

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

GEYZZARA OLIVEIRA FERREIRA DINIZ

CANABINOIDES MODULAM A MORTE E A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM
CULTURAS DE CÉLULAS DA RETINA EMBRIONÁRIA DE AVES ATRAVÉS DE
RECEPTORES DE NUCLEOTÍDEOS P2X₇ E P2Y₁₂

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

GEZZARA OLIVEIRA FERREIRA DINIZ

CANABINOIDES MODULAM A MORTE E A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM
CULTURAS DE CÉLULAS DA RETINA EMBRIONÁRIA DE AVES ATRAVÉS DE
RECEPTORES DE NUCLEOTÍDEOS P2X₇ E P2Y₁₂

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

Orientador: Guilherme Rapozeiro França

Coorientadora: Ana Lúcia Marques Ventura

RIO DE JANEIRO

2018

Catálogo informatizada pelo(a) autor(a)

D585 Diniz, Geyzara Oliveira Ferreira
Canabinoides modulam a morte e a proliferação
celular em culturas de células da retina
embrionária de aves através de receptores de
nucleotídeos P2X7 e P2Y12 / Geyzara Oliveira
Ferreira Diniz. -- Rio de Janeiro, 2018.
51 f.

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

1. Sistema canabinoide. 2. Sistema purinérgico.
3. Retina. 4. Morte. 5. Proliferação. I. França,
Guilherme Rapozeiro, orient. II. Ventura, Ana Lúcia
Marques, coorient. III. Título.

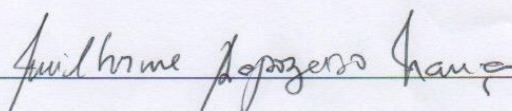
GEZZARA OLIVEIRA FERREIRA DINIZ

CANABINOIDES MODULAM A MORTE E A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM
CULTURAS DE CÉLULAS DA RETINA EMBRIONÁRIA DE AVES ATRAVÉS DE
RECEPTORES DE NUCLEOTÍDEOS P2X7 E P2Y12

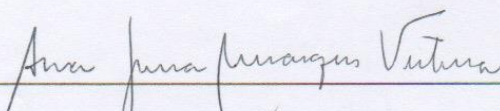
Trabalho de Conclusão de Curso de
graduação, apresentado ao Instituto
Biomédico da Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Bacharel
em Biomedicina.

Aprovado em: ...18... de ...dezembro... de 2018.

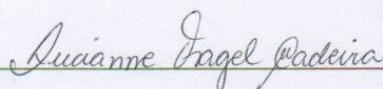
Banca Examinadora



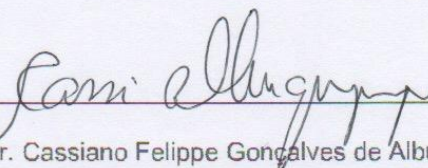
Prof. Dr. Guilherme Raposo França (orientador) - UNIRIO



Prof.ª. Dra. Ana Lúcia Marques Ventura (co-orientadora) - UFF



Prof.ª. Dra. Lucianne Fragel-Madeira - UFF



Prof. Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque - UNIRIO

Aos meus pais e eternos incentivadores, Sonia, Geremias, Fânia e Agamenon.

Aos meus irmãos e encorajadores, Geysanni, Geylson e Annelize.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por me abençoar e permitir chegar até aqui, degrau onde jamais imaginei que teria capacidade de alcançar.

À minha família, Geremias, Sonia, Geysanni, Geylson, Fânia, Agamenon e Annelize, que são minha luz, inspiração e meu porto seguro. Obrigada por todo amor, carinho, paciência, conselho, incentivo, ânimo e condições para caminhar. Essa conquista é para vocês.

Aos meus amigos e companheiros de caminhada, Gisele, Raquel, Jéssica, Rodrigo, Juliana e Yara, que compartilharam comigo alegrias, risadas, cansaço, desânimo, preocupações, desabafos e lágrimas. Que me levantaram a cada momento difícil, me acomodaram em sua casa e em seu coração. Vocês foram parte fundamental nessa trajetória.

Às minhas amigas, Maise, Caroliny e Janaina, por compartilharem sonhos, me alegrar, consolar e torcer por mim a todo instante.

Ao meu orientador, Prof. Guilherme Rapozeiro França, que me aceitou sem qualquer experiência de laboratório. Que com paciência me ensinou e me guiou no caminho da ciência.

À Prof^a. Ana Lúcia Marques Ventura, que me recebeu em seu laboratório e ainda por seus esclarecimentos, reflexões e discussões sobre meu projeto.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Neuroquímica da UFF, que me acolheu, me ensinou e me ajudou.

Por fim, a todos os familiares e amigos que me ajudaram direta ou indiretamente e que torceram por mim. Muito obrigada a todos!

*"Espírito leve-me até onde minha confiança não tem limites [...]
Leva-me mais fundo do que os meus pés um dia pudessem desejar
E minha fé será fortalecida."*

(Hillsong United)

RESUMO

Neste trabalho investigamos as ações de canabinoides e sua relação com o sistema purinérgico sobre a proliferação e a viabilidade celular utilizando como modelo culturas de células de retina embrionária de galinha. Culturas em E7C1 foram tratadas com WIN 55,212-2, um agonista de receptores CB1 e CB2, URB 602, um inibidor da enzima MAGL, e com ATP e ADP. WIN e URB 602 inibiram a proliferação tanto das culturas controle quanto das culturas tratadas com ATP e ADP. A redução da proliferação sugere um arresto do ciclo celular, diferenciação e/ou morte celular. Na retina de galinha já foi descrito que os receptores P2X₇ participam de fenômenos de morte celular. Para investigar o envolvimento dos receptores P2X₇ na morte celular induzida por WIN, culturas em E7C1 foram tratadas com WIN e A438079, um inibidor dos receptores P2X₇, e submetidas ao ensaio de viabilidade celular. WIN diminuiu a viabilidade celular de forma dose-dependente, sendo este efeito completamente bloqueado pelo A 438079. Entretanto, A438079 não reverteu o efeito de WIN sobre a incorporação de [³H]-timidina, sugerindo que a participação de receptores P2X₇ em culturas tratadas com WIN esteja restrita a fenômenos de morte celular. Uma das formas de se estudar a atividade de receptores P2X₇ é através de ensaios de captação de corante fluorescente. Culturas de E7C1 tratadas com WIN durante 24h apresentaram um aumento de ~2x no número de células positivas para o corante fluorescente sulforodamina B (SRB). Além disso, culturas pré-incubadas com WIN durante 24h e estimuladas com ATP 3mM por 10 min., apresentaram um aumento de ~4x no número de células positivas para SRB, sendo este efeito totalmente bloqueado por A438079. Na retina de ratos já foi descrito que o receptor P2Y₁₂ está envolvido com a saída do ciclo celular. Culturas de E7C1 foram tratadas com WIN e PSB0739, um antagonista de receptores P2Y₁₂ e submetidas ao ensaio de incorporação de [³H]-timidina. PSB 0739 inibiu o efeito de WIN sobre a proliferação. Nossos resultados sugerem que canabinoides possuem efeito inibitório sobre a proliferação celular, com efeito irreversível sobre a proliferação induzida por nucleotídeos. Induziram ainda a morte de células progenitoras da retina, a partir do aumento da atividade dos receptores purinérgicos P2X₇ e inibiu a proliferação celular através da ativação do receptor purinérgico P2Y₁₂.

Palavras-chave: Canabinoide; Purinérgico; Retina; P2X₇; P2Y₁₂.

ABSTRACT

In this work we investigate the actions of cannabinoids and their relationship with the purinergic system on cell proliferation and viability using as model embryonic retinal cell cultures. Cultures in E7C1 were treated with WIN 55,212-2, an agonist of CB1 and CB2 receptor, URB 602, a MAGL enzyme inhibitor, and with ATP and ADP. WIN and URB 602 inhibited the proliferation of both control cultures and cultures treated with ATP and ADP. The decrease on proliferation suggests cell cycle arrest, differentiation, and/or cell death. In the chick retina has been described that the P2X₇ receptors are related to cell death phenomena. To investigate the involvement of P2X₇ receptors in WIN induced cell death, cultures in E7C1 were treated with WIN and A438079, a P2X₇ receptor inhibitor, and subjected to the cell viability assay. WIN decreased cell viability in a dose-dependent manner, an effect that was completely blocked by A438079. However, A438079 did not reverse the effect of WIN on [³H]-thymidine incorporation, suggesting that the participation of P2X₇ receptors in WIN-treated cultures is restricted to phenomena of cell death. One of the ways to study the activity of P2X₇ receptors is through fluorescent dye uptake assays. E7C1 cultures treated with WIN for 24h showed a ~2x increase in the number of cells positive for fluorescent dye sulforhodamine B (SRB). In addition, cultures pre-incubated with WIN for 24h and stimulated with 3mM ATP for 10 min showed a ~4x increase in the number of SRB-positive cells, this effect being totally blocked by A438079. In rat retina it has been described that the P2Y₁₂ receptor is involved with the cell cycle output. Cultures of E7C1 were treated with WIN and PSB 0739, a P2Y₁₂ receptor antagonist and subjected to the [³H]-thymidine incorporation assay. PSB 0739 inhibited the effect of WIN on proliferation. Our results suggest that cannabinoids have an inhibitory effect on cell proliferation, with a reversible effect on nucleotide-induced proliferation. They also induced the death of retinal progenitor cells from increased purinergic P2X₇ receptor activity and inhibited cell proliferation through the activation of purinergic P2Y₁₂ receptor.

Keywords: Cannabinoids, Purinergic; Retina; P2X₇; P2Y₁₂.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Retinogênese	16
Figura 2 - Morte celular e gênese de células da retina de embrião de galinha	17
Figura 3 - Estrutura dos principais endocanabinoides	18
Figura 4 - Síntese, sinalização e degradação dos endocanabinoides	21
Figura 5 - Receptores purinérgicos e as respectivas vias de sinalização	24
Figura 6 - Estrutura e ativação do receptor P2X ₇	26
Figura 7 - WIN aumenta a captação de corante fluorescente através de receptores P2X ₇	38

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Agonista canabinoide WIN 55, 212-2 diminui a proliferação celular	32
GRÁFICO 2 - URB 602 inibe a proliferação celular induzida por ADP	33
GRÁFICO 3 - Pré-incubação com canabinoide sintético inibe a proliferação celular induzida por ATP	34
GRÁFICO 4 - Agonista canabinoide induz a morte de células da retina	35
GRÁFICO 5 - Canabinoide induz a morte celular em culturas de células de retina de forma dependente do estágio de desenvolvimento embrionário	36
GRÁFICO 6 - Antagonista P2X ₇ bloqueia a morte celular induzida pelo WIN 55, 212-2	37
GRÁFICO 7 - Antagonista do receptor purinérgico P2X ₇ bloqueia a captação de corante sulfurodamina B	38
GRÁFICO 8 - Receptor P2X ₇ não tem participação no efeito do WIN 55, 212-2 sobre a proliferação celular	39
GRÁFICO 9 – WIN 55,212-2 diminui a proliferação celular dependente do receptor purinérgico P2Y ₁₂	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Desenvolvimento da retina	14
1.1.1. Proliferação celular na retina	15
1.1.2. Morte celular durante o desenvolvimento da retina.....	17
1.2. Sistema Endocanabinoide.....	18
1.2.1. Síntese dos endocanabinoides.....	18
1.2.2. Receptores canabinoides.....	19
1.2.3. Degradação dos endocanabinoides.....	21
1.2.4. Canabinoides na retina.....	22
1.3. Sistema Purinérgico.....	23
1.3.1. Receptores purinérgicos.....	23
1.3.2. ATP na retina.....	24
1.3.3. Receptor P2X ₇	25
1.3.4. Receptor P2Y ₁₂	27
1.4. Modulação entre o Sistema Purinérgico e o Sistema Canabinoide.....	27
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo Geral	29
2.2. Objetivos Específicos	29
3. METODOLOGIA	30
3.1. Cultura de células de retina	30
3.2. Incorporação de [³ H]-timidina	30
3.3. Viabilidade celular por MTT	31
3.4. Captação de corante fluorescente sulfurodamina B	31
3.5. Análise estatística	31
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS.....	51

INTRODUÇÃO

Cannabis sativa é utilizada há muitos séculos por suas propriedades medicinais e psicoativas. Os primeiros relatos sobre o uso da planta teriam ocorrido na Ásia, onde era utilizada para fins comerciais, terapêuticos e religiosos (OLIVEIRA; LIMA, 2016). Sua entrada no Brasil ocorreu através dos escravos africanos no período colonial, sendo utilizada com finalidade recreativa (CARLINI, 2006).

Pertencente à família Cannabaceae, a *Cannabis*, também é conhecida como "cânhamo da Índia" ou mais vulgarmente como maconha. Ela é constituída por mais de 400 compostos químicos, dentre os quais somente 60 são considerados canabinoides, responsáveis por seus efeitos psicoativos e potencial terapêutico (GONÇALVES & SCHLICHTING, 2014).

O isolamento e a elucidação da estrutura química dos fitocannabinoides ocorreu somente na década de 60. Dentre eles, destacam-se o Δ^9 -tetrahidrocanabinol (Δ^9 -THC), principal e mais abundante componente psicoativo; canabidiol (CBD), não psicoativo, porém com diversas ações terapêuticas; e o canabinol (CBN), com efeito psicoativo e atividade anti-inflamatória (GAONI; MECHOULAM, 1964; LANARO, 2008). Desde então, o interesse em suas propriedades farmacológicas e terapêuticas aumentou, apontando para a aplicação medicinal em diferentes condições clínicas, tais como: antiemético e indutor de apetite para pacientes em quimioterapia, anticonvulsivante, analgésico e antiespástico na esclerose múltipla, ansiolítico e antidepressivo (HONÓRIO; ARROIO; SILVA, 2006; OLIVEIRA, 2016; RIBEIRO, 2014; BLOOMFIELD et al., 2018).

