Turcotte et al, 2015

Outro endocanabinoide sintetizado é o AEA, que é produzido em dois passos por duas enzimas: a aciltransferase dependente de cálcio (NAT) e a fosfolipase D (PLD). O principal precursor do AEA é a N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) que é oriundo da acilação da porção etanolamina da fosfatidil-etanolaminas pela NAT dependentes e independentes de cálcio. Inicialmente o NAPE é hidrolisado por pelo menos duas PLD distintas específicas para o NAPE. Em

seguida o NAPE é hidrolisado pela PLC gerando a fosfo-AEA, que é desfosforilado pela fosfatase PTPN22. A geração da liso-NAPE é realizada em duas etapas, passando pela fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) seguida de hidrólise pela liso-PLD. A geração da liso-NAPE pela atividade da PLA<sub>2</sub> hidrolisando em glicerofosfo-N-araquidonoil-etanolamina pela sétima esterase ABHD4, seguido da ativação da glicerofosfodiesterase (TURCOTTE et al, 2015). A figura 6 representa as diversas vias para a produção de AEA a partir de seu precursor.

**Figura 6 – Representação das vias de biossíntese de AEA: Existem diversas vias de obtenção do AEA. Entretanto, a principal via de síntese de AEA representada no esquema é a via onde o NAPE, originário de um fosfolípido de membrana, é fosforilado pela enzima NAPE-PLD (fosfolipase D).**



Fonte: Turcotte et al, 2015

Entre outras funções estudadas como o de Britts et al. (1996) correlacionam a enzima DAGL com o crescimento axonal, sugerindo que há um papel da enzima como um neuromodula-

dor durante o desenvolvimento neural.

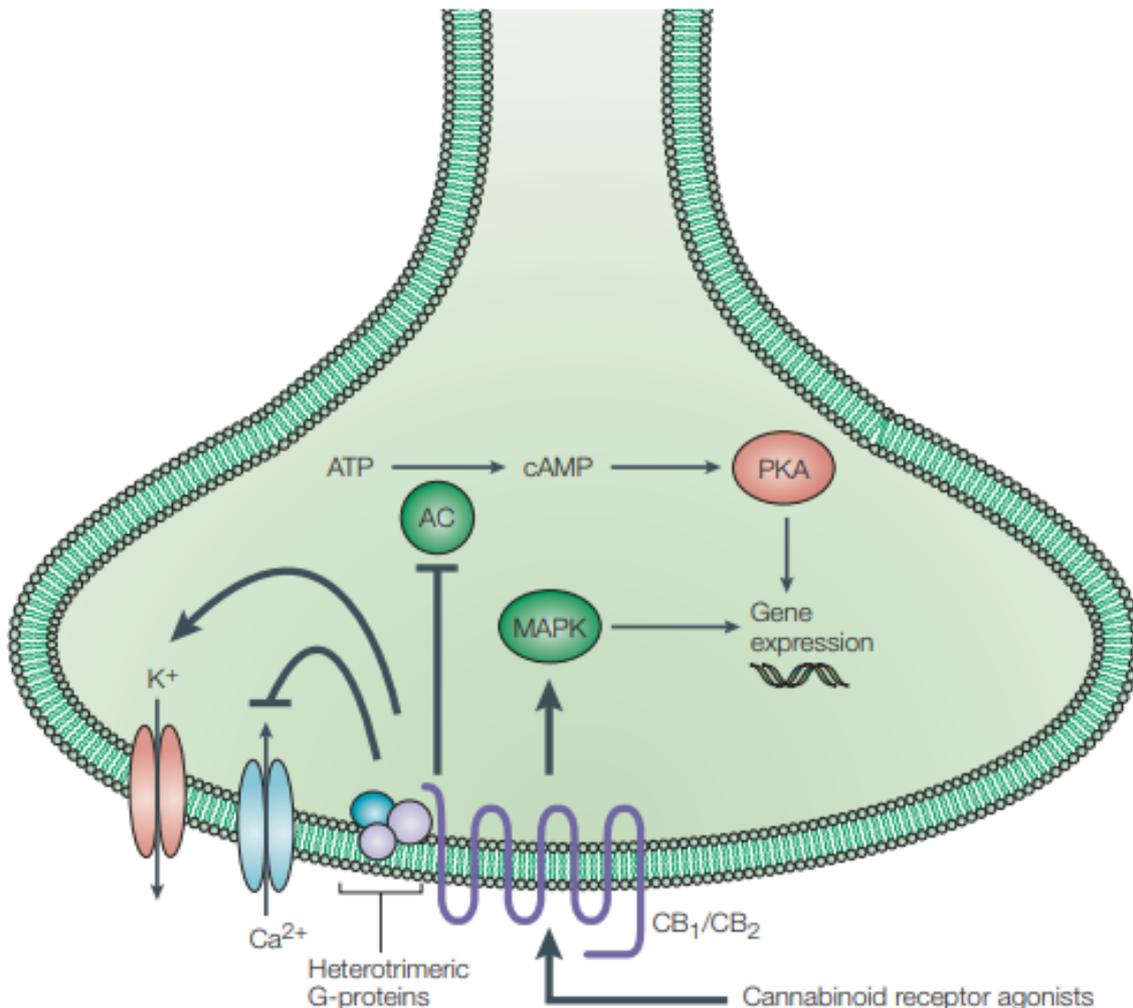
### 1.3.2 Liberação de endocanabinoides

Por serem sintetizados por demanda os endocanabinoides não ficam armazenados em vesículas secretoras como a maioria dos neurotransmissores, sendo liberados na fenda logo a seguir de sua síntese. Alguns autores defendem que por sua lipossolubilidade os endocanabinoides podem atingir a fenda sináptica por meio de difusão livre ou assistida (SAITO et al., 2010). Entretanto existem transportadores, como o transportador de membrana da anandamida (AMT) (BASAVARAJAPPA, 2007). O AMT é capaz não só de transportar a anandamida como também o 2-AG, entretanto a estrutura desse transportador ainda não foi isolada (BATTISTA et al., 2005).

### 1.3.3 Receptores

Os receptores canabinoides, denominados CB1 e CB2, são classicamente-acoplados a proteína  $G_{i/o}$ , apresentando sete domínios transmembrana. O Receptor CB1 é um receptor que devido ao seu acoplamento com a proteína  $G_{i/o}$  pode regular variados canais de cálcio e potássio, sendo encontrados em neurônios centrais e periféricos. Os agonistas desse receptor demonstram ser mensageiros retrógrados. É associado a respostas do SNC aos agonistas canabinoides, dentre elas analgesia, atenuação de náuseas e diminuição da motilidade intestinal (PERTWEE, 2000; PIOMELLI et al., 2000).

**Figura 7 – Cascata de sinalização decorrente da ativação de receptores canabinoides:** Na imagem é possível ver que a ativação dos receptores canabinoides pelo agonista ativa a MAPK (proteína quinase ativadora de mitógeno) induzindo a expressão gênica. Além disso a ativação do receptor causa a inibição da adenilil ciclase, impedindo a conversão de ATP em AMP cíclico, diminuindo a expressão de PKA e inviabilizando a fosforilação de canais de potássio dependentes de AMPc, levando a um influxo de potássio, o que faz com que os canais de cálcio voltagem dependentes se fechem.



