

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**PAPEL DOS ENDOCANABINOIDES NO
DESENVOLVIMENTO DA RETINA**

BACHARELADO EM PESQUISA CIENTÍFICA: FISIOLOGIA E
FARMACOLOGIA

VICTÓRIA PÔRTO CARUSO

ORIENTADORA: KARIN DA COSTA CALAZA

Niterói
2019

VICTÓRIA PÔRTO CARUSO

PAPEL DOS ENDOCANABINOIDES NO DESENVOLVIMENTO DA RETINA

Trabalho de conclusão de curso submetido à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharel em Biomedicina. Área de concentração: Fisiologia e Farmacologia

Orientadora: Karin da Costa Calaza

NITERÓI

2019

C257p Caruso, Victória Pôrto

Papel dos endocanabinoides no desenvolvimento da retina / Victória Pôrto Caruso ; Karin Calaza, orientadora. Niterói, 2019.

46 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)- Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Niterói, 2019.

1. Endocanabinoides. 2. Retina. 3. Morte celular natural. 4. Desenvolvimento embrionário. 5. Produção intelectual. I. Calaza, Karin, orientadora. II. Universidade Federal Fluminense. Instituto Biomédico. III. Título.

CDD -

VICTÓRIA PÔRTO CARUSO

PAPEL DOS ENDOCANABINOIDES NO DESENVOLVIMENTO DA RETINA

Trabalho de conclusão de curso
submetido à Universidade Federal
Fluminense como requisito parcial para
obtenção do Grau de Bacharel em
Biomedicina. Área de concentração:
Fisiologia e Farmacologia

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Karin da Costa Calaza
Universidade Federal Fluminense

Dr.^a Thayane Martins Silva
Universidade Federal Fluminense

Dr. Ivan Carlos de Luca Domith Gallo
Universidade Federal Fluminense

MSc. Aline Teixeira Duarte Silva
Universidade Federal Fluminense
Doutoranda em Neurociências – Membro Suplente

NITERÓI

2019

Trabalho desenvolvido no laboratório de Neurobiologia da Retina, do Departamento de Neurobiologia – Instituto de Biologia, na Universidade Federal Fluminense sob a orientação da Prof.^a Dr^a Karin da Costa Calaza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Vânia e Marcelo, que me apoiaram desde o começo, de todas as formas possíveis. Mesmo com a distância, foram imensamente presentes, principalmente nos momentos que mais precisei. Agradeço também à minha irmã, Nicole, minha inspiração e principal motivação para essa longa jornada, que também sempre me acolheu com todo carinho, mesmo sem compreender totalmente o que se passava, devido às suas limitações.

À equipe do Laboratório de Neurobiologia da Retina, em especial à minha orientadora, Karin Calaza, pela disponibilidade e pelos conselhos extremamente necessários, e ao Eduardo Bockmann, pela ajuda e paciência ao ensinar as técnicas utilizadas nos experimentos realizados para esse projeto. Agradeço, também, à equipe do Laboratório de Neuroquímica, por disponibilizar a sala de cultura para uso e por todas as discussões produtivas em relação ao projeto.

Agradeço aos integrantes do Grupo Vocal Naipes, que se tornaram grandes amigos ao decorrer destes últimos anos, e me proporcionaram momentos incríveis com muita cantoria, algo que sempre gostei de fazer. Também agradeço à Ana, ao Antonio, ao Rafael, ao Eddie, ao João Pedro, ao João Vitor, ao Gustavo, ao Caio, ao Bernardo, ao Marcos Paulo e à Priscila, amigos com os quais passei meu tempo livre conversando e jogando, sempre com histórias fantásticas e muitas risadas.

Agradeço imensamente ao Vitor Silveira, ao Thiago Morais, à Kátyne Soares e a Wanessa Wegner, que sempre estiveram ao meu lado ao longo desse tempo, e espero que continuem. Vocês são pessoas incríveis e sou muito grata por tê-los por perto.