Canabinoides desempenham, portanto, diversos efeitos sobre o organismo, principalmente, sobre o sistema nervoso central (SNC) (HONÓRIO; ARROIO; SILVA, 2006). Uma vez que a retina é uma extensão do SNC, sendo conectados a partir do nervo óptico (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008), torna-se então um excelente modelo de estudo. A retina apresenta diversas similaridades com o SNC, entre elas a presença de diversos tipos de neurônios, células gliais de Müller, astrócitos, além de macrófagos residentes, como a micróglia (SCHWITZER et al., 2016). Apresenta também neurotransmissores, como o glutamato, GABA, dopamina, noradrenalina, serotonina, acetilcolina, ATP (MARTINS; PEARSON,

2008) e neuromoduladores como os endocanabinoides (KUBRUSLY et al., 2018). A retina do embrião de galinha está entre os modelos animais bastante utilizados em estudos neuroquímicos e de desenvolvimento do SNC (VERGARA; CANTO-SOLER, 2012). Na retina já se sabe que os canabinoides podem modular a neurotransmissão, regular a neuroplasticidade gerar efeito neuroprotetor, prevenindo a morte celular em estados patológicos como o glaucoma, retinopatia diabética e degeneração macular ligada a idade (KOKONA et al., 2016; SCHWITZER, et al., 2016). Entretanto, a literatura torna-se escassa quando se trata do papel dos canabinoides durante o desenvolvimento da retina, sendo este, um ponto de interesse neste trabalho.

1.1. Desenvolvimento da retina:

O Sistema nervoso deriva-se da ectoderme. Modificações nessa região originam a placa neural, que posteriormente dará origem ao sulco neural. As paredes do sulco e pregas neurais fundem-se formando então o tubo neural, do qual todo o SNC se desenvolve. O processo de diferenciação do tubo neural dará origem as vesículas primárias, chamadas de prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. Durante a diferenciação do prosencéfalo ocorre o surgimento das vesículas secundárias, são elas: vesículas ópticas e telencefálicas. As vesículas ópticas crescem e invaginam-se formando o talo óptico e o cálice óptico. Após a invaginação das vesículas ópticas, o cálice óptico torna-se uma estrutura com dupla camada ligada ao diencéfalo através do talo óptico. A camada interna do cálice óptico dará origem a retina, enquanto a camada externa se tornará o epitélio pigmentado (VERGARA; CANTO-SOLER, 2012).

A retina é o tecido sensorial responsável pela conversão de energia luminosa em potenciais eletroquímicos, que serão conduzidos através do nervo óptico até regiões encefálicas superiores para produzir a visão. O tecido retiniano é formado por seis tipos de neurônios: fotorreceptores bastonetes e cones; células bipolares, amácrinas, horizontais e ganglionares, além de glia de Müller, astrócitos e microglia (HEAVNER; PEVNY, 2012).

A formação correta da retina depende de um intrincado processo que combina proliferação, migração, diferenciação e morte celular em intervalos de tempo

preciso e coordenado (MARTINS; PEARSON, 2008). Neste trabalho, estudaremos o papel do sistema canabinoide e purinérgico sobre fenômenos de proliferação e morte de células da retina em fases precoces do desenvolvimento.

1.1.1. Proliferação celular na retina:

Os processos de proliferação, especificação do destino celular, migração, morte e sinaptogênese ocorrem de forma dinâmica e interposta (DONOVAN; DAYER 2005). A proliferação é regulada por fatores extrínsecos e intrínsecos das células progenitoras durante o desenvolvimento da retina (MARTINS; PEARSON, 2008) e a saída do ciclo celular deve ser coordenada com a especificação do destino das células, garantindo a correta formação das camadas e a proporção de cada tipo de célula neural e glial, garantindo a função visual (MEY; THANOS, 2000).

Células progenitoras da retina são multipotentes, ou seja, são capazes de dar origem a todos os tipos de células (neurônios e glia). Eles passam por repetidos ciclos de divisão, gerando um “pool” de células progenitoras, antes de sair do ciclo celular (DONOVAN; DYER, 2005). Elas diferenciam-se de forma sequencial, porém sobreposta, dando origem a citoarquitetura multilaminar da retina. Onde os corpos celulares estão organizados em cinco camadas (VERGARA; CANTO-SOLER, 2012).

Durante o ciclo celular, os núcleos migram verticalmente entre as superfícies basal e apical ao longo do tecido retiniano, esse movimento é denominado movimento nuclear intercinético. A fase S, fase de duplicação do DNA, ocorre na superfície basal. Enquanto a mitose, fase de divisão celular, ocorre na superfície apical, adjacente ao epitélio pigmentar da retina (EPR). Os núcleos migram entre essas duas superfícies durante as fases G1 e G2, fases preparatórias e de checkpoint (Figura 1-A) (MARTINS; PEARSON, 2008). Com o envelhecimento do embrião, a retina passa da fase de proliferação para a de diferenciação.

Na retina de galinha, as primeiras células a se diferenciarem são as células ganglionares, no 2º dia do desenvolvimento embrionário (E2), seguidas pelas amácrinas e horizontais (E3), fotorreceptores (E4). As células de Müller começam a sair do ciclo ao mesmo tempo que os fotorreceptores, em torno de E5. Já as células bipolares são as últimas células a iniciar a saída do ciclo celular (E6)

(PRADA et al., 1991). As células migram para suas camadas específicas, onde formam conexões sinápticas (DONOVAN; DAYER 2005). A camada de células ganglionares (CCG) é formada pelos corpos celulares das células ganglionares e amácrinas deslocadas. A camada nuclear interna (CNI) é formada pelos corpos celulares das células amácrinas, horizontais, bipolares e glia de Müller, e a camada nuclear externa (CNE), são formadas pelos fotorreceptores, sendo que a retina de galinha apresenta principalmente cones. As camadas plexiformes da retina madura resultam do crescimento dos neuritos e da ramificação dendrítica. Conexões entre células ganglionares, amácrinas e bipolares originam a camada plexiforme interna (CPI). As conexões entre as células bipolares, horizontais e fotorreceptores produzem a camada plexiforme externa (CPE). Esta segregação dos diferentes estratos da retina começa com cerca de 6 dias e é alcançada até o 14º dia do desenvolvimento embrionário (Figura 1-B) (MEY; THANOS, 2000).

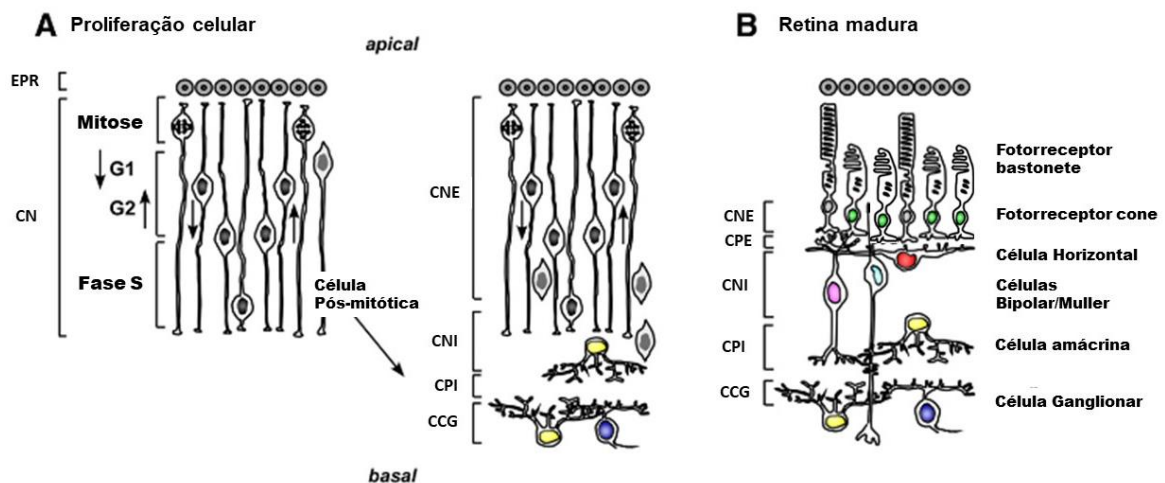


Figura 1 - Retinogênese. A- Abaixo do epitélio pigmentado retiniano (EPR), células progenitoras da retina em divisão celular na camada neuroblástica (CN). As células sofrem divisão celular durante o movimento nuclear intercinético. A fase S ocorre na superfície basal, enquanto a mitose ocorre na superfície apical, adjacente ao EPR. Os núcleos migram entre essas duas superfícies durante as fases G1 e G2. As células formam as camadas conforme as células sofrem diferenciação. Conforme o envelhecimento do embrião, a camada de progenitores vai diminuindo. B- Retina madura. CNE- camada neuroblástica externa; CNI - camada neuroblástica interna; CPI - camada plexiforme interna; CCG - camada de células ganglionares; CNE- camada nuclear externa; CPE - camada plexiforme externa; CNI - camada nuclear interna (Fonte: Adaptado de MARTINS; PEARSON, 2008).

1.1.2. Morte celular durante o desenvolvimento da retina:

Durante o processo de proliferação, células-tronco neurais, progenitores em proliferação, neurônios e glia recentemente nascidos também são afetados pela morte celular (VALENCIANO; BOYA; DE LA ROSA, 2009). Este processo contribui para alcançar a citoarquitetura precisa para o bom funcionamento da retina (MARTINS; PEARSON, 2008).

Na retina de embrião de galinha em desenvolvimento ocorrem dois períodos de morte celular programada (Figura 2). O primeiro período, ocorre juntamente com o início da gênese de neurônios ganglionares, com pico entre E3-E5, enquanto o segunda onda de morte, apresenta um pico de morte entre E10-E12, afetando, principalmente, células ganglionares, bipolares e glia de Müller (VALENCIANO; BOYA; DE LA ROSA, 2009).

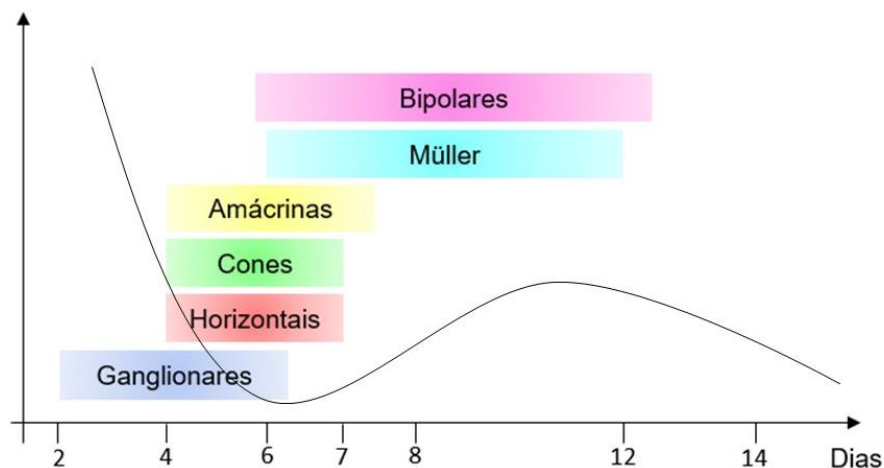


Figura 2 - Morte celular e gênese de células da retina de embrião de galinha. Eixo X: dias de desenvolvimento embrionário. Barras horizontais coloridas refletem a neurogênese, e a linha preta sinuosa representa a morte de neurônios e glia de Müller (Fonte: O autor. Adaptado de PRADA et al, 1991; VALENCIANO; BOYA; DE LA ROSA, 2009).

Segundo Frade et al. (1997), as células envolvidas com a morte, no primeiro período, corresponderiam as células neuroepiteliais em proliferação ou neuroblastos pós-mitóticos. Porém, como o perfil de desenvolvimento da fase inicial da morte celular coincide com o início do nascimento do neurônios ganglionares, então a morte programada estaria associada à diferenciação dos neurônios. Logo após eles terem saído do ciclo celular, após sua última mitose na superfície ventricular do

neuroepitélio, eles então migram para a sua posição definitiva na retina. Esse processo de morte limitaria e controlaria provisoriamente o número inicial de neurônios pós-mitóticos.

Neste trabalho utilizamos embriões de galinha com 7 dias de desenvolvimento embrionário, nesta fase apenas as células bipolares e a glia de Müller estão em proliferação, e a segunda onda de morte celular natural está sendo iniciada. Sendo portanto uma idade estratégica para estudo dos efeitos de morte e proliferação celular.

1.2. Sistema endocanabinoide:

Os receptores canabinoides foram descobertos e clonados no final da década de 80 e início dos anos 90. A descoberta dos receptores sugeria a existência de moléculas endógenas capazes de ativá-los. Posteriormente, Mechoulam e colaboradores, elucidaram a estrutura química dos endocanabinoides (Figura 3), sendo os principais encontrados a anandamida (AEA) e o 2-Araquidonoilglicerol (2-AG) (MECHOULAM, 2002).

O sistema endocanabinoide é constituído por receptores canabinoides, ligantes endógenos, enzimas de síntese e degradação, e transportadores transmembrana para endocanabinoides (PINHO-COSTA et al., 2011).

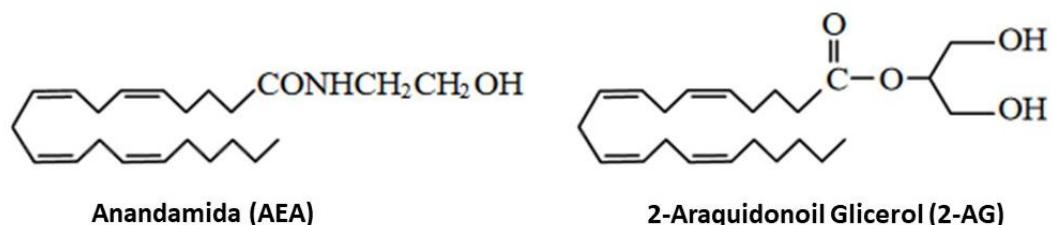


Figura 3 - Estrutura dos principais endocanabinoides. AEA: amida derivada do ácido araquidônico com etanolamina (N-araquidonoil-etanolamina); 2-AG: derivado do ácido araquidônico com diacilglicerol (Fonte: Adaptado de MECHOULAM, 2002).