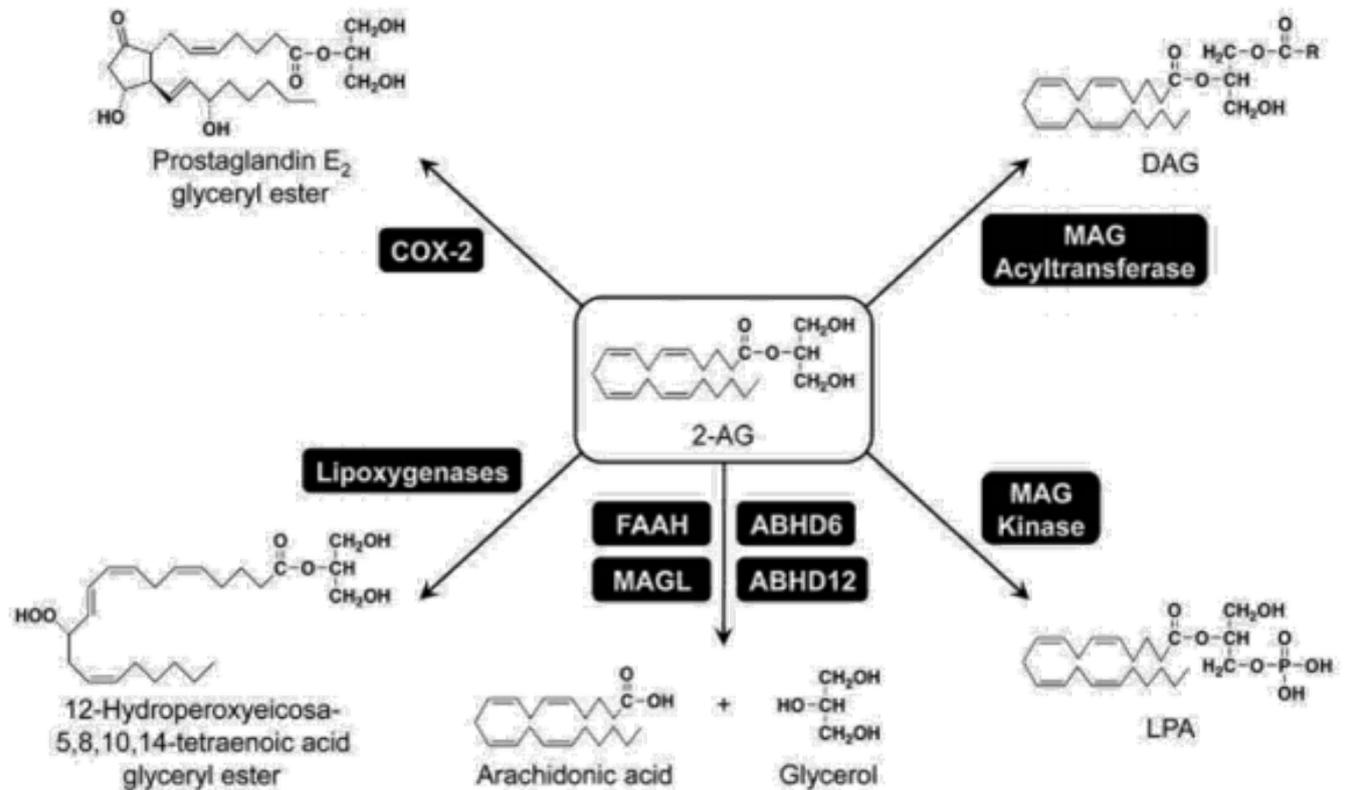
Fonte: Di Marzo; Bifulco e Petrocellis, 2004

Os receptores CB2 foi primariamente associado a células imunes entretanto não podem ser unicamente correlacionadas a estas (HOWLETT et al., 2002). Sendo esse tipo de receptor também encontrado em neurônios e células gliais. Ambos os receptores compartilham a mesma via de transdução de sinal (figura 7), como a inibição a adenililciclase e estimulação da MAPK (proteína quinase ativadora de mitógeno) (PALMER; THAKUR; MAKRIYANNIS, 2002).

As principais diferenças entre os receptores são as suas sequências de aminoácidos, seus mecanismos de sinalização e sua distribuição pelos tecidos (HOWLETT et al., 2002). Embora os endocanabinoides atuem principalmente nos receptores CB1 e CB2, o AEA ainda pode atuar em sítios intracelulares de canais iônicos como o receptor vanilóide TRPV1 e canais de cálcio tipo T (PETROCELLIS; CASCIO; DI MARZO, 2004).



**Figura 9 – Vias de Degradação do 2-AG:** O 2-araquidonoil glicerol (2-AG) é degradado por diversas vias entretanto a principal via de degradação é a que participa a enzima MAG lipase, que converte o 2-AG em ácido araquidônico e glicerol.



Fonte: UEDA et al., 2010

Na figura acima é possível observar além das várias vias de degradação do 2-AG, que a enzima FAAH é capaz também de degrada-lo.

### 1.3.5 Canabinoides na Retina

Nas células da retina é possível encontrar receptores canabinoides. O receptor CB<sub>1</sub> por exemplo é encontrado nas células amácrinas, células horizontais, e nos terminais axonais de fotoreceptores (HU e MACKIE, 2015). Foi visto que em retinas adultas, de modo geral, os canabinoides inibem a transmissão de neuromoduladores. Estudos demonstram que a atuação do receptor CB<sub>1</sub> reduz a liberação de noradrenalina e de dopamina, sendo também capazes de modular a liberação de glutamato (BOUCHARD et al., 2015). Além disso canabinoides sintéticos em retina de galinha são capazes de modular os efeitos da liberação de GABA (WARRIER e WILSON, 2007). Entretanto poucos estudos demonstram os efeitos da estimulação desses receptores durante o desenvolvimento embrionário da retina.

## 2 Objetivo Geral

Investigar o efeito de canabinoides sobre a proliferação e a morte de células da retina embrionária de embrião de galinha da espécie White-Leghorn.

### 2.1 Objetivos específicos

- Investigar a ação do agonista canabinoide WIN 55, 212-2 sobre a proliferação e a viabilidade de células na retina de galinha em cultura com diferentes estágios de maturação.
- Verificar o papel do agonista canabinoide WIN 55,212-2.
- Investigar o tipo de células de retina embrionária que estariam morrendo por estímulo do WIN 55, 212-2.
- Estudar a participação de proteínas do controle do ciclo celular em culturas de células de retina tratadas com agonista canabinoide.

### 3 Materiais e métodos

Para obtenção das culturas de células de retina, foram utilizados embriões de galinha White-Leghorn em idade E7 (7 dias de desenvolvimento) oriundos do Estado do Rio de Janeiro. As retinas foram dissecadas em fluxo laminar e transferidas para 1 mL de solução salina sem cálcio e sem magnésio (CMF), posteriormente sendo dissociadas através de digestão enzimática utilizando tripsina 0,1% por 15 min, à 37° C. Em seguida a solução de tripsina é removida e há a dissociação mecânica das células em 5 mL de meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina e glutamina 2 mM (MEM completo). Após a devida dissociação mecânica das células, foram acrescentados mais 5,0 mL de MEM, obtendo uma solução com volume final de 10 mL. Em seguida, 10 µL da solução contendo as células foram pipetadas em cada lado da câmara de Neubauer, a fim de estimar a densidade celular, e em seguida semeá-las em placas de Petri com 35mm de diâmetro, obtendo uma densidade de células de aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  células / placa. Já para as placas com 24 poços, a densidade de células foi de  $1 \times 10^6$  células / poço. As culturas foram incubadas a 37 °C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Este trabalho possui aprovação em comitê de ética: CEUA-UNIRIO 2016.02.

#### 3.1 Ensaio de viabilidade celular por colorimetria (MTT)

A viabilidade celular foi investigada através do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-4,5-Dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazol) proposto pela primeira vez por Mosmann (Mosmann 1983). Células da retina foram semeadas em placas de cultura contendo 24 poços na densidade de  $1 \times 10^6$  células / poço, como descrito anteriormente. Após 24h de cultivo, as células foram tratadas com concentrações crescentes de WIN 55,212-2 (0,5 µM , 1 µM e 5 µM), um agonista de receptores canabinoides CB1 e CB2, e mantidas em estufa à 37°C, umidificada e contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h de tratamento com WIN, as células foram incubadas com 1,5mg/mL de MTT em tampão Hank's (HEPES 20 mM, NaCl 128 mM, KCl 4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2M, MgCl<sub>2</sub> 2,4M e glicose a 4mM, pH 7,4) durante 1h e 30 min em banho maria à 37°C. Em seguida a lise celular foi realizada com solução ácido/alcoólica de HCl 12 N e álcool isopropílico absoluto (6:1000) e a leitura das amostras foi realizada em um espectrofotômetro nos comprimentos de onda 550/650 nm.

#### 3.2 Incorporação de Timidina Triteriada

A proliferação celular foi investigada submetendo as células ao protocolo de incorporação de [<sup>3</sup>H]-Timidina. Culturas de células foram semeadas em placas de Petri de 35 mm na densidade de  $4 \times 10^6$  células por placa. Após 24h de cultivo (E7C1), as células foram tratadas com quantidades crescentes de WIN 55,212-2 (0,5µM , 1µM e 5µM) durante 24 horas. Foi administrado as culturas 0,2 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina e após 1h de incubação as placas foram lavadas

com 1 mL de MEM-HEPES, pH 7.4. O meio de lavagem foi removido e 200  $\mu$ L de NaOH 0,4 N foram adicionados ao material celular aderido à placa, com a finalidade de dissolvê-lo. A mistura foi então homogeneizada em água Milli-Q gelada e transferida para tubos de ensaio onde são acrescentados 600  $\mu$ L de TCA 50% para precipitação de proteínas e DNA, e as amostras foram incubadas à 4°C por 30 min. Dado o tempo, a suspensão foi filtrada em filtro de fibra de vidro (GBF), seguido de lavagens com 3 x 2 mL de TCA 5%. Os filtros foram colocados em estufa por 1 hora a 100°C. Por fim os filtros foram levados ao cintilador para quantificação da radioatividade incorporada ao DNA.