Sou grata aos meus colegas de curso e ao corpo docente do curso de Biomedicina, que possibilitou a minha chegada e a de muitos outros alunos até aqui, especialmente à professora Luciana Malheiros, que teve um papel crucial na minha formação. À Liga Acadêmica de Neurociências Biomédica, que me proporcionou contato com pessoas incríveis e uma experiência muito enriquecedora. E, por fim, ao Ronald Marques, à Christina Villela, à Nathália Lopes e à Renata Pimentel, da coordenação do curso de Biomedicina, por serem atenciosos e dispostos a ajudar sempre que precisei.

RESUMO

O sistema endocanabinoide já tem sido amplamente estudado como um possível alvo terapêutico para o tratamento de muitas condições patológicas. Vários estudos demonstram a presença de todos os componentes desse sistema na retina assim como a regulação de diferentes funções no tecido maduro. Já é sabido, também, que os principais receptores deste sistema, CB1 e CB2, são encontrados no sistema nervoso central e no periférico, principalmente nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário. Além disso, também há artigos mostrando a presença destes receptores antes mesmo da implantação do embrião em mamíferos. No entanto, há poucos estudos que investigam a função dos endocanabinoides no desenvolvimento das células embrionárias da retina. Porém, estudos recentes demonstram a presença dos componentes do sistema endocanabinoide e ativação de seus receptores controlando fenômenos do desenvolvimento da retina. Desta forma, o objetivo do presente projeto é estudar o papel dos endocanabinoides em fenômenos do desenvolvimento da retina como morte celular e neuritogênese.

Para isso, utilizamos inibidores farmacológicos de enzimas de degradação de endocanabinoides, URB 602 e URB 597. O URB 602 inibe a enzima MAGL, que degrada o endocanabinoide 2-AG, e o URB 597 inibe a enzima FAAH, que degrada a anandamida. Com a inibição destas enzimas, haveria um aumento da disponibilidade destes mediadores químicos e da atividade de seus receptores. Neste estudo, utilizamos culturas de células da retina de embriões de galinha de 8 (E8) dias cultivadas por diferentes tempos (C). Culturas de retina de E8 tratadas com URB 602 (50 e 100 μ M) em E8C1 até E8C4 demonstraram aumento de morte celular, quando comparadas com o grupo controle. Por outro lado, URB597 não induziu morte celular nestas mesmas condições. O tratamento com URB 602 (50 e 100 μ M) em E8C3 até E8C4 não foi capaz de induzir morte celular. Estes dados sugerem que 2-AG, mas não anandamida, pode induzir morte celular em células provenientes de retinas mais imaturas. Porém, retinas mais maduras parecem não sofrer essa regulação.

Palavras-chave: endocanabinoides, retina, desenvolvimento, cultura de células, morte celular.

ABSTRACT

The endocannabinoid system has been widely studied as a therapeutic target for the treatment of many pathological conditions. Many articles showed the presence of all endocannabinoid system's components on retinal cells and the regulation of different mechanisms on a mature tissue. It is already known that the main receptors activated by this system, CB1 and CB2, are found on the central and peripheral nervous system, primarily on early stages of embryonic development. Beyond that, some studies show the presence of these receptors before the embryo's implantation in mammals. However, there are few studies that investigate the endocannabinoids' role on retinal development during embryonic period, although it has been shown that endocannabinoid system's components are present on retinal development and its receptors are activated during these processes. Therefore, the objective of the present study is to learn the endocannabinoid system's role on retinal development phenomena as cell death and neurite genesis.