1.2.1. Síntese dos endocanabinoides:

Produzidos sob demanda, os canabinoides endógenos são sintetizados classicamente no neurônio pós-sináptico, por enzimas que dependem de Ca⁺².

Derivados do ácido araquidônico, a biossíntese de AEA ocorre, principalmente, através da hidrólise do precursor N-araquidonilfosfatidiletanolamina (NAPE) pela ação da NAPE fosfolipase-D (NAPE-PLD). O 2-AG é sintetizado por duas etapas, a fosfolipase C- β realiza a conversão de fosfoinosítídeos de membrana em 1,2-diacilglicerol e sua posterior hidrólise por diacilglicerol lipase. Seguidamente, através dos transportadores de membrana de endocanabinoides atingem a fenda sináptica, onde ativam os receptores canabinoides localizados no neurônio pré-sináptico (SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010; COSTA et al., 2011).

Além da origem lipídica dos endocanabinoides, eles podem ter também uma origem peptídica. A hemopressina (Hp), um peptídeo derivado da degradação proteossomal da α -hemoglobina, foi descrito como uma agonista inverso do receptor canabinoide do tipo 1 (CB1) (HEIMANN et al., 2007), enquanto que as formas de Hp com dois (VD-Hp α) ou três (RVD-Hp α) aminoácidos adicionais na porção terminal-N, funcionam como agonistas do CB1. Quando ativados pelos peptídeos, os receptores CB1 ativam a proteína G_q, aumentando a liberação de cálcio intracelular e ativando a via da ERK1/2 (GOMES et al., 2009). A inserção de moléculas derivadas da degradação proteínas indica uma complexidade ainda maior para o sistema endocanabinoide, onde receptores acoplados a proteína G respondem tanto a ligantes endógenos de origem lipídica quanto peptídica.

1.2.2. Receptores canabinoides:

Os efeitos dos canabinoides sobre o organismo é desencadeado a partir da ativação dos receptores canabinoides do tipo I (CB1) e tipo II (CB2). Eles fazem parte da família dos receptores acoplados a proteína G_{i/o} (GPCRs), com sete domínios transmembrana, comunicando mensagens extracelulares com o meio intracelular (PINHO-COSTA et al., 2011).

Os receptores canabinoides são os GPCR mais abundantes do cérebro, sendo o CB1 o responsável pela maior parte dos efeitos dos canabinoides (MECHOULAM; PARKER, 2013). Eles estão presentes em diversas áreas associadas com controle motor, nos gânglios basais e cerebelo; memória e aprendizagem, no hipocampo; resposta emocional, na amígdala; controle do apetite, no hipotálamo; analgesia, na medula espinhal (HONÓRIO; ARROIO; SILVA, 2006; MIKLASZEWSKA;

CIECHOMSKA; KAMINSKA, 2013). Contudo, nos órgãos e tecidos periféricos, são expressos em baixa densidade. Os receptores CB1 são encontrados principalmente em neurônios pré-sinápticos, onde atuam como sinalizadores retrógrados, inibindo a liberação de neurotransmissores, uma das principais funções do sistema endocanabinóide (MECHOULAM; PARKER, 2013).

Ativação do CB1 inibe a atividade da adenilil ciclase (AC) através da subunidade α da proteína $G_{i/o}$, conseqüentemente ocorre a redução da produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPC). Canais de K^+ , sensíveis ao AMPC, são abertos permitindo um efluxo de carga positiva e tornando a membrana hiperpolarizada, impedindo a propagação do impulso elétrico. Canais de Ca^{2+} voltagem dependentes são fechados, impedindo a exocitose de neurotransmissores, como GABA e glutamato (RANG, et al., 2016).

Por ser identificado primeiramente em células imunes, acreditava-se que os receptores CB2 eram expressos somente no sistema imune (MECHOULAM; PARKER, 2013). Entretanto, atualmente sabe-se que além do sistema imune, onde atuam reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias ou fatores linfangiogênicos, também estão presentes no SNC, principalmente na microglia, porém em menor densidade se comparado ao CB1 (IANNOTTI; DI MARZO; PETROSINO, 2016). Assim como o receptor CB1, os CB2 também são acoplados a proteína $G_{i/o}$.

A ativação dos receptores CB também atuam sobre a expressão gênica, pela ativação da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e pela redução da atividade da proteína quinase A (PKA) (RANG, et al., 2016).

Além dos receptores CB1 e CB2, os endocanabinóides podem se acoplar a outros receptores, como: receptor potencial transitório de vanilóide tipo 1 (TRPV1), canal catiônico não seletivo ativado por anandamida, capsaicina, baixo pH e calor (TÓTH; BLUMBERG; BOCZÁN, 2009); receptor GPR55, receptor "órfão" acoplado a proteína G (RYBERG et al., 2007); e os receptores ativados pelo proliferador de peroxissomo (PPAR), receptores nucleares que se ligam a sequências de DNA, alterando a transcrição de genes (O'SULLIVAN, 2016).

1.2.3. Degradação dos endocanabinoides:

Endocanabinoides (eCB) são rapidamente captados da fenda sináptica e inativados por hidrólise. A principal enzima responsável pela degradação da anandamida é a amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH), que converte a anandamida em ácido araquidônico e etanolamina. O 2-AG sofre degradação pela ação das monoacilglicerol-lipase (MAGL), sendo convertido em ácido araquidônico e glicerol (MIKLASZEWSKA; CIECHOMSKA; KAMINSKA, 2013). Inibidores da FAAH ou MAGL bloqueiam a degradação, gerando um acúmulo de endocanabinoides que então ativam os receptores CB. Outras possíveis rotas do metabolismo dos eCB incluem esterificação, acilação e oxidação pela ciclo-oxigenase-2 (COX-2), originando prostaglandina-etanolamidas (RANG et al., 2016).

Na figura 4 estão representados os processos de síntese e degradação dos endocanabinoides e a respectiva ativação dos receptores canabinoides.

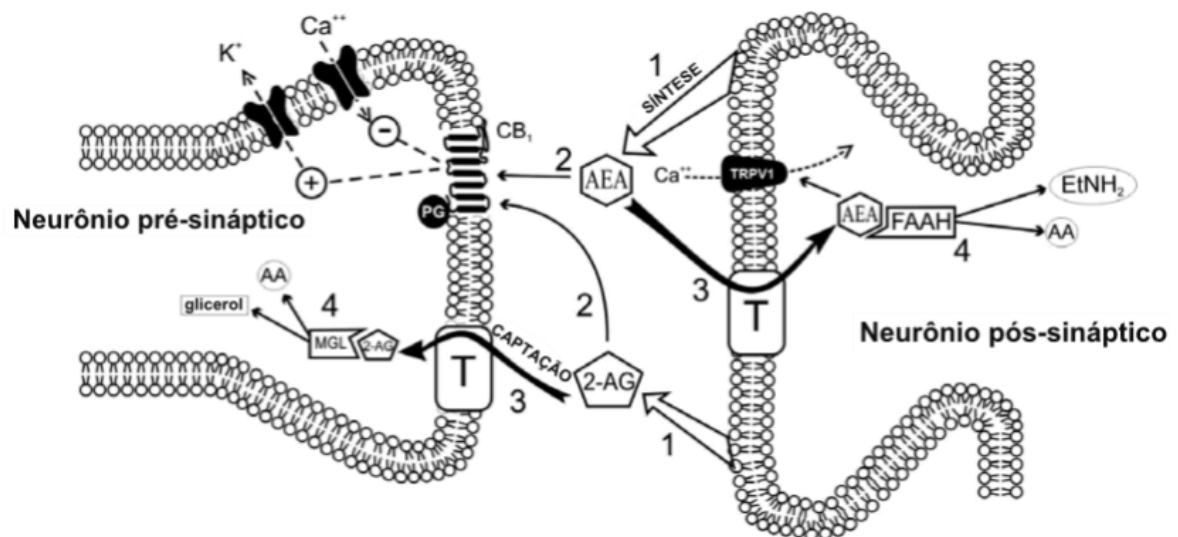


Figura 4 - Síntese, sinalização e degradação dos endocanabinoides. (1) Após influxo de Ca^{2+} , AEA e 2-AG são sintetizados a partir dos fosfolípidos da membrana do neurônio pós-sináptico e posteriormente liberados na fenda sináptica. (2) AEA e 2-AG ativam o receptor CB_1 localizado no neurônio pré-sináptico, ativando a proteína $G_{i/o}$. Canais de K^+ são abertos, causando a hiperpolarização da membrana. Ao mesmo tempo, canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes são fechados, impedindo a exocitose de neurotransmissores. (3) Recaptação de AEA e 2-AG para posterior degradação. (4) Degradação de AEA ocorre pela ação da enzima FAAH, convertendo-a em ácido araquidônico e etanolamina. 2-AG sofre degradação pela ação da enzima MAGL, sendo convertido em ácido araquidônico e glicerol (Fonte: SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010).

1.2.4. Canabinoides na retina:

Na retina os receptores CB1 são encontrados nas duas camadas de contatos sinápticos, a camada plexiforme interna e externa, sendo expressos nos fotorreceptores (cone e bastonetes), células horizontais, amácrinas e ganglionares. Canais iônicos participam do processo de fototransdução, conversão do sinal químico em sinal elétrico, principalmente sobre a despolarização e hiperpolarização das células. Ao modular os canais iônicos inibindo a propagação do impulso nervoso e a liberação de neurotransmissores, o sistema canabinoide mostra-se envolvido na regulação da neurotransmissão retiniana. De modo que a estimulação do sistema canabinoide pode regular a cascata de fototransdução (SCHWITZER, et al, 2016).

Recentemente, Kubrusly et al. (2018) mostraram que em culturas de retina embrionária de galinha com oito dias de desenvolvimento e cultivadas por sete dias (E8C7), os receptores CB1 e CB2 são expressos em neurônios e glias de Müller, e estão acoplados a proteína $G_{i/o}$. O tratamento com agonista canabinoide WIN 55,212-2 causou uma diminuição do acúmulo de AMPc, reduziu a liberação de GABA e bloqueou a mobilização de Ca^{2+} induzida por ATP em células gliais, desempenhando, portanto, um papel importante na sinalização celular na retina em desenvolvimento.

Em doenças que afetam a retina, o sistema canabinoide tem efeito neuroprotetor, prevenindo a morte de neurônios danificados e sua degeneração, devido ao ambiente de estresse celular. Na retinopatia diabética, onde o estresse oxidativo e efeito pró-inflamatório estão associados a morte neuronal, canabinoide reduz o estresse oxidativo e a neurotoxicidade, prevenindo a morte celular. No glaucoma, doença neurodegenerativa caracterizada por isquemia induzida por excitotoxicidade e morte de células ganglionares, causada por uma liberação excessiva de glutamato. Ao inibir a exocitose de glutamato, canabinoide inibe a citotoxicidade induzida pelo neurotransmissor. Além do seu efeito de redução da pressão intra-ocular, sintoma característico da doença (KOKONA et al., 2016; SCHWITZER et al., 2016).

1.3. Sistema Purinérgico:

O sistema de sinalização purinérgico participa de diversos mecanismos fisiológicos importantes de controle, incluindo contração do músculo liso, neurotransmissão, secreção exócrina e endócrina, resposta imune, inflamação, agregação plaquetária, dor e modulação da função cardíaca (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Purinas desempenham papéis importantes no desenvolvimento desde o momento da fertilização (MARTINS; PEARSON, 2008). Elas exercem seus efeitos biológicos através de duas famílias de receptores: receptores de adenosina (P1), receptores de ATP e ADP (P2) (RANG, et al. 2016).

1.3.1. Receptores Purinérgicos

Os receptores P1, ativados por adenosina, são divididos em quatro subtipos: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , todos acoplados a proteína G, modulando a adenilil ciclase e a formação de AMPc (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Os receptores A_1 e A_3 ativam a proteína $G_{i/o}$ e os receptores A_{2A} e A_{2B} ativam a proteína G_s (BAROJA-MAZO, BARBERA-CREMADES e PELEGRIN, 2012). Já os receptores P2 dividem-se em duas classes, receptores ionotrópicos (P2X), ativados por ATP que modulam a permeabilidade rápida e seletiva de cátions Na^+ , K^+ e Ca^{2+} (DUBYAK; EL-MOSTASSIM, 1993), e acoplados a proteína G (P2Y), ativados por ATP, ADP, UTP e UDP. Receptores P2Y são receptores de nucleotídeos acoplados a proteína G, aumentando o inositoltrifosfato (IP3) e cálcio intracelular através da ativação da fosfolipase C ou regulando a produção de AMPc através da adenilil ciclase (BURNSTOCK, 2007). Os receptores P2X são subdivididos em sete receptores, P2X₁₋₇. Enquanto que os receptores P2Y, são subdivididos em oito receptores: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄ (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998; BURNSTOCK, 2007). O esquema representando abaixo mostra a degradação extracelular do ATP, ativação de receptores e suas respectivas vias de sinalização (Figura 5).