### 3.3 Western Blotting:

As culturas foram obtidas como descrito anteriormente, semeadas em placas de cultivo de 35 mm, na densidade de  $1 \times 10^6$ . Em E7C1 as culturas foram tratadas com WIN55,212-2 (0,5 e 1  $\mu$ M) por 24 horas. Em E7C2, as células foram lisadas com 60  $\mu$ L de Tampão de amostra. As amostras foram fervidas em banho à 100°C durante 5 minutos. As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford. As proteínas foram separadas por peso molecular utilizando gel de acrilamida/bis-acrilamida a 9%. Após transferidas para membranas de PVDF, as proteínas foram identificadas por peso molecular e as membranas foram cortadas nas respectivas bandas de interesse. Em seguida, as membranas foram colocadas em solução de bloqueio por 1 h e 30 minutos (TBS-T / leite 5%) e no anticorpo primário, anticorpo monoclonal da CDC2 (anti-coelho CDK1) e para sua forma fosforilada pCDC2 (anti-coelho pCDK1) produzidos pela empresa Cell Signaling, na diluição 1:1000, overnight a 4°C. As membranas foram então lavadas com TBS-T e incubadas por mais 1 h e 30 minutos no anticorpo secundário anti-coelho (1:5000), após esse tempo as membranas foram lavadas e exposta a solução de ECL, sendo então reveladas no aparelho Chemi-doc.

### 3.4 Imunofluorescência para PCNA:

As culturas foram obtidas como escrito previamente, semeadas em placas de cultivo de 35 mm, na densidade de  $5 \times 10^6$  células pro placa. Em E7C1 as culturas foram tratadas com WIN 55,212-2 na concentração de 0,5  $\mu$ M por 24 horas. Em E7C2 às células foram lavadas com MEM sem soro e foram recolhidas por digestão enzimática realizada com 800  $\mu$ L de Tryple à 37 °C durante 5 minutos. Foi então retirado o excesso da enzima e as células foram lavadas da plaquinha com MEM completo. As células foram transferidas para um tubo falcon, onde adicionou-se 4 mL de MEM completo por tubo, e foram homogeneizadas. As células foram centrifugadas por 4 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante é descartado afim de retirar o máximo da enzima ainda presente. Adicionou-se 1 mL de MEM completo e o pellet de células foi ressuspenso e as células de cada tubo foram contadas na câmara de Neubauer. Foram então plaqueadas  $5 \times 10^5$  células por lamínula de 20 mm x 20 mm, pré tratadas com 250  $\mu$ L de Poli-L-Ornitina 25  $\mu$ g/mL, e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C por 1 hora. As células são

então fixadas com uma solução de paraformaldeído à 4% por 15 minutos, e lavadas 3 vezes com 1 mL PBS( KCl 27 mM, NaCl 1360 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14,7mM, pH 7,4). As culturas são colocadas em uma solução de PBS - Triton à 0.25%, e em seguida são submetidas ao Tampão citrato (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, pH 6,0) e fervidas durante 10 minutos. Após resfriar as culturas foram postas em solução de bloqueio (PBS - BSA 1%) por 1 hora e 30 minutos. Na sequência as células foram tratadas com o anticorpo primário para PCNA (anti-mouse Cell Signaling), na diluição de 1:600 e incubadas overnight. Em seguida as células são lavadas 3 vezes com 1 mL de PBS e incubadas com o anticorpo secundário fluorescente ALEXA 568 (anti-mouse Invitrogen), na diluição de 1:200 por 2 horas. As lamínulas são novamente lavadas e sequencialmente tratadas com Dapi por 1minuto. Por fim as lamínulas são lavadas novamente e as lâminas são montadas com auxílio do Kit Dako.

### 3.5 Análise Estatística:

A quantificação foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism 5*. A análise de variância ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni (comparando todos os pares de colunas) foi realizada em dados com 3 ou mais recorrências. Em todos os gráficos está representada a média e o erro padrão da média (média ± E.P.M.). São considerados significativos apenas valores de  $p < 0.05$ .

## 4 Resultados:

### 4.1 Efeito de WIN 55, 212-2 sobre a proliferação de progenitores da retina:

Afim de investigar se o agonista canabinoide WIN55,212-2 modularia a proliferação buscamos primeiramente investigar o PCNA (antígeno nuclear de proliferação) uma proteína utilizada como um marcador de proliferação. Para isso, células de retina foram, tratadas em E7C1 com o agonista canabinoide WIN-55,212-2 na dose de 0,5  $\mu$ M por 24 horas, e submetidas a ensaio imunocitoquímico para marcação de PCNA como observado na figura 10 e no gráfico 1, houve uma considerável redução das células PCNA positivas em relação ao controle.

**Figura 10 – Agonista canabinoide diminui a proliferação de progenitores da retina embrionária em cultura: Células de E7C1 tratadas com WIN-55,212-2 0,5  $\mu$ M por 24h. Em vermelho núcleos marcados com DAPI. Em verde núcleos marcados com PCNA.**