To achieve that, we used pharmacological inhibitors of endocannabinoid system's degradation enzymes, URB 602 and URB 597. URB 602 inhibits MAGL, a 2-AG degradation enzyme, and URB 597 inhibits FAAH, an anandamide degradation enzyme. Inhibiting these enzymes, we could promote an increased availability of these chemical mediators and an increased receptor activity. On this study, we used retinal cell cultures derived from 8-day chick embryos (E8), cultured on different periods of time (C). An increased cell death was seen on cell cultures treated with URB 602 (50 μ M and 100 μ M) from E8C1 to E8C4, when compared to a control group. Meanwhile, URB 597 had no effect on the same conditions. Treatment with URB 602 (50 μ M and 100 μ M) on E8C3 and maintained until E8C4 didn't induce cell death. This data suggests that 2-AG, but not anandamide, is capable of inducing cell death on immature retinal cells. However, more mature retinal cells apparently aren't affected by this regulation.

Keywords: endocannabinoids, retina, development, cell culture, cell death.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

<i>Figura 1: Esquema representando a organização em camadas da retina.</i>	12
<i>Figura 2: Ocorrência dos eventos de proliferação, morte celular e diferenciação, comparadas entre si.</i>	15
<i>Figura 3: Representação do sistema endocanabinoide em uma sinapse</i>	19
<i>Figura 4: Representação do globo ocular, mostrando a localização dos componentes do sistema endocanabinoide no mesmo.</i>	22
<i>Figura 5: Possíveis papéis dos endocanabinoides no desenvolvimento do SNC</i>	25
<i>Figura 6: Efeitos dos inibidores das enzimas de degradação</i>	28
<i>Figura 7: Doses de inibidores de enzima de degradação efetivas para aumentar 2-AG ou AEA</i>	29
<i>Figura 8: Gráfico da absorbância do MTT para cada grupo estudado, sendo que (A) contém os grupos que foram expostos ao URB 602 e (B), ao URB 597</i>	33
<i>Figura 9: Gráfico da absorbância do MTT para cada grupo estudado</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonoilglicerol
AEA	N-araquidonoil etanolamina ou anandamida
CB1	Receptor canabinoide tipo 1
CB2	Receptor canabinoide tipo 2
CBD	Canabidiol
COX-2	Ciclooxigenase-2
CX	Dia de cultura X
DAG	Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol lipase
diAPC	1,2-sn-di-araquidonoilfosfatidilcolina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMT	Transportador de membrana de endocanabinoide
EX	X dias embrionários
FAAH	Hidrolase de amida de ácidos graxos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLC	Camada de células ganglionares da retina
GPR55	Receptor 55 acoplado à proteína G
INL	Camada nuclear interna da retina
IPL	Camada plexiforme interna da retina
IS/OS	Camada de fotorreceptores da retina
MAGL	Monoacilglicerol lipase
MEM	Meio essencial mínimo
MTT	Brometo tiazolil azul de tetrazólio
NAPE	N-araquidonil fosfatidiletanolamina
NAPE-PLD	N-acil fosfatidiletanolamina-fosfolipase D
NAT	N-acil transferase
ONL	Camada nuclear externa da retina
OPL	Camada plexiforme externa da retina
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PX	X dias pós-natal
RGC	Células ganglionares da retina

RNA	Ácido ribonucleico
RPC	Células progenitoras retiniais
RPM	Epitélio pigmentado da retina
SNC	Sistema nervoso central
THC	Δ^9 -tetrahydrocannabinol
TRPA1	Potencial de receptor transitório anquirina 1
TRPV1-4	Potencial de receptor transitório vanilóide subtipos 1 a 4

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	12
1.1 – RETINA	12
1.2 – DESENVOLVIMENTO DA RETINA	13
1.3 – O SISTEMA ENDOCANABINOIDE	16
1.4 - PRESENÇA DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NA RETINA	19
1.5 – SISTEMA ENDOCANABINOIDE E PATOLOGIAS	22
1.6 – SISTEMA ENDOCANABINOIDE E DESENVOLVIMENTO	23
1.7 – SISTEMA ENDOCANABINOIDE E DESENVOLVIMENTO FETAL	25
1.8 – MODULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA RETINA COM AGONISTAS, ANTAGONISTAS E INIBIDORES DE ENZIMA DE DEGRADAÇÃO DE ENDOCANABINOIDES	27
2 – JUSTIFICATIVA	30
3 – OBJETIVOS	30
3.1 – OBJETIVO GERAL	30
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 – CULTURA DE CÉLULAS	31
4.2 – ENSAIOS DE MTT	32
4.3 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32
5 – RESULTADOS	33
6 – DISCUSSÃO	35
7 – CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – RETINA