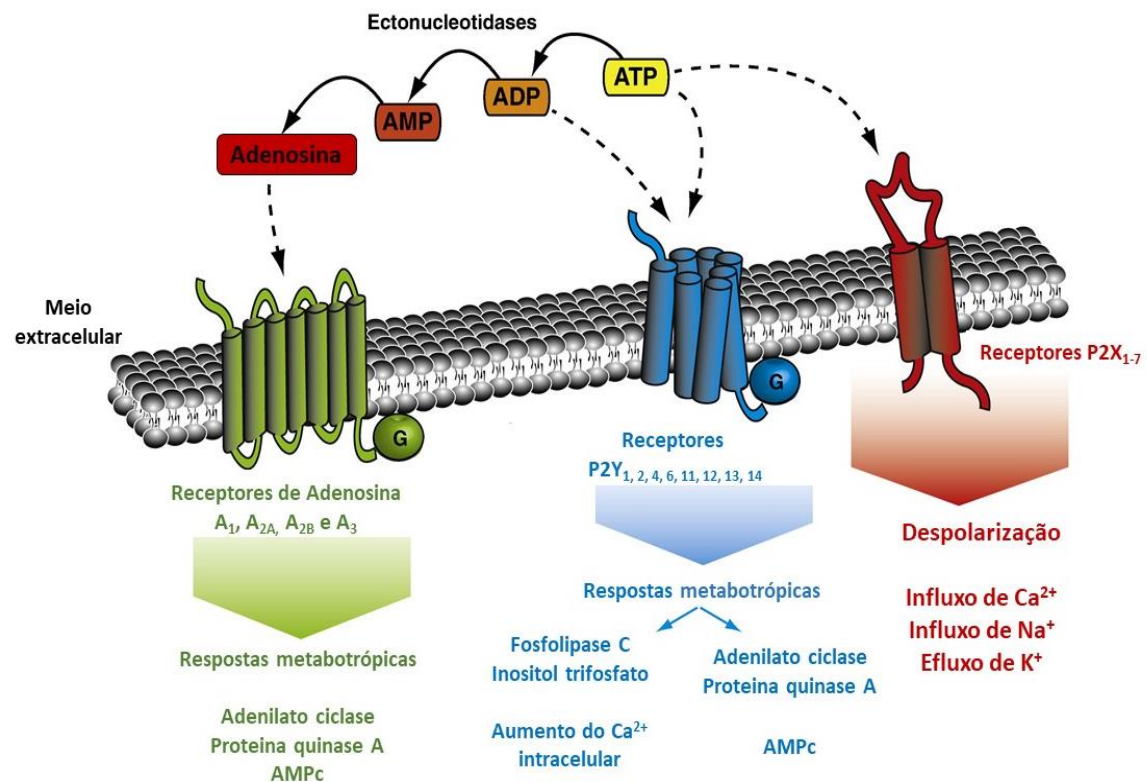


Figura 5 - Receptores purinérgicos e as respectivas vias de sinalização. ATP pode ser convertido a ADP e a adenosina, pela ação das ectonucleotidasas. Em vermelho, receptores ionotrópicos P_{2X}, ativados pelo ATP. Sua ativação abre um canal catiônico, resultando em efluxo de K⁺ e influxo de Na⁺ e Ca²⁺. Em azul, receptores metabotrópicos P_{2Y}, ativados principalmente por ATP e ADP. P_{2Y}₁, P_{2Y}₁₂ e P_{2Y}₁₃ são ativados por ADP. Sendo P_{2Y}₁ acoplado a proteína G_q, ativando a fosfolipase C e aumentando o Ca²⁺ intracelular. P_{2Y}₁₂ e P_{2Y}₁₃ são acoplados a proteína G_{i/o}, inibindo a adenilato ciclase e reduzindo a produção de AMPc. P_{2Y}₂, P_{2Y}₄ e P_{2Y}₁₁ são ativados por ATP e acoplados a proteína G_{q/11}, ativando a fosfolipase C-β e aumentando o Ca²⁺ intracelular. P_{2Y}₆ e P_{2Y}₁₄ são ativados por UDP. Sendo P_{2Y}₆ acoplado a proteína G_{q/11}, ativando PLCβ e mobilizando Ca²⁺ e P_{2Y}₁₄ acoplado a proteína G_{i/o} inativando AD e reduzindo AMPc. Em verde, receptores metabotrópicos de Adenosina. A₁ e A₃ ativam a proteína G_{i/o}, inibindo a adenilato ciclase e reduzindo a produção de AMPc. Enquanto A_{2A} e A_{2B} ativam a proteína G_s, ativando a adenilato ciclase e aumentando a produção de AMPc (Fonte: Adaptado de BAROJA-MAZO, BARBERA-CREMADES e PELEGRIN, 2012; RANG et al., 2016).

1.3.2. ATP na retina:

O ATP é um importante neuromodulador do SNC, controlando a proliferação celular durante o desenvolvimento da retina de vertebrados (para revisão: Martins & Pearson, 2008). Na retina de galinha a proliferação celular induzida por ATP ocorre durante uma fase restrita do desenvolvimento embrionário (E7 a E9) de forma dependente da ativação da PLC, PKC e MAPK (SANCHES et al., 2002, NUNES et al., 2007). Durante o desenvolvimento da retina, células mais diferenciadas liberam fatores solúveis para o meio extracelular capazes de inibir a proliferação celular

induzida por ATP, um fenômeno que ocorre em conjunto com a dessensibilização de receptores P2Y (FRANÇA et al., 2007). Ao mesmo tempo que o ATP promove a proliferação do tecido retiniano durante o desenvolvimento, o ATP em concentrações milimolares reduziu a viabilidade celular, induzindo a apoptose de neurônios da retina de forma dependente de receptores P2X₇ e NMDA (ANCASSI et al., 2013).

1.3.3. Receptor P2X₇

Dentre os receptores P2X, o receptor P2X₇ é de grande interesse científico por sua capacidade de formar macroporos a partir da ativação continuada por ATP. Inicialmente denominado receptor P2Z (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Os receptores P2X₇ são canais de cátions não-seletivos dependentes de ATP, que medeiam a transmissão excitatória rápida em diversas regiões do cérebro e da medula espinhal. O receptor é composto por um trímero, formado por três subunidades proteicas dispostas, formando um canal. Possui ainda dois domínios transmembrana (TM1 e TM2), ligados por alça extracelular com terminais carboxila e amina intracelulares (figura 6-a), se diferenciando molecularmente dos demais receptores P2X por possuir um terminal carboxila maior (SKAPER; DEBETTO; GIUSTI, 2009). Essa característica lhe confere a capacidade de formação dos macroporos (DI VIRGILIO; SCHMALZING; MARKWARDT, 2018).

Diferentes concentrações e tempo do estímulo por ATP podem gerar dois diferentes estágios de permeabilização do receptor P2X₇ (DI VIRGILIO; SCHMALZING; MARKWARDT, 2018). A ligação rápida do ATP (figura 6-b), por menos de 10 segundos, desencadeia uma despolarização e cascatas de sinalização, essa por ação direta sobre a concentração de Ca²⁺ ou indireta por regulação da voltagem da membrana plasmática (SKAPER; DEBETTO; GIUSTI, 2009). Enquanto células expostas a altas concentrações extracelulares e por mais de 10 minutos formam um macroporo na membrana plasmática (figura 6-c), permitindo o influxo de macromoléculas catiônicas de até 900 Da (DI VIRGILIO; SCHMALZING; MARKWARDT, 2018), um fenômeno relacionado a apoptose ou lise celular. A formação do macroporo desencadeia ainda o efluxo de K⁺ das células que, por sua vez, ativa a enzima conversora da IL-1 (caspase 1), levando à clivagem da pró-IL-1 β para a IL-1 β madura e a liberação para o espaço extracelular desta citocina (SKAPER;

DEBETTO; GIUSTI, 2009). Além disso, o receptor também pode ser ativado por agonistas não-nucleotídeos atuantes na face citoplasmática da célula, por exemplo, lipopolissacarídeos (LPS). A endotoxina bacteriana diminui o limiar de ativação do receptor sensibilizando-o as concentrações de ATP (DI VIRGILIO; SCHMALZING; MARKWARDT, 2018).

Os receptores P2X₇ são predominantemente localizados em células imunes e gliais, onde medeiam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, a proliferação celular e a apoptose (BUNSTOCK, 2007). A ativação deste receptor tem propriedades citotóxicas dramáticas que, juntamente com sua capacidade de regular a produção e liberação de citocinas, propõem que ele pode atuar como um importante regulador da morte celular em resposta a insultos patológicos (SKAPER; DEBETTO; GIUSTI, 2009).

Na retina, os receptores P2X₇ já foram identificados em células ganglionares e glia de Müller (MARTINS; PEARSON, 2008), e até o presente momento nenhuma relação entre receptores canabinoides e purinérgicos do tipo P2X₇ foi estabelecida na literatura.

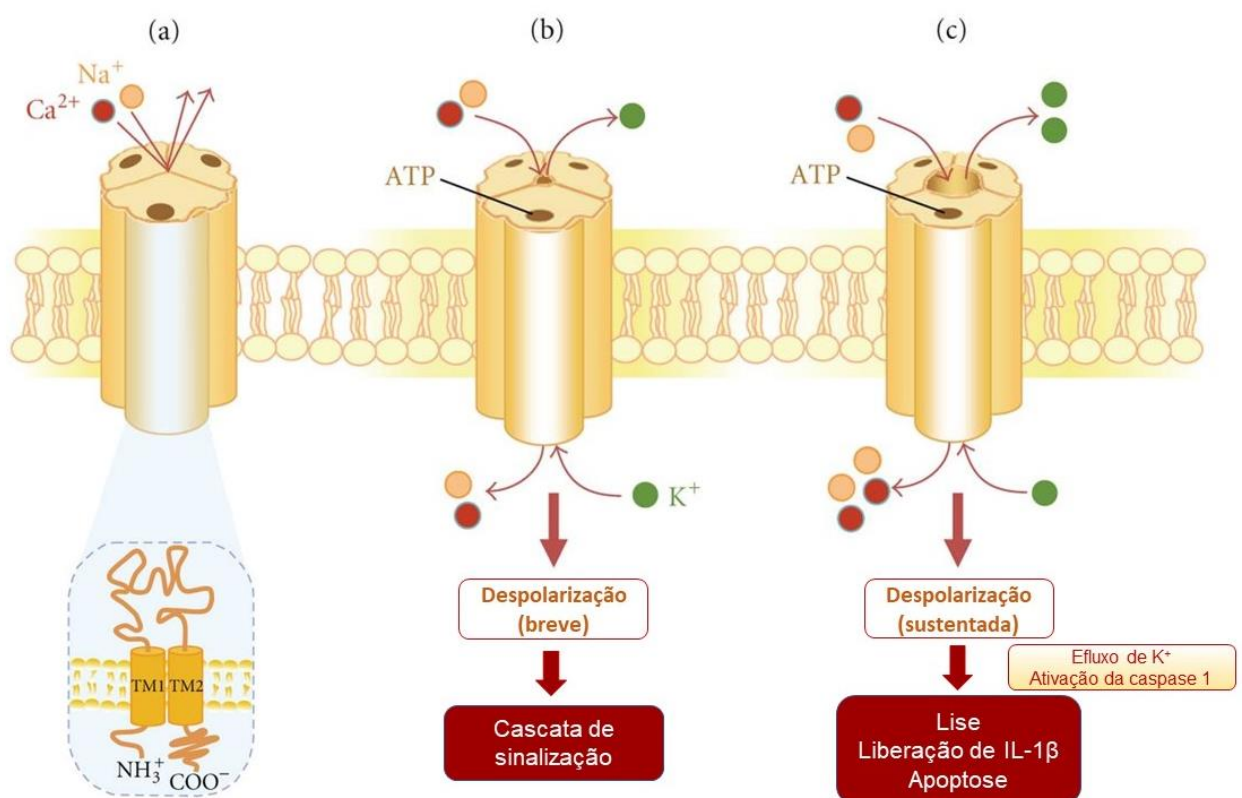


Figura 6 - Estrutura e ativação do receptor P2X₇: (a) Receptor transmembrana, trímico formado por dois domínios e alça com porção N-terminal e C-terminal intracelular. Dependente de ativação por ATP para abertura do canal e

entrada de cátions. (b) Rápida ligação do ATP extracelular ativa o canal iônico. Resulta na rápida abertura, entrada e saída de cátions despolarizando a membrana e ativação de sinalização. (c) Ativação sustentada de ATP (>10 min.) leva a formação de macroporo que permite entrada de moléculas de até 900 Da que resulta em apoptose ou lise celular. Ocorre ainda o efluxo de K^+ que ativa a caspase 1, induzindo liberação de IL-1 β (citocina pró-inflamatória) (Fonte: Adaptado de SKAPER; DEBETTO; GIUSTI, 2009).

1.3.4. Receptores P2Y₁₂

Assim como todos os receptores P2Y, os receptores P2Y₁₂ são metabotrópicos, apresentando sete regiões transmembranares com uma porção amino-terminal voltada para a face extracelular e uma porção carboxi-terminal voltada para a face intracelular. São receptores acoplados a proteína G_{i/o}, portanto atuam inibindo a adenilil ciclase e diminuindo os níveis de AMPc. Tem como agonista natural o ADP (BURNSTOCK, 2007). Identificados inicialmente em plaquetas (HOLLOPETER et al., 2001), promovendo o controle da agregação plaquetária, tornando um importante alvo para desenvolvimento de fármacos antitrombóticos, como clopidogrel, um antagonista do receptor P2Y₁₂ usado para o tratamento e prevenção de várias doenças trombóticas, como infarto do miocárdio, doença vascular periférica e acidente vascular cerebral (HOLLOPETER et al., 2001). O uso deste antagonista mostrou ainda efeitos de inibição da aterogênese, uma vez que a ativação do receptor inibe o AMPc e a fosforilação da PKA que induz a liberação de fatores que desencadeiam cascatas inflamatórias que promovem o desenvolvimento da aterosclerose (GAO et al., 2018).

Os receptores P2Y₁₂ também foram encontrados em células da micróglia M2 (MOORE et al., 2015), e em células do epitélio pigmentado da retina (LU et al., 2018). Na retina de ratos neo-natos foram responsáveis pela saída de células progenitoras do ciclo celular (DE ALMEIDA-PEREIRA et al. 2018). Contudo, na retina adulta de mamíferos, evidências diretas da expressão deste receptor ainda não foram obtidas (para revisão: VENTURA et al., 2018).