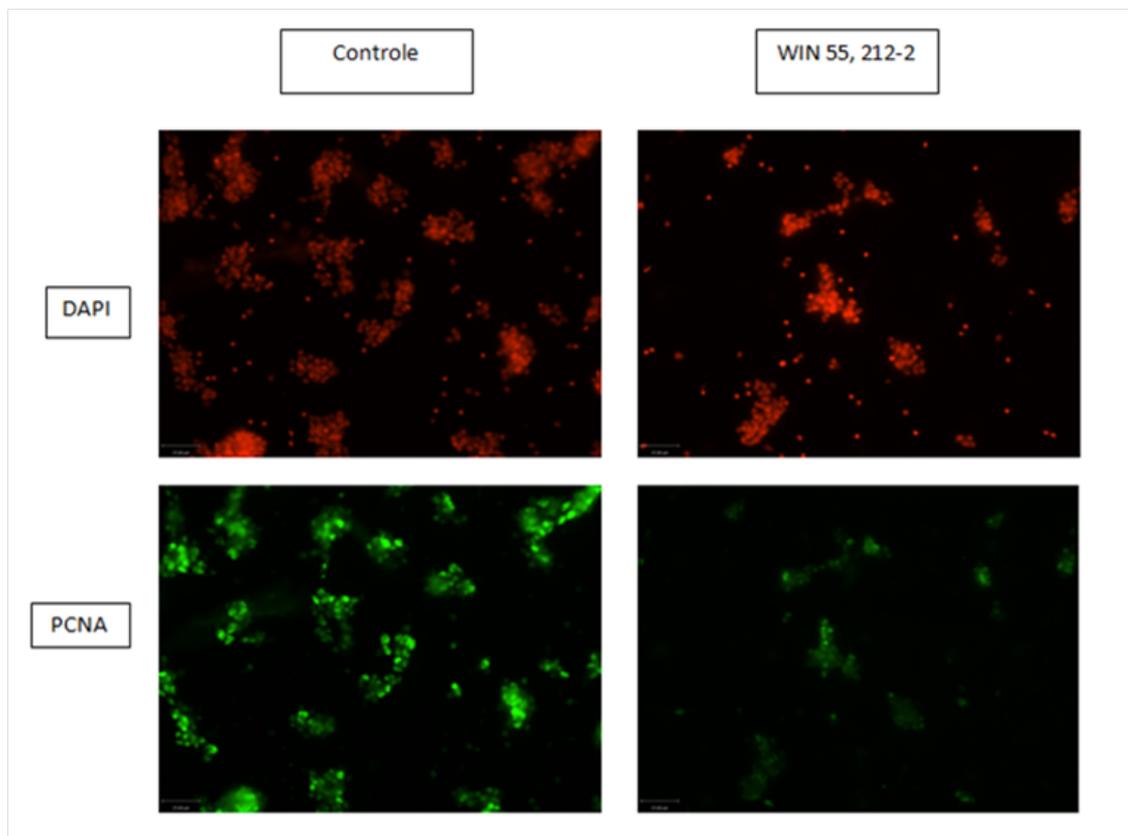
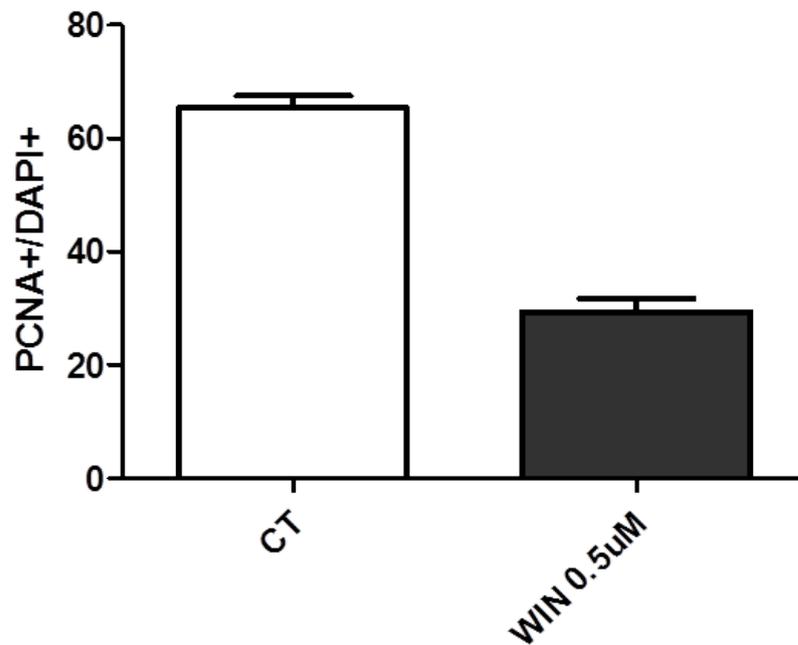
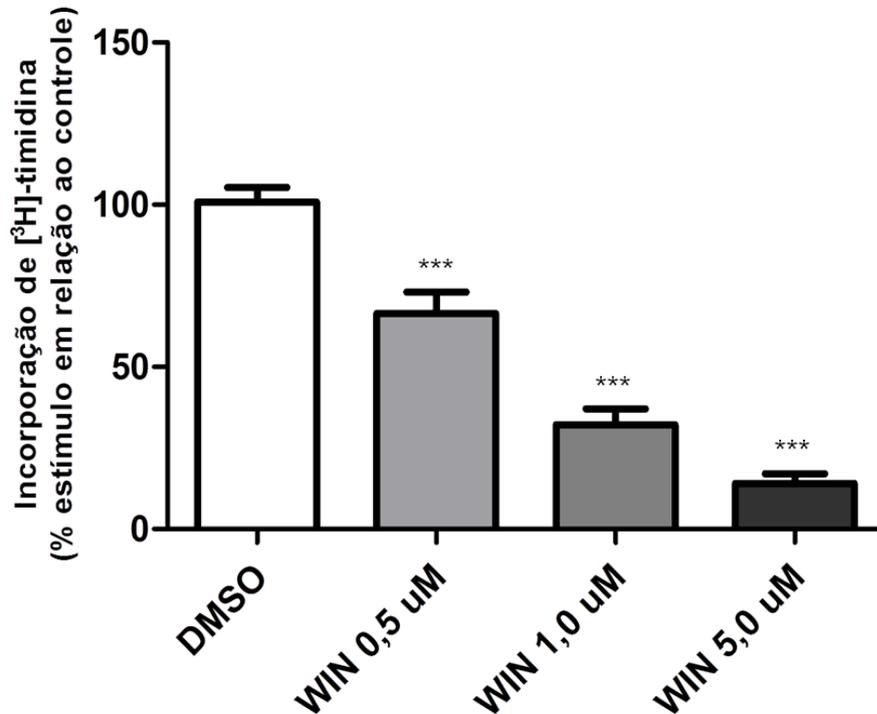


Gráfico 1 – Quantificação de células PCNA/DAPI positivas. N=1



Com o objetivo de reforçar a hipótese de que WIN controla a proliferação na retina embrionária, submetemos nossas culturas ao ensaio de incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina, um método que permite a identificação das células na fase S do ciclo celular. Para isso, culturas de E7C1 foram tratadas com concentrações crescentes de WIN µM (0,5; 1; 5) durante 24 horas e submetidas ao protocolo de incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina. Conforme exposto no gráfico 2, o tratamento com WIN causou uma diminuição da incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina, de forma dependente da dose (% em relação ao controle ± erro padrão: controle: 100 ± 11; WIN 0,5 µM: 64 ± 17; WIN 1,0 µM: 29 ± 13; WIN 5,0 µM: 14 ± 4).

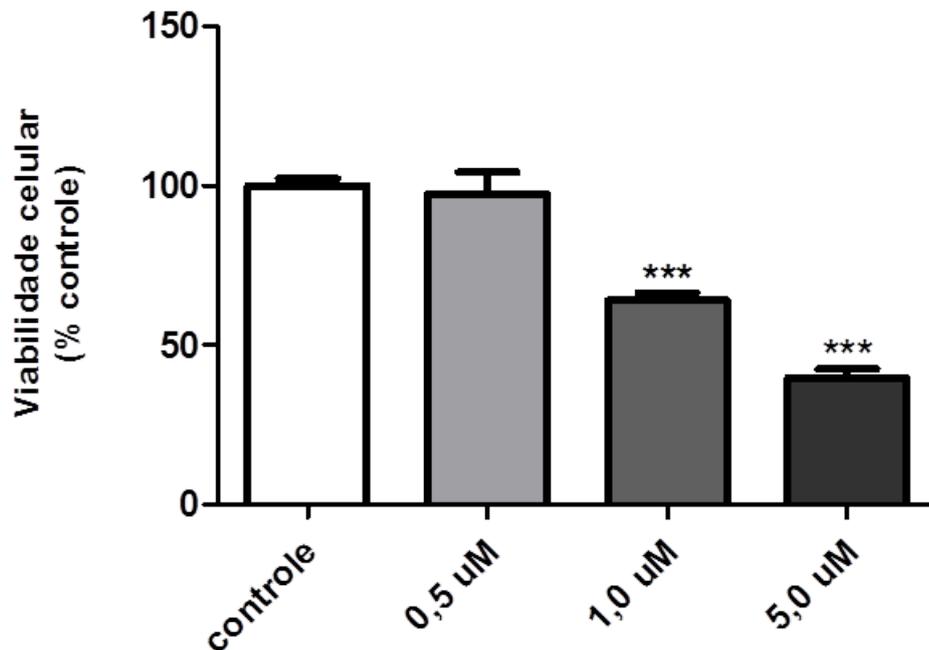
Gráfico 2 – WIN-55,212-2 diminui a incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina em culturas de células de retina: Células em E7C1 tratadas com doses crescentes do agonista canabinoide WIN 55, 212-2 durante 24h e foram posteriormente incubadas com [<sup>3</sup>H]-Timidina e quantificadas por cintilação. Em todas as doses foi observada uma redução significativa em relação ao controle. p<0,05 N= 7