A retina é parte do sistema nervoso central com uma estrutura altamente organizada em camadas: camada de epitélio pigmentado, camada de fotorreceptores, membrana limitante externa, camada nuclear externa, camada plexiforme externa, camada nuclear interna, camada plexiforme interna, camada de células ganglionares, camada de fibras ópticas e membrana limitante interna (Figura 1). Este tecido contém cinco tipos gerais de neurônios: células fotorreceptoras (cones e bastonetes), células horizontais, células bipolares, células amácrinas e células ganglionares. A principal célula glial é a célula de Müller, mas há também microglia e, em retinas vascularizadas, astrócitos na camada de fibras ópticas (BERNE; LEVY, 2009).

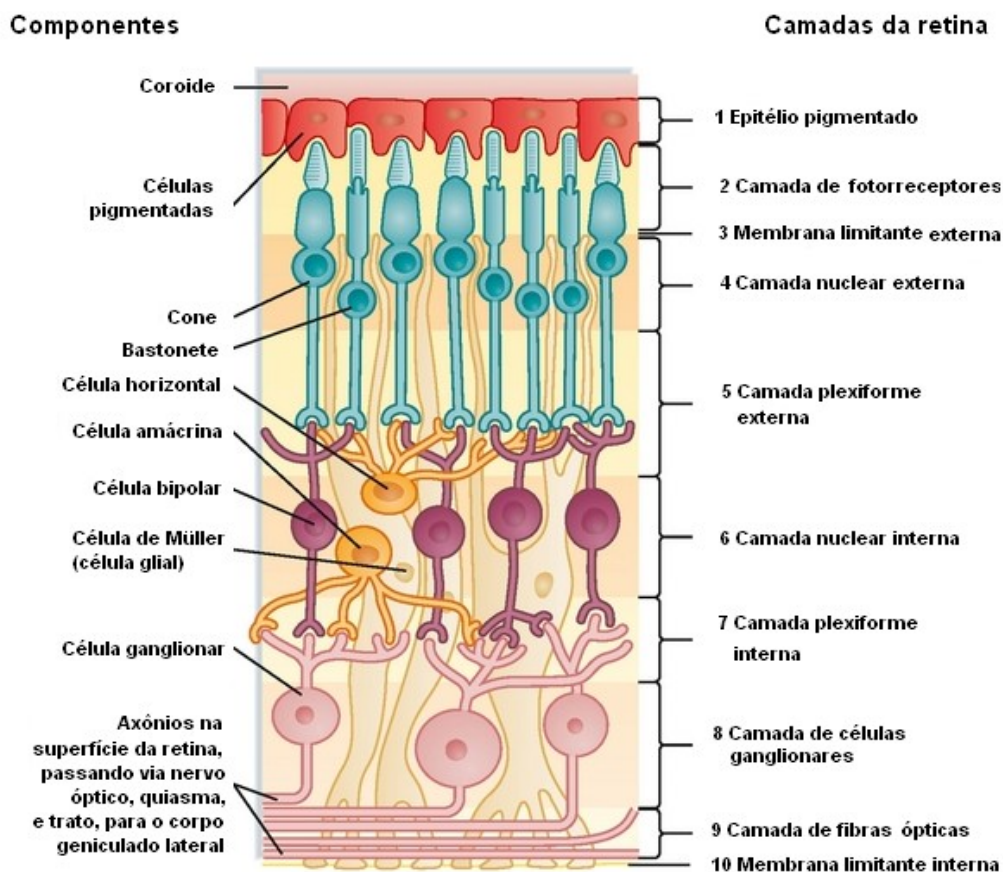


Figura 1: Esquema representando a organização em camadas da retina. Traduzido e modificado de Berne e Levy, 2009.