1.4. Modulação entre o Sistema Purinérgico e Sistema Canabinoide:

Já é descrito na literatura uma intermodulação entre os sistemas purinérgico e canabinoide. Wittinget al., (2004) mostrou em seu estudo que células da microglia expressam receptor purinérgico P2X₇ e enzimas que controlam a produção de 2-AG.

Sob condições de alta concentração de ATP, receptores P2X₇ são ativados induzindo consequentemente um aumento sustentado de Ca²⁺ intracelular, que aumenta a atividade da DGL e diminui a MAGL, permitindo um acúmulo de endocanabinoide. Dados do mesmo grupo, mostraram que culturas de astrócitos tratadas com concentrações milimolares de ATP, ativam o receptor P2X₇, levando ao aumento sustentado de Ca²⁺ intracelular, ocasionando o aumento da produção de 2-AG. Os autores sugerem que durante fenômenos de lesão do tecido neural quantidades milimolares de ATP são liberadas, podendo aumentar a produção de 2-AG como um mecanismo de proteção (WALTER et al., 2004).

Kovacs et al. (2011), mostrou que em células de Purkinje o ATP induziu a despolarização e o influxo de Ca²⁺ via receptores P2X, desencadeando a produção de endocanabinoides no neurônio pós-sináptico e a consequente sinalização retrógrada a partir da ativação do CB1 no neurônio pré-sináptico.

A modulação de receptores purinérgicos a partir de receptores canabinoides também foi demonstrada por Niu et al. (2017). Neste trabalho, a dor neuropática foi induzida por lesão por constrição crônica (CCI) do nervo ciático e por tratamento com injeção intratecal de ADPbetaS (100pM). Após a indução de dor neuropática, foi observado um aumento da expressão de receptores P2Y₁₂ e P2Y₁₃ na medula espinhal dorsal. Efeito esse, significativamente inibido quando tratados com AM 1241, agonista seletivo para o receptor CB2. Os autores sugerem que a diminuição da expressão dos receptores P2Y₁₂ e P2Y₁₃ seria um mecanismo envolvido na analgesia mediada pelo receptor CB2.

Em nosso trabalho, detectamos interações entre os sistemas canabinoide e purinérgico capazes de controlar a proliferação e a viabilidade de células da retina embrionária em cultura. Parte deste trabalho foi recentemente submetido a revista *Molecular Neurobiology*, anexo B (FREITAS et al., 2018).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar o papel dos Sistemas Canabinoide e Purinérgico sobre a proliferação e morte celular de progenitores da retina embrionária de galinha.

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar o efeito do agonista canabinoide WIN 55,212-2, e antagonistas de receptores P2Y₁₂ e P2X₇ sobre a proliferação celular induzida por ATP em culturas de células de retina.
- Investigar a ação do WIN e antagonistas de receptores P2X₇ sobre a viabilidade de células de retina em cultura.
- Caracterizar a formação de macroporos em culturas de células de retina tratadas com WIN, ATP e antagonista de receptores P2X₇.

3. METODOLOGIA

3.1. Cultura de células de retina:

Embriões de galinha White-Leghorn com sete dias de desenvolvimento (E7) foram dissecados em solução salina estéril sem cálcio e sem magnésio (CMF). As retinas foram transferidas para um tubo de ensaio, contendo 1 mL de CMF e tripsina 0,1% e mantidas em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, a solução de tripsina foi removida com auxílio de pipeta pasteur e foi adicionado 5 mL de meio MEM completo (5% de soro fetal bovino, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 mg/ml). As células foram então dissociadas mecanicamente e transferidas para garrafa de vidro contendo 5 mL de MEM completo. A densidade celular foi determinada com uso da câmara de Neubauer e as células foram semeadas em placas plásticas de petri. Este trabalho possui aprovação em comitê de ética: CEUA-UNIRIO 2016.02.

3.2. Incorporação de [³H]-timidina:

Células de retina em E7 foram semeadas em placas de petri estéril de 35mm com densidade de 4×10^6 células / placa. Após 24h de cultivo o meio de cultura foi substituído por meio completo fresco (E7C1) e as culturas tratadas com WIN 55,212-2 (0,5, 1,0 e 5,0 μ M), URB 602 (25 μ M), A 438079 (100 nM), PSB 0739 (5,0 e 10 μ M), ADP 100 μ M e ATP 100 μ M) por mais 24h e incubadas com [³H]-timidina (0,25 μ Ci) por 60 minutos em estufa a 37°C. Posteriormente, as culturas foram lavadas duas vezes com 1mL de MEM-Hepes 25 mM, pH 7.4, e dissolvidas com 0,2mL de NaOH 0,4N e incubadas por 15 minutos a 4°C. Em seguida, o homogenado celular foi removido com auxílio de 3x1mL de água destilada gelada e transferidos para tubos de ensaio. Para a precipitação do DNA e proteínas, foi adicionado 0,6 mL de ácido tricloroacético (TCA) 50% por tubo e incubados a 4°C por 30 minutos. As amostras foram então filtradas em filtros de fibra de vidro do tipo Whatmann GF/B, lavando três vezes com 2 mL de TCA 5%. Os filtros foram secos em estufa a 100°C por 90 minutos, transferidos para frascos de vidro contendo 5 mL de tolueno + PPO (4g de PPO para 1L de tolueno) e a radioatividade foi determinada por cintilação líquida.

3.3. Viabilidade celular por MTT:

As células foram semeadas em placa de petri estéril multiwell contendo 24 poços na densidade de 1×10^6 células / poço. Após 24h de cultivo o meio de cultura foi substituído por meio completo fresco (E7C1) e as culturas tratadas com WIN 55,212-2 (0,5, 1,0 e 5,0) e A 438079 (10, 100 e 1000 nM) durante 24h. Foram então incubadas em solução de MTT 3 mg / mL em MEM-Hepes 25 mM, pH 7.4 por 90 minutos em banho-maria a 37°C. Em seguida, foi retirado a solução de MTT e adicionado 0,3 mL de solução ácido-alcoólica (HClp.a. + isopropanol 6:1000). As amostras foram então homogeneizadas e transferidas para uma placa multiwell de 96 poços em duplicatas. A leitura das amostras foi feita por espectrofotômetro em comprimentos de onda de 550 e 650nm.

3.4. Captação de corante fluorescente sulfurodamina B:

As células de retina em E7 foram semeadas em placas de petri esteril de 35 mm na densidade de 8.10^6 células / placa. Células em E7C1 foram tratadas com WIN 0,5 μ M e A438079 10 nM durante 24 horas e células em E7C2 com A438079 10 nM por 10 minutos juntamente com a solução de sulfurodamina B. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por 1 mL de tampão HANK's, pH 7.4, na ausência de magnésio e incubadas no banho-maria por 5 minutos. Em seguida, a solução tampão HANK's foi substituída por 1 mL de solução contendo corante sulfurodamina B a 3 mM, e imediatamente as células foram tratadas com ATP 3 mM por 10 minutos. As placas foram posteriormente lavadas duas vezes com HANK's e a captação de corante fluorescente analisada por microscópio invertido. Foram realizados cerca de quatro experimentos em duplicata. Para cada experimento, cinco imagens foram obtidas para cada placa, totalizando aproximadamente 40 imagens para cada tipo de tratamento. Para a confecção dos gráficos, foi utilizado o número total de células positivas para sulfurodamina B para cada condição experimental.

3.5. Análise estatística:

A análise dos dados foi realizada através do programa GraphPad Prism 5.0, aplicando o teste One-Way ANOVA (paramétrico) associado ao pós-teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS:

Diante dos diversos efeitos produzidos pelo sistema endocanabinoide, sua participação no desenvolvimento cerebral tem sido sugerida. Dados já mostram o efeito de canabinoides, sintéticos e endógenos, modulando a proliferação e sobrevivência de células tumorais, inibindo o crescimento e induzindo a regressão de gliomas malignos em ratos (GALVE-ROPERH et al., 2000).

Uma vez que canabinoides são capazes de modular a proliferação celular em outros modelos, nos perguntamos então se o mesmo poderia estar acontecendo na retina em fases precoces do desenvolvimento. Para isso, culturas de retina em E7C1 foram tratadas com doses crescentes de WIN 55,212-2 μM (0,5; 1,0 e 5,0), um agonista de receptores CB1 e CB2, durante 24h. Em seguida as células foram submetidas ao protocolo de incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina, um marcador da fase S do ciclo celular. Observou-se que o canabinoide sintético diminuiu significativamente a síntese de DNA em todas as concentrações utilizadas (Redução de incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina em relação ao controle: WIN 0,5 μM : 36%, WIN 1,0 μM : 70% e WIN 5,0 μM : 86%) (Gráfico 1).

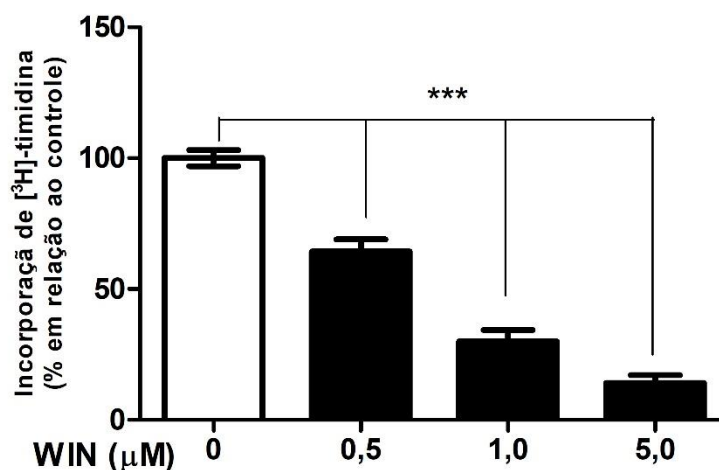


Gráfico 1: Agonista canabinoide WIN 55,212-2 diminui a proliferação celular. Culturas em E7C1 foram tratadas com doses crescentes de WIN 55,212-2 (0,5 μM , 1,0 μM e 5,0 μM) por 24 horas e submetidas ao protocolo de incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina. (% de efeito em relação ao controle \pm erro padrão. DMSO = 100 ± 3 ; WIN 0,5 μM = 64 ± 4 ; WIN 1,0 μM = 30 ± 4 ; WIN 5,0 μM = 14 ± 3 . n=7. $p < 0.0001$ em relação ao controle).

Nucleotídeos são classicamente descritos por estimular a proliferação de células progenitoras na retina de aves, através da ativação dos receptores purinérgicos (SANCHES et al., 2002; FRANÇA et al., 2007). Uma vez que o agonista de receptores CB1 e CB2 inibiu a proliferação celular em culturas de células da retina, resolvemos investigar a possível ação de endocanabinoides sobre a proliferação celular induzida por ADP. Para isso, células em E7C1 foram tratadas com URB 602 25 μ M, um inibidor da enzima monoacilglicerol lipase (MAGL) responsável pela degradação do 2-araquidonoilglicerol (2-AG), e ADP 100 μ M por 24 h e submetidas a incorporação de [3 H]-timidina. URB inibiu a incorporação de [3 H]-timidina induzida por ADP de forma significativa (Gráfico 2).

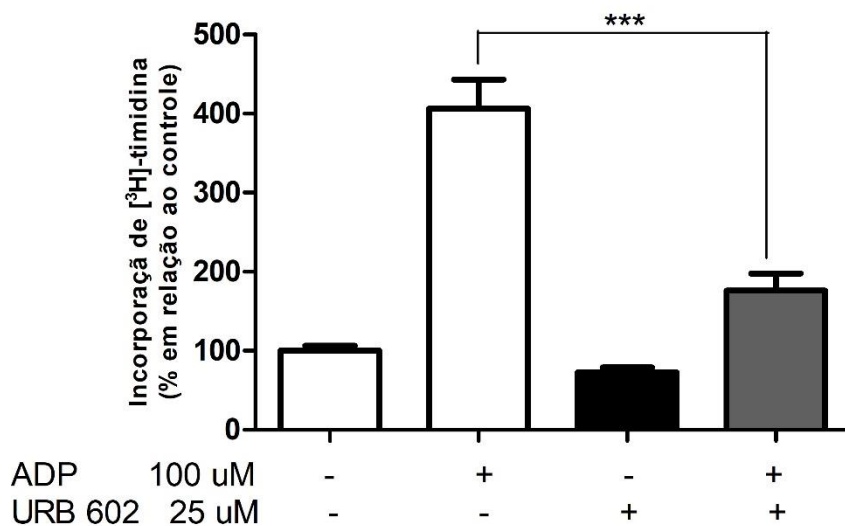


Gráfico 2: URB 602 inibe proliferação celular induzida por ADP. Células em E7C1 foram tratadas com URB 602 25 μ M e ADP 100 μ M por 24 horas e em seguida submetida ao protocolo de incorporação de [3 H]-timidina. (% do efeito em relação ao controle \pm erro padrão. DMSO = 100 \pm 7; ADP 100 μ M = 406 \pm 36; URB 602 25 μ M = 73 \pm 6; URB + ADP = 176 \pm 22. N = 4. P < 0.0001).

Posteriormente, investigamos se o efeito de inibição da proliferação celular causada pelo WIN 55,212-2 poderia ser revertido. Para isso realizamos o seguinte protocolo de tratamento: Culturas em E7C0 foram tratadas com WIN 0,5 μ M durante 24h. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por meio fresco e as células foram estimuladas com ATP 100 μ M durante 24h. Num outro grupo experimental, células em E7C1 foram tratadas simultaneamente com ATP 100 μ M e WIN 0,5 μ M por 24h. Em

seguida, em E7C2, todas as culturas de células foram submetidas ao protocolo de incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina. Células pré-incubadas com WIN (E7C0) foram capazes de inibir significativamente a proliferação celular induzida por ATP, mesmo após retirada do canabinoide. De forma semelhante, WIN também inibiu a proliferação celular induzida por ATP em culturas de células tratadas simultaneamente com ATP e WIN em E7C1 (Gráfico 3).