#### 4.2 Agonista canabinoide WIN-55,212-2 induz morte celular em progenitores da retina em cultura

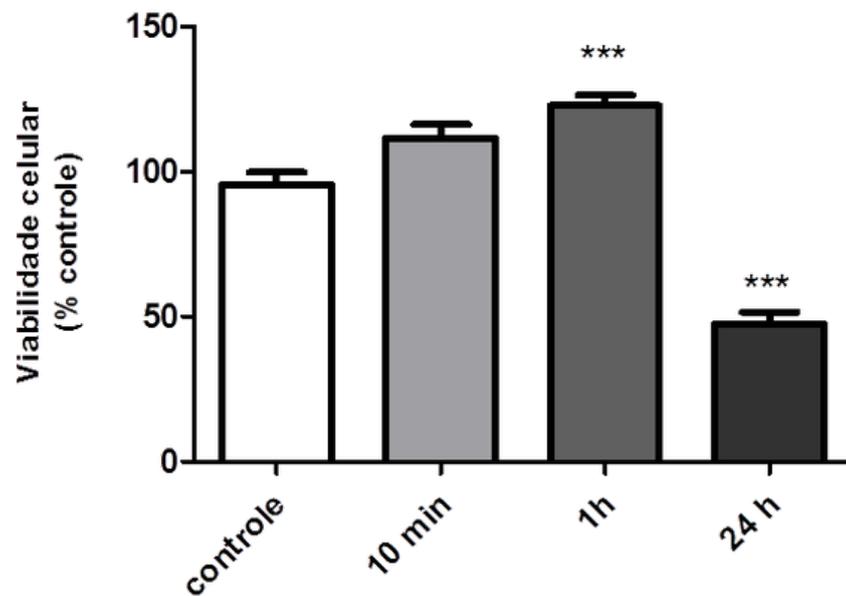
Uma vez notada a redução na proliferação celular após o tratamento com WIN, algumas hipóteses foram traçadas. As células podem ter interrompido o ciclo celular (arresto), podem ter sofrido diferenciação ou até mesmo morte celular. Com o intuito de investigar a morte celular, culturas de retina de E7C1 foram tratadas com doses crescentes de WIN 55,212-2 µM (0,5; 1,0 e 5,0). Após 24h de incubação as células foram submetidas ao protocolo de viabilidade celular por MTT. Como observado na gráfico 3, não foram observadas diferenças significativas entre o controle e WIN 0,5 µM, entretanto nas doses de 1,0 µM e 5,0 µM, WIN diminuiu a viabilidade de progenitores da retina (% do controle ± erro padrão: DMSO: 100 ± 9; WIN 0,5 µM: 97 ± 18; WIN 1,0 µM: 64 ± 9; WIN 5,0 µM: 39 ± 10).

Gráfico 3 – Efeito de WIN-55,212-2 sobre a viabilidade de células da retina em cultura: Culturas de E7C1 foram mantidas por um dia em cultivo sendo posteriormente tratadas com doses crescentes de WIN 55,212-2 e foram submetidos ao ensaio colorimétrico de viabilidade celular e tiveram sua absorbância calculada pelo espectrofotômetro com comprimentos de onda entre 550nm e 650 nm. Diferenças estatísticas não foram significativas entre o controle e a concentração de 0,5  $\mu$ M, entretanto as doses de 1,0  $\mu$ M e 5,0  $\mu$ M possuem diferença significativa em relação ao controle, em relação a dose de 0,5  $\mu$ M e entre elas. Amostras são significativas estatisticamente quando  $p < 0,05$ . N=4.



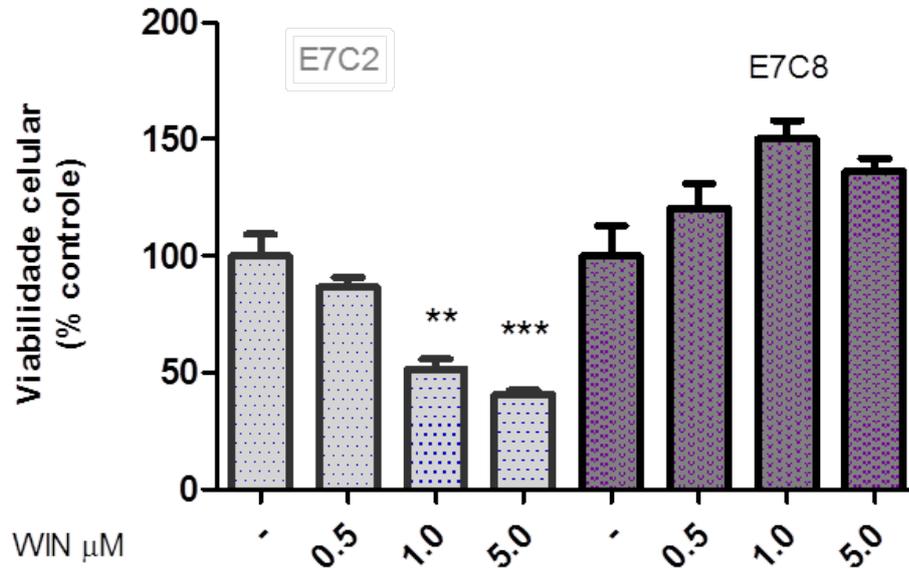
Observada uma relação entre a redução da viabilidade celular induzida pelo tratamento com o agonista canabinoide durante uma exposição de 24h, questionamos se haveria o mesmo efeito em estímulos realizados em um menor espaço de tempo. Para isso, culturas de E7C1 foram tratadas com WIN 1  $\mu$ M durante 10 minutos, 1 hora e 24 horas e submetidas ao ensaio de viabilidade celular (MTT). Como observado no gráfico 4, WIN não causa morte celular durante intervalos curtos de tempo (% em relação ao controle  $\pm$  erro padrão: controle:  $100 \pm 4$ ; 10 minutos:  $119 \pm 5$ ; 1 hora:  $129 \pm 4$ ; 24 horas:  $51 \pm 5$ ).

Gráfico 4 – Efeito de WIN 55,212-2 sobre a viabilidade de células de retina em cultura durante intervalos de tempo crescentes: Culturas de embriões de galinha com sete dias de desenvolvimento foram mantidas por um e sete dias em cultivo sendo posteriormente expostas a dose de 1,0 $\mu$ M de WIN 55,212-2 em diferentes tempos (10 minutos, 1 hora e 24 horas) e foram submetidos ao ensaio colorimétrico de viabilidade celular e tiveram sua absorbância aferida pelo espectrofotômetro com comprimentos de onda entre 550nm e 650 nm. As amostras de 1 hora e 24 horas apresentaram diferença significativa em relação ao controle (\*\*\*) entretanto só é observada uma redução da viabilidade celular em 24 horas. N= 3.



Foi questionado ainda se o efeito observado em idades mais jovens se repetiriam em idades mais tardias. Para responder isso, realizamos o tratamento das células com WIN em duas idades diferentes, E7C1 e E7C7. Após 24 horas as culturas foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular por MTT. Como observado no gráfico, em idades mais avançadas do desenvolvimento (E7C7) WIN não foi capaz de causar morte celular, sugerindo que a ativação de receptores canabinoides e o evento de morte celular seja dependente do estágio de desenvolvimento em cultura (E7C2 % controle  $\pm$  erro padrão: controle: 100  $\pm$  9; WIN 0,5  $\mu$ M: 87  $\pm$  4; WIN 1  $\mu$ M: 52  $\pm$  4; WIN 5  $\mu$ M: 41  $\pm$  2; E7C8 % controle  $\pm$  erro padrão: controle: 100  $\pm$  13; WIN 0,5  $\mu$ M: 121  $\pm$  11; WIN 1  $\mu$ M: 150  $\pm$  8; WIN 5  $\mu$ M: 137  $\pm$  5)

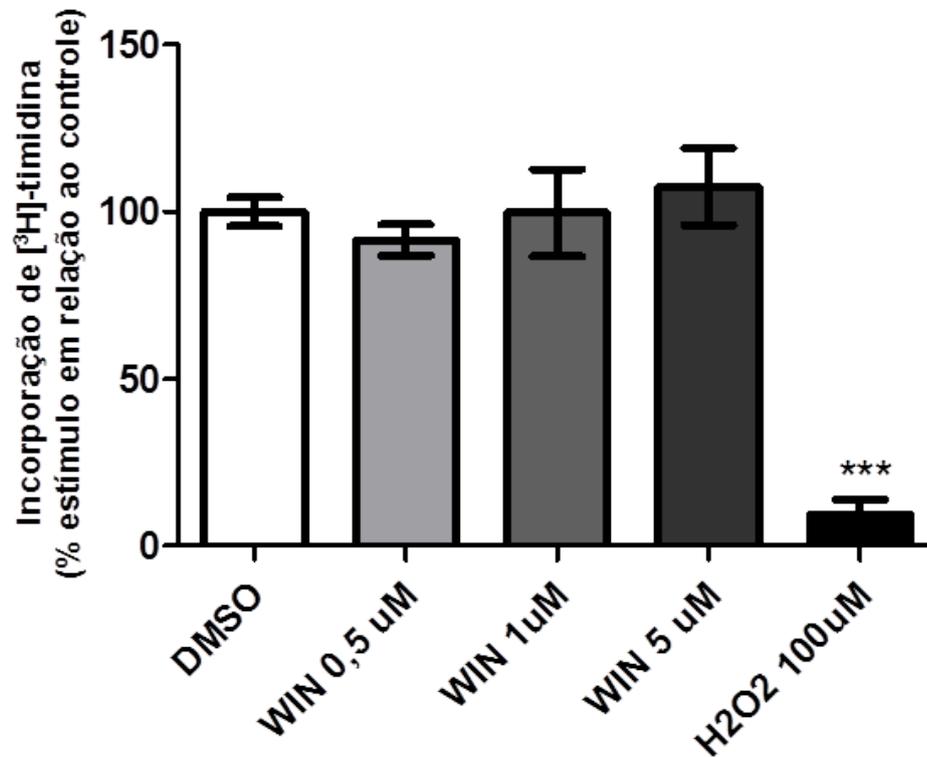
Gráfico 5 – WIN 55,212-2 diminui a viabilidade de células da retina de forma dependente da idade da cultura: Culturas de E7C7 sendo posteriormente tratadas com doses crescentes de WIN 55,212-2 e foram submetidos ao ensaio colorimétrico de viabilidade celular. Somente em E7C2 foram observadas alterações na viabilidade celular. \*\* $p < 0,005$  WIN 0,5  $\mu\text{M}$  em relação ao controle, \*\*\*  $p < 0,0001$  WIN 1,0  $\mu\text{M}$  em relação ao controle. N=4.