A transdução do sinal na retina, pela via radial, ocorre da seguinte forma: as células fotorreceptoras, na camada mais externa, absorvem a luz e a convertem em um sinal neural (fototransdução). Estes sinais são transmitidos às células bipolares, que formam sinapses, também, com as células ganglionares, localizadas em uma camada mais interna. Seus axônios, por sua vez, formam o nervo óptico. Além desta via, há diversas conexões laterais, fornecidas pelas células horizontais na camada plexiforme externa e pelas células amácrinas na camada plexiforme interna. Desta forma, fotorreceptores, células bipolares e células ganglionares formam a via radial de transmissão da informação, enquanto células horizontais e amácrinas integram a via horizontal, principalmente inibitória, que modula a via radial, entre outros processos (KANDEL *et al.*, 2014).

1.2 – DESENVOLVIMENTO DA RETINA

A retina é formada a partir do diencefalo, portanto é um tecido de origem no sistema nervoso central. Durante a morfogênese do tecido, a ocorrência de eventos como migração celular, proliferação e morte celular é controlada minuciosamente, de forma molecular, e requer a participação de diferentes vias de sinalização. Uma proliferação excessiva de células, seguida pela eliminação do excedente, é uma estratégia comum quando padrões complexos, como a conectividade neural, devem ser gerados em populações celulares cujos números não podem ser especificados precisamente pelo genoma (VECINO; ACERA, 2015). Este processo ocorre por meio de morte celular programada, de forma que sejam atingidas as proporções corretas entre cada tipo celular encontrado na retina (MARTINS; PEARSON, 2008). Fatores intrínsecos e extrínsecos, combinados, determinam o destino celular e fazem com que as células progenitoras retiniais (RPCs) passem por sucessivos e distintos estados de competência para a geração ordenada de diferentes tipos celulares (XIANG, 2013).

Primeiramente, elas passam por uma série de divisões celulares, aumentando o número de células no conjunto de progenitores, antes que elas saiam do ciclo celular e se diferenciem. Como se trata da geração de tipos celulares diferentes, que são originados em uma ordem característica, a proliferação e a saída do ciclo celular devem ser reguladas precisamente, equilibrando os números das RPCs que saem do ciclo celular para produzir os primeiros tipos celulares, e os números das que continuarão proliferando

para, posteriormente, dar origem aos tipos celulares que são gerados por último (MARTINS; PEARSON, 2008). As células ganglionares são as primeiras a saírem do ciclo celular, seguidas das células amácrinas, cones, células horizontais, e bastonetes. As células bipolares e as células gliais são as últimas a saírem do ciclo celular (FAN *et al.*, 2016).

Durante os estágios iniciais do desenvolvimento, fatores solúveis ou associados à membrana podem enviar, às células progenitoras, sinais que regulam positivamente genes que favorecem a continuação no ciclo celular, ou sinais que regulam negativamente genes que induzem a saída do ciclo celular. Assim, a atividade mitótica é diretamente promovida. Posteriormente, conforme as células saem do ciclo celular e se diferenciam, elas podem passar a produzir fatores que favorecem a saída do ciclo celular ou que diminuam a continuação da atividade mitótica (DYER; CEPKO, 2001). Um estudo demonstrou que as células são responsivas a fatores extrínsecos, como gradientes de morfogênios, determinando o tipo celular a ser gerado. A fase S do ciclo celular é uma das fases na qual são vistas estas respostas (GOMER; AMMANN, 1996).