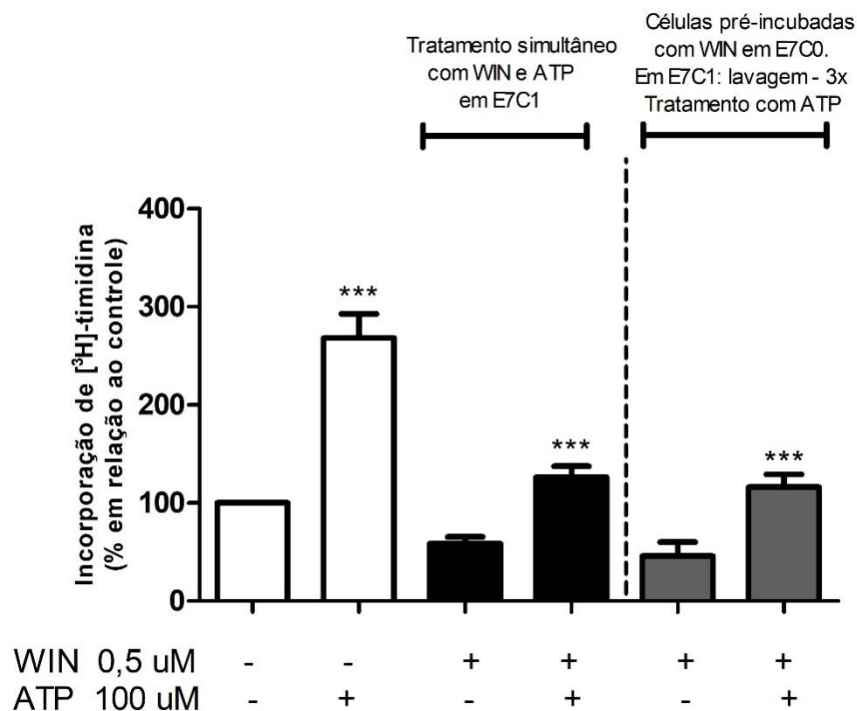


Gráfico 3: Pré-incubação com canabinoide sintético inibe proliferação celular induzida por ATP. Células em E7C0 foram pré-incubadas com WIN 0,5 μM e ATP 100 μM , posteriormente foram lavadas e incubadas por 24 horas em estufa 5% CO_2 , em seguida foram submetidas ao protocolo de incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina. Células em E7C1 foram tratadas com WIN 0,5 μM e ATP 100 μM por 24 horas e submetidas a incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina. (% do efeito em relação ao controle \pm erro padrão. (E7C1) DMSO = $100 \pm 0,6$; ATP 100 μM 268 ± 25 ; WIN 0,5 μM = 59 ± 7 ; WIN + ATP = 126 ± 11 ; (E7C0) WIN 0,5 μM = 46 ± 14 ; WIN + ATP = 116 ± 13 . $n=6$. $P<0.0001$).

A diminuição da incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina pelo WIN pode significar uma parada do ciclo celular (arresto), diferenciação ou morte celular. Para investigar a hipótese de morte celular, realizamos um ensaio colorimétrico com MTT, onde é avaliada a citotoxicidade pela capacidade das desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, de reduzirem o composto de coloração amarela (brometo de 3-4,5-Dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazol: MTT) a

cristais de formazan púrpura. Células em E7C1 foram tratadas com doses crescentes de WIN μM (0,5; 1,0 e 5,0) por 24 horas e submetidas ao protocolo de viabilidade celular. WIN induziu a morte de células progenitoras da retina apenas nas concentrações de 1,0 e 5,0 μM . (Redução da viabilidade celular em relação ao controle: WIN 0,5 μM : 2%, WIN 1,0 μM : 37% e WIN 5,0 μM : 60%) (Gráfico 4).

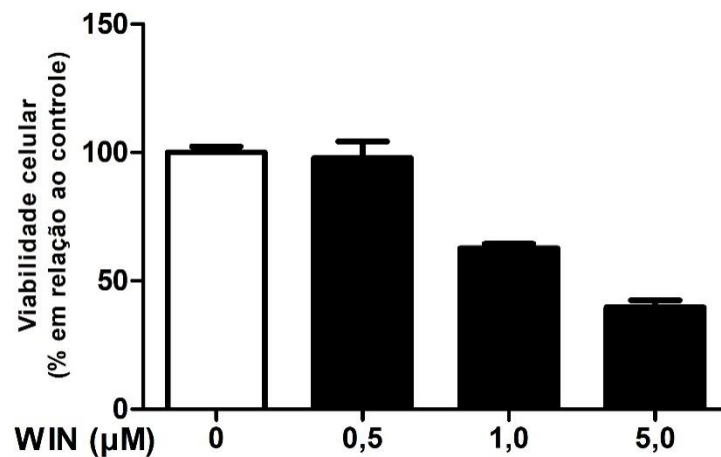


Gráfico 4: Agonista canabinoide induz a morte de células da retina. Células em E7C1 foram tratadas com doses crescentes de WIN 55,212-2 (0,5 μM , 1,0 μM e 5,0 μM) por 24 horas e submetidas ao ensaio de MTT (% do efeito em relação ao controle erro padrão. DMSO = 100 ± 2 ; WIN 0,5 μM = 98 ± 7 ; WIN 1,0 μM = 63 ± 2 ; WIN 5,0 μM = 40 ± 3 . n=2).

Com o objetivo de investigar se o efeito de morte celular induzido por WIN ocorre em embriões em idades mais avançadas do desenvolvimento, células de retinas dissecadas de embriões em E7 e E8 foram tratadas com diferentes doses de WIN (1,0 μM e 5,0 μM) por 24 horas e submetidas ao ensaio de viabilidade celular. Observou-se que células em E7 sofreram um maior efeito de morte em comparação com células em E8 em ambas as concentrações. Em células E7, WIN 1,0 μM diminuiu a viabilidade celular em 35%, enquanto células em E8 tiveram a viabilidade reduzida em 15%. Já para WIN 5,0 μM a viabilidade foi reduzida para 64% em E7, e apenas 26% em E8. Quando comparadas as células de mesma concentração de WIN, observou-se uma diferença de 20% para concentrações de WIN 1,0 μM e 38% em WIN 5,0 μM . Mostrando que WIN 55,212-2 induz a morte celular de progenitores da retina de forma dependente da idade de desenvolvimento embrionário (Gráfico 5).

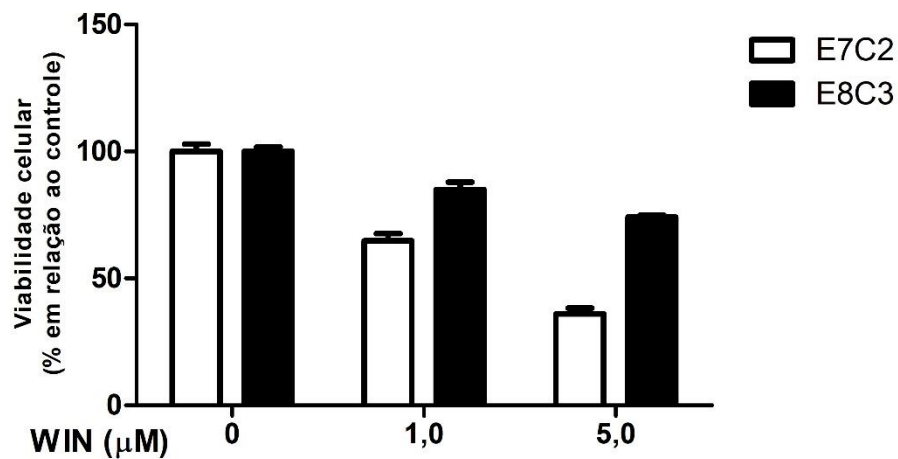


Gráfico 5: Canabinoide induz a morte celular em culturas de células de retina de forma dependente do estágio de desenvolvimento embrionário. Células em E7C1 e E8C2 foram tratadas com diferentes doses de WIN 55,212-2 (1,0 μM e 5,0 μM) por 24 horas e posteriormente submetidas ao ensaio de MTT ($n=1$).

Dados da literatura mostram que o receptor purinérgico P2X₇ está envolvido com a morte de células na retina de aves (ANCASSI et al., 2013). Objetivando investigar se os receptores P2X₇ estão envolvidos com a morte celular induzida por WIN, culturas em E7C1 foram tratadas com WIN 1,0 μM e/ou A 438079, um antagonista de receptores P2X₇, (10 nM, 100 nM e 1 μM) por 24 horas e submetidas ao ensaio de viabilidade celular. O tratamento com A 438079 nas concentrações de 100 nM e 1 μM inibiram completamente a morte celular induzida por WIN (Gráfico 6).

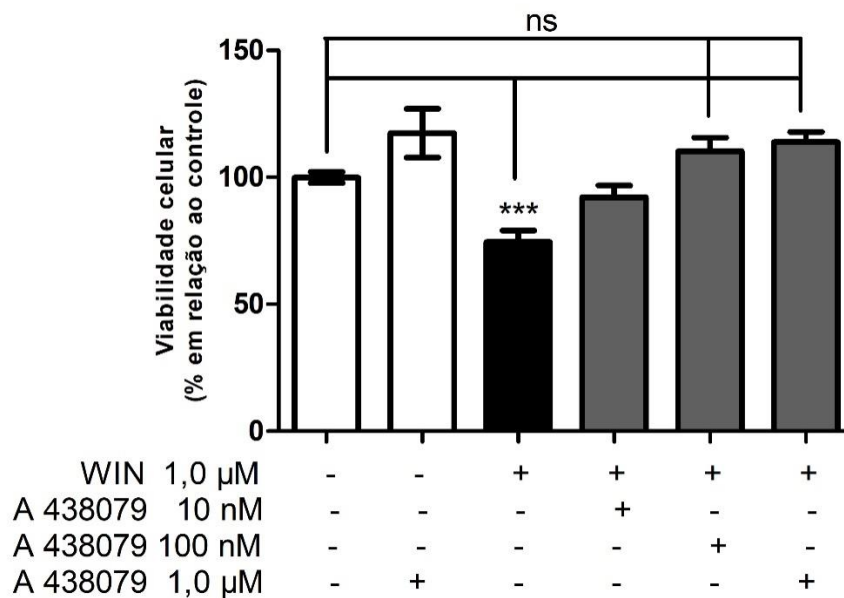


Gráfico 6: Antagonista P2X₇ bloqueia a morte celular induzida pelo WIN 55,212-2. Células em E7C1 foram tratadas com WIN 1 μM e doses crescentes de A438079 (10 nM, 100 nM e 1 μM) por 24 horas e submetidas ao ensaio de MTT. (% do efeito em relação ao controle ± erro padrão. DMSO = 100 ± 2; A438079 1 μM = 117 ± 10; WIN 1 μM = 74 ± 4; WIN+A438079 10 nM = 92 ± 4; WIN+A438079 100 nM = 110 ± 5; WIN+A438079 1 μM = 114 ± 4. n=3. P<0.0001).

Uma característica descrita para os receptores P2X₇ é a sua capacidade, quando estimulados por concentrações milimolares de ATP por tempo prolongado (10 min.), de formar macroporos na membrana plasmática permeáveis a moléculas com até 900 Da, levando a célula a morte (DI VIRGILIO et al., 2018). Dentre as moléculas que passam por este receptor podemos destacar os corantes catiônicos fluorescentes, sendo estas ferramentas úteis e de fácil aquisição capazes de indicar a presença e atividade destes receptores. Sendo assim, células em E7C1 foram tratadas com WIN 0,5 μM por 24 horas e tratadas com ATP 3 mM e A 438079 10 nM por 10 minutos, e submetidas ao ensaio de captação de corante fluorescente sulfurodamina B. Observou-se que o WIN e o ATP aumentam a captação de corante ~2x. Quando as culturas foram pré-incubadas com WIN durante 24h e tratadas com ATP 3mM durante 10 min, a captação de corante foi potenciada e um aumento de ~4,2x foi observado (Figura 7). Em todas as situações o antagonista do receptor P2X₇ inibiu completamente a captação de corante (Gráfico 7).

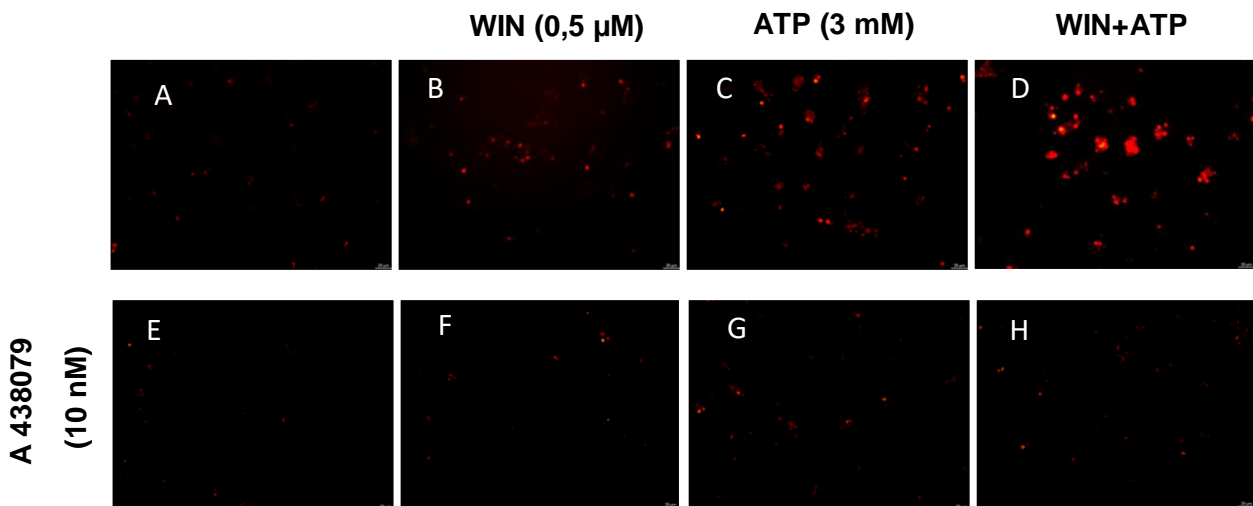


Figura 7: WIN aumenta a captação de corante fluorescente através de receptores P2X7. A- DMSO 24 h; B- WIN 0,5 μ M 24 h; C- ATP 3 mM 10 min.; D- WIN 24 h + ATP 10 min.; E- A 438079 10 nM 10 min.; F- WIN 24 h. + A 438079 10 min.; G- A438079 10 min. + ATP 10 min.; H- WIN 24 h + ATP 10 min. + A 438079 10 min.