#### 4.3 WIN-55,212-2 não causa a morte de células proliferantes da retina em cultura:

Uma vez que nossas culturas apresentam tanto células que já saíram do ciclo celular (células ganglionares, amácrinas e horizontais) quanto células que ainda permanecem proliferantes (fotorreceptores, células bipolares e glia de Müller), resolvemos investigar se as células que sofrem morte celular induzida por WIN seriam as mesmas células que incorporam [ $^3\text{H}$ ]-timidina, portanto, as mesmas células que ainda estariam realizando o ciclo celular. Para isso, culturas de E7C1 foram pré-tratadas com [ $^3\text{H}$ ]-Timidina por 1 hora. Após a incorporação do nucleosídeo radioativo no DNA das células, as culturas foram lavadas e tratadas com doses crescentes de WIN 55,212-2  $\mu\text{M}$  (0,5; 1,0; 5,0) por 24h. Além disso, um controle positivo de morte celular foi realizado com  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$ . Uma redução significativa de células pré-marcadas com [ $^3\text{H}$ ]-Timidina por 1 hora foi observado apenas nas culturas tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 $\mu\text{M}$  (% controle  $\pm$  erro padrão: controle:  $100 \pm 15$ ; WIN 0,5  $\mu\text{M}$ :  $92 \pm 16$ ; WIN 1  $\mu\text{M}$ :  $99 \pm 45$ ; WIN 5  $\mu\text{M}$ :  $107 \pm 40$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 $\mu\text{M}$ :  $9 \pm 8$ ;  $p < 0,0001$  n=6)

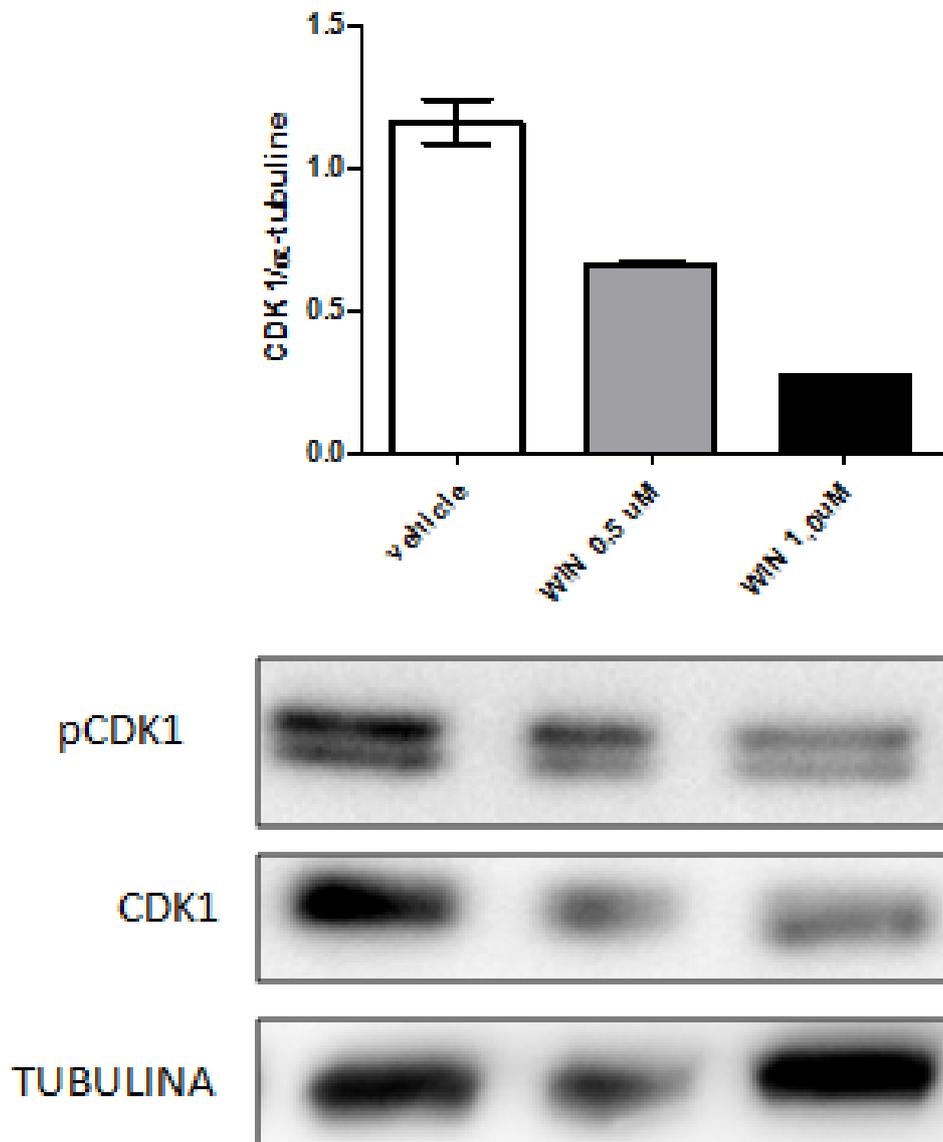
Gráfico 6 – Efeito do agonista WIN 55, 212-2 não afeta células progenitoras. Células em cultura de idade E7C1 fora pré tratadas com [<sup>3</sup>H]-Timidina por 2 horas. Em seguida foram lavadas e tratadas com o agonista canabinoide WIN 55, 212-2 por 24 horas. O resultado não mostra redução das células proliferantes da retina. Somente o controle positivo foi estatisticamente significante em relação ao controle.  $p < 0,05$  N=3



#### 4.4 WIN modula proteínas do ciclo celular

Para aprofundar os estudos sobre os efeitos de WIN-55,212-2 na proliferação de progenitores da retina, investigamos a proteína CDK1 utilizando a técnica de Western Blotting. A CDK1, é uma proteína altamente conservada que funciona como uma serina/treonina cinase desempenhando papel fundamental na regulação do ciclo celular. Ao formar um complexo com a ciclina, fosforila uma variedade de substratos alvo levando à progressão do ciclo celular. Para isso culturas em E7C1 foram tratadas por 24 horas com doses crescentes de WIN µM (0,5 e 1,0) e foram submetidas a técnica de Western Blotting. Foi observado que WIN reduziu a expressão tanto da CDK1, quanto a sua forma fosforilada, entretanto mais experimentos são necessários a fim de estabelecer parâmetros estatísticos (n=1).

**Figura 11 – WIN diminui a expressão e a ativação da CDK1. Western Blotting para a identificação da CDK1 total e fosforilada em culturas de células de retina tratadas com WIN 0,5 e 1,0  $\mu$ M. ) N=1**



#### 4.5 Discussão:

O sistema endocanabinoide foi inicialmente descrito em 1963 por Raphael Mechoulam et al. e desde então a sua manipulação farmacológica vem sendo alvo de estudos por diversos grupos. Sendo assim, drogas como agonistas sintéticos, antagonistas dos receptores canabinoides e vanilóide, inibidores de enzimas de síntese e degradação vem sendo testadas em busca de potenciais alvos terapêuticos (SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010).

Schwitzer et al. (2016) demonstram a presença do sistema canabinoide na retina, assim

como em todo o sistema nervoso central. O estudo segue esclarecendo o papel do sistema canabinoide na neurotransmissão da retina, na plasticidade neural e na neuroproteção. Entretanto a maior parte dos estudos são realizados em idades pós-natais, sendo ainda uma incógnita os efeitos decorrentes da ativação do sistema canabinoide em estágios embrionários.

Leonelli et al. (2005) verificam a presença de receptores canabinoides, CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, na retina de embrião de galinha, sugerindo que o receptor canabinoide teria um papel de molécula sinalizadora durante a diferenciação. É possível concluir a partir deste estudo que o sistema canabinoide está envolvido na migração e alongamento de processos neurais suportando a ideia de modulação neural pelo sistema canabinoide durante o desenvolvimento .

Neste trabalho, detectamos que WIN causou uma diminuição da marcação para PCNA, além de uma diminuição da incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina. O PCNA é um antígeno nuclear de proliferação, é uma proteína de 36 KDa, que é sintetizada durante a interfase e que desaparece após a saída das células do ciclo celular, sendo então utilizada como um marcador de atividade proliferativa (NETO et al., 2001). A incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina é uma ferramenta clássica para detecção de células na fase S do ciclo celular. Sendo assim, podemos sugerir que WIN causa uma diminuição da proliferação celular, e possivelmente uma indução de diferenciação. Entretanto mais experimentos serão necessários para identificar o fenótipo celular que possivelmente entra em diferenciação na presença de WIN. A hipótese de diferenciação celular induzida por canabinoides no sistema nervoso central é descrita por diversos autores (PRENDERVILLE; KELLY; DOWNER., 2015).

Ellert-Miklaszewska, Kaminska e Konarska (2004) correlacionaram a ativação dos receptores canabinoides pelo agonista canabinoide sintético WIN 55, 212-2 com a morte celular de células de glioma. Demonstram ainda que o WIN exerce um efeito antiproliferativo em células diferenciadas dos mais diversos tecidos. Tudo isso devido a regulação decrescente de duas vias de sinalização essenciais para sobrevivência e proliferação celular, uma vez que o WIN é capaz de inibir as vias da ERK e PI3K. Ao sair do ciclo celular a célula pode estar se diferenciando, sofrendo arresto ou morrendo. Como já citado em estudos o estímulo por agonistas canabinoides podem possuir efeito antiproliferativo e desencadear a ativação de vias pró-apoptóticas. No presente trabalho, ao tratarmos as culturas por 24h com doses crescentes de WIN, uma redução significativa das células viáveis foi observada. Entretanto, de forma intrigante, quando estimulamos nossas culturas por tempos mais curtos foi observado um aumento na viabilidade celular, sugerindo que a ativação de receptores canabinoides quando realizada de forma crônica e em altas doses pode levar as células da retina a morte.

Durante o desenvolvimento da retina de galinha duas ondas de morte celular natural foram detectadas. A primeira onda ocorre entre os dias 3 e 5 de desenvolvimento embrionário, afetando o neuroepitélio. Já a segunda onda de morte ocorre entre os dias 7 e 18 (VALENCIANO et al., 2009). Aqui, a exposição ao agonista canabinoide em doses crescentes durante 24 horas às células apresentam uma redução da viabilidade somente em idades mais precoces (E7C2, idade

embrionária relativa ~E9), enquanto que em culturas com idades mais avançadas (E7C8, idade embrionária relativa ~E14) WIN aumenta a viabilidade celular. Sendo assim, podemos sugerir que a ativação de receptores canabinoides causa morte celular de forma dependente do estágio do desenvolvimento contido na segunda onda de morte natural da retina de galinha.

Na idade de 7 dias as únicas células que ainda não se diferenciaram são as células da glia de Müller e os neurônios bipolares e alguns fotorreceptores, todas as outras células já deixaram de proliferar e se diferenciaram (PORTUGAL, 2006). Na intenção de investigar quais células estavam morrendo nós aplicamos um protocolo no qual as células em proliferação eram pré marcadas com timidina tritiada por 1 hora. Após retirar o excesso do material radioativo com lavagens, tratamos as células com WIN. Dessa forma pudemos observar que não há uma redução da quantidade de células marcadas com [<sup>3</sup>H]-timidina, sendo assim podemos sugerir que as células progenitoras provavelmente não seriam as células que estariam morrendo. Entretanto outros experimentos utilizando marcadores de morte celular associados a marcadores de progenitores, neurônios e células glias devem ser realizados para determinação do fenótipo celular envolvido com efeito de morte induzido por canabinoides.

A CDK1 é uma proteína essencial para o controle do ciclo celular, promovendo a transição da fase G2 para a fase M, e regulando tanto a fase G1 quanto sua transição para a fase S. O complexo ciclina-B-CDK1 controla interfase em modelos de ovos fertilizados (MORI et al., 2015). A fim de confirmar a saída das células do ciclo celular, e como a timidina tritiada é indicador apenas da fase S, buscamos uma proteína presente durante todo o ciclo celular e analisamos sua expressão tanto em sua forma fosforilada (ativa) como em sua forma não fosforilada (inativa). Vimos então a redução da expressão de ambas as formas indicando uma atividade antiproliferativa do WIN, entretanto os dados ainda são inconclusivos e precisam ser repetidos.

## 5 Conclusão

Frente aos resultados podemos concluir que:

- WIN inibe a proliferação em culturas de células de retina embrionária de galinha.
- WIN causa a morte de células negativas para [<sup>3</sup>H]-timidina, sugerindo que o fenótipo celular envovido com a morte seja neurônios recém diferenciados.
- O efeito de WIN sobre a viabilidade de culturas de células da retina embrionária depende da dose, do tempo de incubação com o ligante e com tempo de cultivo celular.

## Referências

- BASAVARAJAPPA, B.S. **Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism.** Protein ad peptide letters, [S.l.], v. 14, n. 3, p. 237-246, ago. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17346227>>. Acesso em: 08 dez. 2018.
- BATTISTA, N. et al. **The anandamide membrane transporter and the therapeutic implications of its inhibition.** Therapy, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 141-150, jan. 2005. Disponível em: <<https://www.openaccessjournals.com/articles/the-anandamide-membrane-transporter-and-the-therapeutic-implications-of-its-inhibition.pdf>>. Acesso em: 07 dez. 2018.
- BISOGNO, T. et al. **Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain.** The Journal of cell Biology, [S.l.], p. 463-468, nov. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14610053>>. Acesso em: 08 out. 2018.
- BLANKMAN, J.L; CRAVATT, B.F. **Chemical probes of endocannabinoid metabolism.** Pharmacological Reviews, [S.l.], v. 65, n. 2, p. 849-871, mar. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23512546>>. Acesso em: 22 out. 2018.
- BOUCHARD, J.F et al. **Expression and Function of the Endocannabinoid System in the Retina and the Visual Brain.** Neural Plasticity, [S.l.], p. 1-4, dez. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26839718>>. Acesso em: 06 dez. 2018.
- BRITTIS, P.A et al. **Fibroblast growth factor receptor function is required for the orderly projection of ganglion cell axons in the developing mammalian retina.** Molecular and Cellular Neuroscience, [S.l.], v. 8, p. 120-128, jan. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8918829>>. Acesso em: 14 out. 2018.
- CHAVES, G. P. **Sistema Canabinoide e seu Possível Papel em processos de Neuroproteção e Plasticidade:** Estudos in vivo e invitro. 2008. 30 p. Dissertação (Mestre em Ciências)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em: <[http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42137/tde-03102008-113207/publico/GabrielaPenaChaves\\_Mestrado.pdf](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42137/tde-03102008-113207/publico/GabrielaPenaChaves_Mestrado.pdf)>. Acesso em: 15 ago. 2018.
- DOW-EDWARDS, D.; SILVA, L. **Endocannabinoids in brain plasticity: Cortical maturation, HPA axis function and behavior.** Brain Research, [S.l.], v. 1654, p. 157-164, jan. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27569586>>. Acesso em: 11 set. 2018.

ELLERT-MIKLASZEWSKA, A.; KAMINSKA, B.; KONARSKA, L. **Cannabinoids down-regulate PI3K/Akt and Erk signalling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein.** Cellular Signalling, [S.l.], v. 17, n. 1, p. 25-37, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15451022>>. Acesso em: 18 out. 2018.

GUIMARÃES, M.R. **Curso de Embriologia Celular.** 2003. Disponível em: <[http://ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Morfologia/MaterialDidatico/Embriologia\\_Ocular.pdf](http://ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Morfologia/MaterialDidatico/Embriologia_Ocular.pdf)>. Acesso em: 24 out. 2018.

HOWLETT, A.C et al. **International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors.** Pharmacological Reviews, [S.l.], v. 54, n. 2, p. 161-202, jun. 2002. Disponível em: <<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/54/2/161.full#ref-319>>. Acesso em: 13 out. 2018.