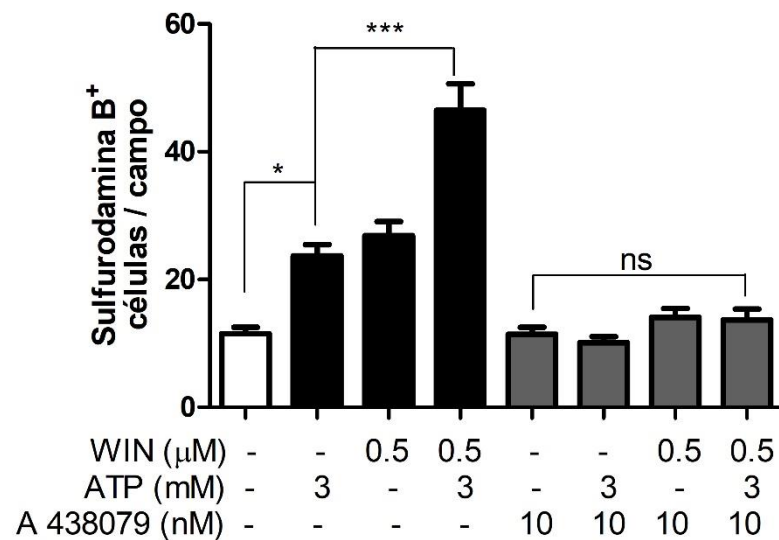


Gráfico 7: Antagonista do receptor purinérgico P2X₇ bloqueia a captação de corante sulfurodamina B. Células em E7C1 foram tratadas com WIN 0,5 μ M durante 24 horas, posteriormente submetidas ao protocolo de captação de corante fluorescente onde foram tratadas com ATP 3 mM e A 438079 10 nM durante 10 min. (Média em relação ao controle \pm erro padrão. DMSO = 11,50 \pm 1,01; WIN 0,5 μ M = 23,71 \pm 1,76; ATP 3 mM = 26,88 \pm 2,21; WIN + ATP = 46,46 \pm 4,17; A 438079 10 nM = 11,45 \pm 1,07; A438079 + WIN = 10,14 \pm 0,91; A438079 + ATP = 14,08 \pm 1,40; A438079 + ATP + WIN = 13,67 \pm 1,71. n=4. P<0.0001).

Uma vez que o receptor P2X₇ participa de forma importante da morte celular induzida por WIN 55,212-2, nos perguntamos se este receptor também estaria envolvido com a inibição da proliferação celular induzida por canabinoides. Para isto, células em E7C1 foram tratadas com antagonista do receptor P2X₇, A438079 100 nM e WIN 0,5 µM durante 24 horas e submetidas ao protocolo de incorporação de [³H]-timidina. O canabinoide inibiu aproximadamente 37% da proliferação celular, quando comparado ao controle. Porém, o antagonista do receptor P2X₇ não reverteu a ação do WIN sobre a proliferação celular na retina (Gráfico 8).

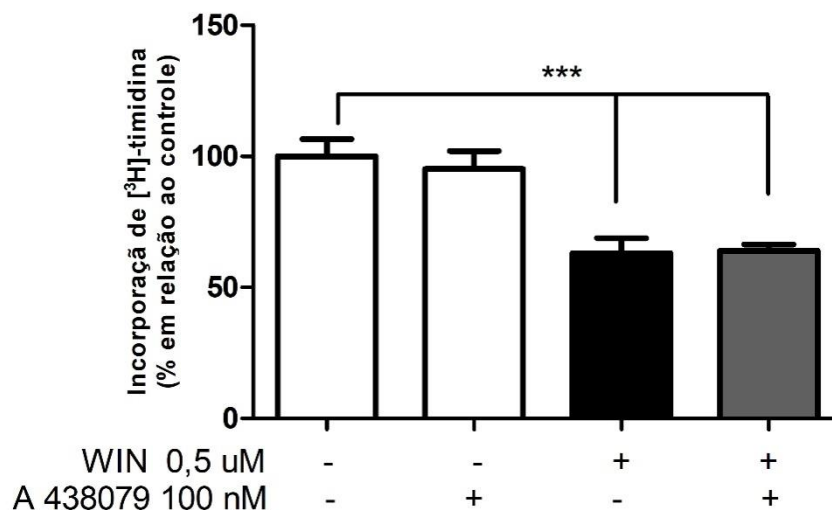


Gráfico 8: Receptor P2X₇ não tem participação no efeito do WIN 55,212-2 sobre a proliferação celular. Células em E7C1 foram tratadas com A438079 100 nM e WIN 0,5 µM durante 24 horas e seguidamente submetidas ao protocolo de incorporação de [³H]-timidina. (% do efeito em relação ao controle ± erro padrão. DMSO = 100 ± 6; A438079 100 nM = 95 ± 7; WIN 0,5 µM = 63 ± 6; A438079 + WIN = 64 ± 2. n=3. ***P=0,0001).

Dados da literatura indicam que o receptor purinérgico P2Y₁₂ induz células da retina de ratos a sair do ciclo celular e entrar em G₀ (ALMEIDA-PERREIRA et al., 2018). Objetivando investigar se o WIN 55,212-2 inibe a proliferação celular através da participação de receptores P2Y₁₂, células em E7C1 foram tratadas com antagonista do receptor P2Y₁₂, PSB 0739 10 µM e WIN 0,5 µM por 24 horas e submetidas ao protocolo de incorporação de [³H]-timidina. A proliferação celular inibida por WIN foi completamente revertida quando as células foram tratadas com o antagonista do receptor P2Y₁₂ (Gráfico 9).

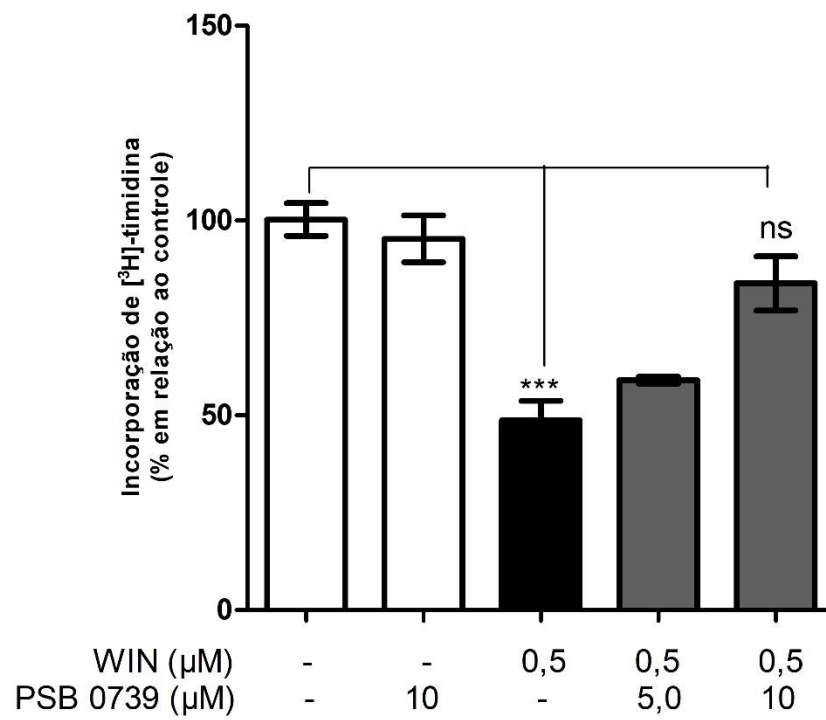


Gráfico 9: WIN 55,212-2 diminui a proliferação celular dependente do receptor purinérgico P2Y12. Células em E7C1 foram tratadas com WIN 55,212-2 0,5 μM e PSB 0739 10 μM por 24 horas e submetidas ao protocolo de incorporação de [3H]-timidina. (% do efeito em relação ao controle ± erro padrão. DMSO = 100 ± 4; PSB 0739 10 μM = 95 ± 6; WIN 0,5 μM = 49 ± 5; PSB 0739 5 μM + WIN = 59 ± 0,9; PSB 0739 10 μM + WIN = 84 ± 7. n=4. P<0.0001).

5. DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento da retina, os processos de proliferação, diferenciação e morte ocorrem de forma simultânea e organizada (DE LA ROSA; DE PABLO, 2000), sendo fatores intrínsecos e extrínsecos os responsáveis por modular esses efeitos (para revisão: MARTINS; PEARSON, 2008). Diversos são os estudos sobre os canabinoides no SNC, não somente por seus efeitos psicoativos, mas também por seu envolvimento na neuroproteção, neuroplasticidade, neurotransmissão e potencial uso terapêutico em patologias (SCHWITZER et al., 2016; para revisão: KOKONA et al., 2016). Entretanto, seus efeitos durante o desenvolvimento do SNC ainda não estão bem elucidados.

Kubrusly et al. (2018), mostraram a presença de receptores CB1 e CB2 em neurônios e na glia de Müller da retina de embrião de galinha. A ativação destes receptores por WIN causou inibição da formação de AMPc e da liberação de GABA. Aqui, utilizando retinas em E7, WIN inibiu a proliferação celular de forma dose-dependente. Nesta fase do desenvolvimento embrionário células bipolares e glias de Müller ainda não completaram o seu ciclo de mitoses (PRADA et al, 1991), sugerindo que estas células estejam diminuindo a proliferação na presença de WIN. Além disso, WIN também inibiu a proliferação celular induzida pelo agente mitogênico ATP, sendo este efeito irreversível. Reforçando a hipótese de que os canabinoides são capazes de inibir a proliferação na retina, tratamos nossas culturas com URB602, um inibidor da enzima MAGL, o que causa uma redução na hidrólise de 2-AG. De forma semelhante ao WIN, URB602 também inibiu a proliferação celular induzida por ADP. De acordo com nossos resultados, estudos com canabinoides já demonstravam efeito antiproliferativo principalmente sobre neoplasias (GALVE-ROPERH et al. 2000; GUZMAN et al., 2003; ELLERT-MIKLASZEWSKA et al., 2013). Em conjunto estes resultados sugerem que os canabinoides inibem a proliferação celular na retina embrionária, possivelmente por causar um arresto no ciclo celular e/ou diferenciação celular. Entretanto, mais experimentos devem ser realizados com intuito de caracterizar a ação dos canabinoides para cada um dos fenômenos biológicos citados acima.

A diminuição da incorporação de [³H]-timidina também pode significar morte celular. Roberto e colaboradores (2018), mostram que células de câncer de próstata tratadas com WIN 55,212-2 sofrem uma diminuição da proliferação, aumento da

apoptose, além de induzir um arresto do ciclo celular por modulação dos níveis de p27, Cdk4 e pRb, proteínas reguladoras do ciclo. Em nosso trabalho, tratamos as células com doses crescentes de WIN 55,212-2 e as submetemos ao ensaio de viabilidade celular. O agonista canabinoide induz a morte de células da retina embrionária de forma dose-dependente, corroborando com achados pró-apoptótico do WIN em outros modelos (CASANOVA et al., 2003; ELLERT-MIKLASZEWSKA et al., 2005; LUCA et al., 2009; ROBERTO et al., 2018). Por outro lado, dados da literatura sugerem que os canabinoides tem efeito neuroprotetor, sendo relacionado inclusive como possível agente terapêutico em doenças da retina (KOKONA et al., 2016; SCHWITZER et al., 2016). Uma forma de entender a diferença entre os efeitos dos canabinoides observados neste trabalho quando comparados a outros modelos da literatura, realizamos as culturas de retina utilizando embriões com idades mais avançadas do desenvolvimento. Células de retina obtidas de embriões mais desenvolvidos mostraram um menor efeito de WIN sobre a viabilidade, mostrando que o efeito dos canabinoides sobre as células da retina é dependente da idade do desenvolvimento.

Ancassi et al., (2013), em seu estudo mostrou que células de retina de embrião de galinha em E7, tratadas com ATP 3mM sofreram morte por apoptose a partir da ativação do receptor purinérgico P2X₇ e formação de macroporo. Em nosso trabalho, células de retina em cultura foram tratadas com WIN e com o antagonista do receptor P2X₇, A 438079, com intuito de analisar a participação deste receptor purinérgico no efeito de morte induzida pelo canabinoide. O antagonista do receptor P2X₇ reverteu completamente o efeito de WIN sobre a viabilidade celular. A ativação constante (>10 minutos) do receptor P2X₇ induz a formação de macroporo não seletivo na membrana plasmática que permite fluxo de macromoléculas de até 900 Da e induz a apoptose (DI VIRGILIO et al., 2018). Para entender melhor a participação dos receptores P2X₇ em nosso modelo, um ensaio funcional para este receptor foi realizado utilizando o corante fluorescente sulfurodamina B. Nossos dados revelaram que o tratamento com WIN 24h causou um aumento de ~2x na captação de corante fluorescente em nossas culturas. Este aumento na captação de corante foi semelhante aos estímulos feitos com ATP 3 mM por 10 min. Além disso, quando as células foram tratadas previamente com WIN e em seguida estimuladas com ATP, um aumento de ~4,2x na captação de corante foi detectado, sendo então totalmente inibido pelo antagonista do receptor

P2X₇, para todas as condições. Estes resultados em conjunto sugerem que canabinoides aumentam a resposta de receptores P2X₇ ao ATP, induzindo a morte de células da retina em cultura.