HU, S.S; MACKIE, K. **Distribution of the Endocannabinoid System in the Central Nervous System.** Handbook of experimental pharmacology, [S.l.], v. 231, p. 59-93, jan. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26408158>>. Acesso em: 22 out. 2018.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica – texto e atlas.** 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 556p. ISBN-10:85-277-2311-5

SCHOENWOLF, G. C.; BLEYL, S. B.; BRAUER, P. R.; FRANCIS-WEST, P. H. **Larsen Embriologia Humana.** 5 a edição, Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 2016. 704p.

LEONELLI, M. et al. **Developmental expression of cannabinoid receptors in the chick retinotectal system.** Brain Research, [S.l.], v. 156, n. 2, p. 176-182, maio. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16099304>>. Acesso em: 11 out. 2018

**Management of substance abuse:**Cannabis. Organização mundial da saúde, 2016. Disponível em: <[http://www.who.int/substance\\_abuse/facts/cannabis/en/](http://www.who.int/substance_abuse/facts/cannabis/en/)>. Acesso em:13 ago. 2018

MARTINEZ-MORALES, J.R et al. **Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center.** Developmental Cell, [S.l.], v. 8, n. 4, p. 565-574, abr. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809038>>. Acesso em: 05 dez. 2018.

MEY, J.; THANOS, S. **Development of the visual system of the chick: I. Cell differentiation and histogenesis.** Brain Research Reviews, [S.l.], v. 32, p. 343-379, abr. 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165017399000223>>. Acesso em: 26 set. 2018.

MELDRUM, BS. **Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology.** The Journal of Nutrition, [S.l.], v. 130, n. 4, p. 1007-1015, abr. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10736372>>. Acesso em: 15 nov. 2018.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica.** 10ª edição. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 2016. 365p.

MORI, Y. et al. **Phosphorylation of the centrosomal protein, Cep169, by Cdk1 promotes its dissociation from centrosomes in mitosis.** Biochemical and Biophysical Research Communications, [S.l.], v. 468, n. 4, p. 642-646, jan. 2015. Disponível em: <<https://www.uniprot.org/citations/26549230>>. Acesso em: 18 nov. 2018

NETO, J.A.D et al. **ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA) EM CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS DE BEXIGA.** Acta Cirurgica Brasileira, [S.l.], v. 16, p. 63-67, jan. 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502001000500019](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502001000500019)>. Acesso em: 08 nov. 2018.

O Olho. In: BEAR, M.F; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. cap. 9, p. 277-308.

OLIVEIRA, K. L.; LIMA, T. P. **Cannabis sativa: Potencial Terapêutico.** 2016. 30 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina)- Faculdade São Lucas, Porto Velho, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.saolucas.edu.br:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1710/Kauanna%20Lamartine%20Brasil%20Oliveira%20-%20Cannabis%20sativa%20-%20Potencial%20terap%20C3%AAutico.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 09 out. 2018.

PALMER, S.L; THAKUR, G.A.; MAKRIANNIS, A. **Cannabinergic Ligands.** Chemistry and Physics of Lipids, [S.l.], v. 121, p. 3-19, dez. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12505686>>. Acesso em: 02 ago. 2018.

PERTWEE, R. **Neuropharmacology and therapeutic potential of cannabinoids.** Addiction Biology, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 37-46, jan. 2000. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1080/13556210071252>>. Acesso em: 14 out. 2018.

PERTWEE, R.G; ROSS, R.A. **Cannabinoid receptors and their ligands.** Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, [S.l.], v. 66, n. 2-3, p. 101-121, mar. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052030>>. Acesso em: 16 set. 2018.

PETROCELLIS, L.; CASCIO, M. G.; DI MARZO, V. **The endocannabinoid system: a general view and latest additions.** British Journal of Pharmacology, [S.l.], v. 141, n. 5, p.

765-774, jan. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1574255/>>. Acesso em: 07 nov. 2018.

PIOMELLI, D. et al. **The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs.** Trends in pharmacological science, [S.l.], v. 21, n. 6, p. 218-224, jun. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10838609/>>. Acesso em: 15 out. 2018.

PITTACK, C.; GRUNWALD, G.B.; REH, T.A. **Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos.** Development, Londres, Inglaterra, v. 124, n. 4, p. 805-816, fev. 1997. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9043062](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9043062/)>. Acesso em: 04 dez. 2018.

PORTUGAL, L.C.L. **EXPRESSÃO DE P27/KIP1 NO DESENVOLVIMENTO DE RETINAS DE GALINHA.** 2006. 67 p. Dissertação (Mestre em Neuroimunologia)- Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006. Disponível em: <<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp042890.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2018.

PRADA, C. et al. **Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina.** The European Journal of Neuroscience, [S.l.], v. 3, n. 6, p. 559-569, jun. 1991. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106488](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106488/)>. Acesso em: 01 dez. 2018.

PRENDERVILLE, J.A.; KELLY, A.M.; DOWNER, E.J. **The role of cannabinoids in adult neurogenesis.** British Journal of Pharmacology, [S.l.], v. 172, n. 16, p. 3950-3963, jun. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4543605/>>. Acesso em: 02 out. 2018.

RAVI, J. et al. **FAAH inhibition enhances anandamide mediated anti-tumorigenic effects in non-small cell lung cancer by downregulating the EGF/EGFR pathway.** Oncotarget, [S.l.], v. 5, n. 9, p. 2475-2486, maio. 2014. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24811863](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24811863/)>. Acesso em: 15 out. 2018.

SAITO, V.M; WOTJAK, C.T; MOREIRA, F.A. **Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão?.** Revista Brasileira de Psiquiatria, [S.l.], v. 32, p. 7-14, maio. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbp/v32s1/a04v32s1.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2018.

SCHWITZER, T. et al. **The Endocannabinoid System in the Retina: From Physiology to Practical and Therapeutic Applications.** Neural Plasticity, [S.l.], v. 53, p. 1-10, jan. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4736597/>>. Acesso em: 15 nov. 2018.

SLATTER, D. H. **Fundamento de Oftalmologia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 686.

STRAUSS, O. **The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function**. *Physiological Reviews*, [S.l.], v. 85, n. 3, p. 845-881, jul. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987797>>. Acesso em: 06 nov. 2018.

TURCOTTE, C. et al. **Regulation of inflammation by cannabinoids, the endocannabinoids 2-arachidonoyl-glycerol and arachidonoyl-ethanolamide, and their metabolites**. *Journal of leukocyte biology*, [S.l.], v. 97, n. 6, p. 1049-1070, jun. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25877930>>. Acesso em: 14 out. 2018.

UEDA, N. et al. **Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol**. *Biofactors*, Oxford, v. 37, n. 1, p. 1-7, fev. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21328621>>. Acesso em: 14 out. 2018.

VALENCIANO, AI; BOYA, P.; DE LA ROSA, EJ. **Early neural cell death: numbers and cues from the developing neuroretina**. *The International Journal Of Developmental Biology*, [S.l.], v. 53, p. 1515-1528, jan. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19247933>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

VERGARA, M. Natalia; CANTO-SOLER, M. Valeria. **Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development**. *Neural Development*, Brasil, v. 7, n. 22, p. 1-19, jun. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22738172>>. Acesso em: 08 set. 2018.

WARRIER, A.; WILSON, M. **Endocannabinoid signaling regulates spontaneous transmitter release from embryonic retinal amacrine cells**. *Visual Neuroscience*, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 25-35, fev. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17430607>>. Acesso em: 07 dez. 2018.

Anexos

Figura 12 – Comprovante de aprovação do comitê de ética

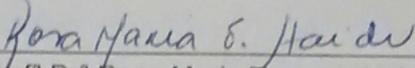
  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO  
CEUA - UNIRIO

CEUA-UNIRIO N° 2016.02

Rio de Janeiro, 28/04/2016

Recebemos nesta data, para avaliação, para fins de cadastramento junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais, o projeto intitulado **“Estudo do sistema canabinoide e purinérgico durante o desenvolvimento da retina de aves”** sob coordenação do Prof. Guilherme Rapozeiro França

Atenciosamente,

  
Profª Drª Rosa Maria Tavares Haido  
Coordenadora da CEUA-UNIRIO

*Dra. Rosa Maria Tavares Haido - PhD*  
Profª. Associada - MS 0397709

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-UNIRIO  
Rua Frei Caneca, 94 , Bloco D, Sala D-407 – Centro – RJ – CEP 20211-040 – Tel. (21) 25317906  
e-mail: [ceua-unirio@outlook.com](mailto:ceua-unirio@outlook.com)