Uma vez que o receptor P2X₇ está envolvido com a via de morte dos canabinoides, testamos sua participação no efeito sobre a proliferação celular. O antagonista do receptor P2X₇ não reverteu o efeito do canabinoide, sugerindo que estes receptores não participam do fenômeno de inibição da proliferação celular induzida por WIN, ou sugerem também que a população de células que sofrem morte celular por canabinoides possa ser diferente da população que sofre inibição da proliferação. Em estudo recente na retina de ratos neo-natos, mostrou uma alta expressão do receptor purinérgico P2Y₁₂ durante a primeira semana pós-natal, período de grande diferenciação celular. Uso do antagonista PSB 0739 no estudo induziu um aumento na proliferação celular, confirmando a participação do receptor na geração de células pós-mitóticas (DE ALMEIDA-PEREIRA et al., 2018). Em nosso estudo, tratamos as células com WIN 55,212-2 e antagonista do receptor P2Y₁₂, PSB 0739 e submetemos a incorporação de [³H]-timidina. Resultados mostraram um aumento da síntese de DNA, indicando que os canabinoides inibem a proliferação celular de forma dependente de receptores P2Y₁₂.

6. CONCLUSÕES:

- Canabinoides causam inibição da proliferação de células da retina embrionária de galinha em cultura.
- Canabinoides inibem de forma irreversível a proliferação celular induzida por nucleotídeos.
- WIN inibe a proliferação celular de progenitores tardios da retina de forma dependente de receptores P2Y₁₂.
- WIN aumenta a resposta de receptores P2X₇ causando a morte de células da retina em cultura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANCCASI, R. M. *et al.* ATP induces the death of developing avian retinal neurons in culture via activation of P2X7 and glutamate receptors. **Purinergic signalling**, v. 9, n. 1, p. 15–29, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22733428>>. Acesso em: 2 dez. 2018.
- BAROJA-MAZO, A.; BARBERÀ-CREMADES, M.; PELEGRÍN, P. The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1828, n. 1, p. 79–93, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273612000065?via%3Dihub>>. Acesso em: 1 dez. 2018.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BLOOMFIELD, M. A.P. *et al.* The neuropsychopharmacology of cannabis: a review of human imaging studies. **Pharmacology and Therapeutics**, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725818301906?via%3Dihub#bb1015>>. Acesso em: 13 nov. 2018.
- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1471–1483, 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-007-6497-0>>. Acesso em: 1 dez. 2018.
- BURNSTOCK, G. Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 2, p. 659–797, 2007. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00043.2006>>. Acesso em: 1 dez. 2018.
- CARLINI, E. A. A história da maconha no Brasil. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 55, n. 4, p. 314–317, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0047-20852006000400008&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 12 nov. 2018.
- CASANOVA, M L. *et al.* Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 1, p. 43–50, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12511587>>. Acesso em: 11 dez. 2018.
- DE ALMEIDA-PEREIRA, L. *et al.* P2Y12 but not P2Y13 Purinergic Receptor Controls Postnatal Rat Retinogenesis In Vivo. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 11, p. 8612–8624, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12035-018-1012-1>>. Acesso em: 3 dez. 2018.
- DE LA ROSA, E. J.; DE PABLO, F. Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. **Trends in Neurosciences**, v. 23, n. 10, p. 454–458, 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223600016283>>. Acesso em: 5 dez. 2018.
- DI VIRGILIO, F.; SCHMALZING, G.; MARKWARDT, F. The Elusive P2X7 Macropore. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 5, p. 392–404, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29439897>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

DONOVAN, S. L.; DYER, M. A. Regulation of proliferation during central nervous system development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 16, n. 3, p. 407–421, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952105000261>>. Acesso em: 16 nov. 2018.

DUBYAK, G. R.; EL-MOATASSIM, C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 265, n. 3, p. C577–C606, 1993. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.1993.265.3.C577>>. Acesso em: 30 nov. 2018.

ELLERT-MIKLASZEWSKA, A.; CIECHOMSKA, I.; KAMINSKA, B. Cannabinoid Signaling in Glioma Cells. *In: Advances in experimental medicine and biology*. [s.l.: s.n.], 2013, v. 986, p. 209–220. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22879071>>. Acesso em: 22 nov. 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**, v. 17, n. 1, p. 25–37, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15451022>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

FRADE, J. M.*et al.* Control of early cell death by BDNF in the chick retina. **Development (Cambridge, England)**, v. 124, n. 17, p. 3313–3320, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310326>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

FRANÇA, G. R.; FREITAS, R. C. C.; VENTURA, A. L. M. ATP-induced proliferation of developing retinal cells: regulation by factors released from postmitotic cells in culture. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 5, p. 283–291, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0736574807000755>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

GALVE-ROPERH, I.*et al.* Anti-tumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. **Nature Medicine**, v. 6, n. 3, p. 313–319, 2000. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nm0300_313>. Acesso em: 3 dez. 2018.

GAO, Y.*et al.* The role of P2Y12 receptor in ischemic stroke of atherosclerotic origin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-018-2937-2>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

GAONI, Y.; MECOULAM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1646–1647, 1964. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01062a046>>.

GOMES, I. *et al.* Novel endogenous peptide agonists of cannabinoid receptors. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 9, p. 3020–9, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19380512>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

GONÇALVES, G. A. M.; SCHLICHTING, C. L. R. Efeitos Benéficos e Maléficos da *Cannabis sativa*. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n. 2, p. 92–97, 2014.

GUZMÁN, M. Cannabinoids: potential anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 745–755, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc1188>>. Acesso em: 4 dez. 2018.

HEAVNER, W.; PEVNY, L. Eye development and retinogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 12, 2012.

HEIMANN, A. S.*et al.* Hemopressin is an inverse agonist of CB1 cannabinoid receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 51, p. 20588–93, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077343>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

HOLLOPETER, G.*et al.* Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 202–207, 2001. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/35051599>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

HONÓRIO, K. M.; ARROIO, A.; SILVA, A. B. F. Aspectos terapêuticos de compostos da planta *Cannabis sativa*. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 318–325, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000200024&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 12 nov. 2018.

IANNOTTI, F. A.; DI MARZO, V.; PETROSINO, S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. **Progress in Lipid Research**, v. 62, p. 107–128, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782715300230>>. Acesso em: 25 nov. 2018.

KOKONA, D.*et al.* Endogenous and Synthetic Cannabinoids as Therapeutics in Retinal Disease. **Neural Plasticity**, v. 2016, p. 12, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26881135>>. Acesso em: 14 nov. 2018.

KOVACS, F. E.; ILLES, P.; SZABO, B. Purine receptor-mediated endocannabinoid production and retrograde synaptic signalling in the cerebellar cortex. **British journal of pharmacology**, v. 162, n. 4, p. 974–88, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21054344>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

KUBRUSLY, R. C.C. *et al.* Neuro-glial cannabinoid receptors modulate signaling in the embryonic avian retina. **Neurochemistry International**, v. 112, p. 27–37, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018617302280?via%3Dihub#fig5>>. Acesso em: 14 nov. 2018.

LANARO, R. **Determinação de paraquat e glifosato em amostras de Cannabis sativa encaminhadas para exame pericial**. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9141/tde-27112008-154831/>>. Acesso em: 13 nov. 2018.

LU, W.*et al.* The P2Y₁₂ Receptor Antagonist Ticagrelor Reduces Lysosomal pH and Autofluorescence in Retinal Pigmented Epithelial Cells From the ABCA4^{-/-} Mouse Model of Retinal Degeneration. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 242, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29725296>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

LUCA, T.*et al.* The CB1/CB2 receptor agonist WIN-55,212-2 reduces viability of human

Kaposi's sarcoma cells in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v. 616, n. 1–3, p. 16–21, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299909005159?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

MARTINS, R. A.P.; PEARSON, R. A. Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. **Brain Research**, v. 1192, p. 37–60, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899307009808>>. Acesso em: 14 nov. 2018.

MECHOULAM, R. Discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their possible roles in neuroprotection and aggression. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 66, n. 2–3, p. 93–9, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052029>>. Acesso em: 21 nov. 2018.

MECHOULAM, R.; PARKER, L. A. The Endocannabinoid System and the Brain. **Annual Review of Psychology**, v. 64, n. 1, p. 21–47, 2013. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-psych-113011-143739>>. Acesso em: 23 nov. 2018.

MEY, J.; THANOS, S. Development of the visual system of the chick: I. Cell differentiation and histogenesis. **Brain Research Reviews**, v. 32, n. 2–3, p. 343–379, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165017399000223?via%3Dihub>>. Acesso em: 14 nov. 2018.

MOORE, C. S. *et al.* P2Y12 expression and function in alternatively activated human microglia. **Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation**, v. 2, n. 2, p. e80, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25821842>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

NIU, J. *et al.* Activation of dorsal horn cannabinoid CB2 receptor suppresses the expression of P2Y12 and P2Y13 receptors in neuropathic pain rats. **Journal of neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 185, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28899427>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

NUNES, P. H. C. *et al.* Signal transduction pathways associated with ATP-induced proliferation of cell progenitors in the intact embryonic retina. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 8, p. 499–508, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0736574807001268>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

OLIVEIRA, K. L. B.; BRASIL, K. L. **Cannabis sativa: potencial terapêutico**. 2016. Disponível em: <<http://repositorio.saolucas.edu.br:8080/xmlui/handle/123456789/1710>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

PINHO COSTA, J. L. G. *et al.* Neurobiologia da Cannabis: Do sistema endocanabinoide aos transtornos por uso de Cannabis. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 60, n. 2, p. 110–122, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0047-20852011000200006&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 21 nov. 2018..

PRADA, C. *et al.* Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina.

European Journal of Neuroscience, v. 3, n. 6, p. 559–569, 1991. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.1991.tb00843.x>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological reviews**, v. 50, n. 3, p. 413–92, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9755289>>. Acesso em: 1 dez. 2018.

RANG, H. P. **Rang & Dale: farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RIBEIRO, J. A. C. **A cannabis e suas aplicações terapêuticas**. Porto, 2014. Disponível em: <<http://bdigital.ufp.pt/handle/10284/4828>>.

ROBERTO, D.; KLOTZ, L. H.; VENKATESWARAN, V. Cannabinoid WIN 55,212-2 induces cell cycle arrest and apoptosis, and inhibits proliferation, migration, invasion, and tumor growth in prostate cancer in a cannabinoid-receptor 2 dependent manner. **The Prostate**, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pros.23720>>. Acesso em: 5 dez. 2018.

RYBERG, E. et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. **British journal of pharmacology**, v. 152, n. 7, p. 1092–101, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17876302>>. Acesso em: 23 dez. 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**, v. 32, n. SUPPL. 1, p. 57–514, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462010000500004&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 21 nov. 2018.

SANCHES, G.; ALENCAR, L.; VENTURA, A. L. M. ATP induces proliferation of retinal cells in culture via activation of PKC and extracellular signal-regulated kinase cascade. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 21–27, 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0736574802000047>>. Acesso em: 4 dez. 2018.

SCHWITZER, T. et al. The Endocannabinoid System in the Retina: From Physiology to Practical and Therapeutic Applications. **Neural Plasticity**, v. 2016, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/np/2016/2916732/>>. Acesso em: 14 nov. 2018.

SKAPER, S. D.; DEBETTO, P.; GIUSTI, P. P2X(7) Receptors in Neurological and Cardiovascular Disorders. **Cardiovascular psychiatry and neurology**, v. 2009, p. 861324, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029634>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

O’SULLIVAN, S. E. An update on PPAR activation by cannabinoids. **British journal of pharmacology**, v. 173, n. 12, p. 1899–910, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27077495>>. Acesso em: 24 dez. 2018.

TÓTH, A.; BLUMBERG, P. M.; BOCZÁN, J. Chapter 15 Anandamide and the Vanilloid Receptor (TRPV1). *In*: [s.l.: s.n.], 2009, p. 389–419. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0083672909810157>>. Acesso em: 23 dez. 2018.

VALENCIANO, A. I.; BOYA, P.; DE LA ROSA, E. J. Early neural cell death: numbers

and cues from the developing neuroretina. **The International journal of developmental biology**, v. 53, n. 8–10, p. 1515–28, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19247933>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

VENTURA, A. L. M.*et al.* Purinergic signaling in the retina: From development to disease. **Brain Research Bulletin**, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30458250>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

VERGARA, M. N.; CANTO-SOLER, M. V. Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. **Neural Development**, v. 7, n. 1, p. 19, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22738172>>. Acesso em: 15 nov. 2018.

WALTER, L.; DINH, T.; STELLA, N. ATP Induces a Rapid and Pronounced Increase in 2-Arachidonoylglycerol Production by Astrocytes, a Response Limited by Monoacylglycerol Lipase. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 37, p. 8068–8074, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15371507>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

WITTING, A.*et al.* P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 9, p. 3214–3219, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14976257>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

ANEXO A



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

CEUA-UNIRIO Nº 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 Haído
Coordenadora da CEUA-UNIRIO

Dra. Rosa Maria Tavares Haído - PhD
Profª. Associada - MS 0397709

ANEXO B

Molecular Neurobiology
Cannabinoids induce cell death and prime P2X7 receptor signaling in retinal glial progenitors in culture
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MOLN-D-18-01259
Article Type:	Original Article
Keywords:	ATP; endocannabinoid; retina; P2X7 receptor; Müller glia; calcium signaling
Corresponding Author:	Guilherme Raposo Franca, Ph.D Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL
First Author:	Hércules Rezende Freitas, M.Sc.
Order of Authors:	Hércules Rezende Freitas, M.Sc. Alinny Rosendo Isaac, M.Sc. Geyzara Oliveira Ferreira Diniz Yara dos Santos Dabdab Eduardo Cosendey Bockmann Karin da Costa Calaza, Ph.D. Marília Zaluar Passos Guimarães, Ph.D. Ana Lucia Marques Ventura, Ph.D. Fernando Garcia de Mello, M.D., Ph.D. Ricardo Augusto de Melo Reis, Ph.D. Guilherme Raposo Franca, Ph.D.