No caso específico da retina, já foi mostrado que as células amácrinas e os cones podem ser regulados por sinais extrínsecos. Além disso, as propriedades intrínsecas das RPCs tem a capacidade de influenciar o destino celular, pois as RPCs podem variar em relação à sua expressão gênica. Neste caso, os tipos celulares retiniais aos quais elas dão origem também variarão (BELLIVEAU; CEPKO, 1999).

Pode-se afirmar que, ao longo do processo de desenvolvimento, a proporção de células em proliferação diminui, enquanto o número de células diferenciadas aumenta. Há um processo de morte celular natural onde células mortas são rapidamente removidas do tecido pela microglia ou células vizinhas. Como estas mudanças ocorrem simultaneamente, é difícil determinar especificamente o papel da morte celular na proliferação ou na diferenciação. O uso da retina como modelo de estudo para este processo facilita o entendimento do mesmo, além de não ocorrer migração celular não tangencial nesta região (SANTOS *et al.*, 2008). Um estudo demonstrou que a morte celular foi mais prevalente que a geração neuronal durante os estágios iniciais do desenvolvimento da retina (em galinhas, aproximadamente de E3.5 a E4, e, em camundongos, de E14.5 a E15.5). Além disso, também foi visto que cerca de 50% do número de células ganglionares da retina (RGCs) morrem após serem geradas. Desta forma, a morte de células neuronais está intrinsecamente associada à geração de RGCs e ao desenvolvimento neural, se tratando, portanto, de um processo participante do

desenvolvimento (CHAVARRÍA *et al.*, 2013). A figura abaixo mostra alguns processos que ocorrem durante o desenvolvimento, de forma comparada e simultânea, enfatizando a importância da morte celular durante este período (Figura 2).

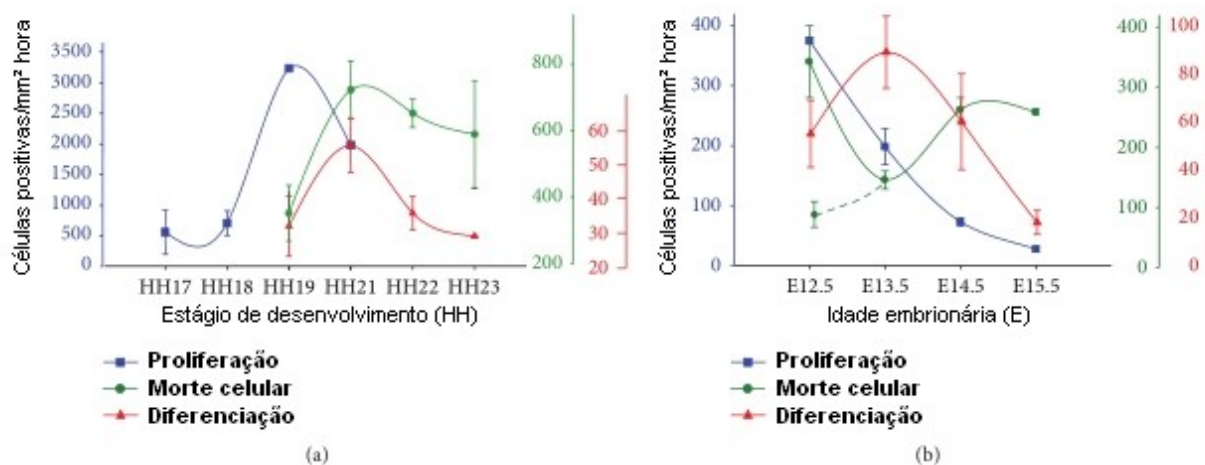


Figura 2: Ocorrência dos eventos de proliferação, morte celular e diferenciação, comparadas entre si, em embriões de galinha (a) e de camundongo (b). O estágio de desenvolvimento em embriões de galinha varia entre HH17 (E2.5) e HH23 (E4). A linha de proliferação foi obtida com marcação para BrdU, a de morte celular com marcação para TUNEL e a de diferenciação com marcação para Islet1/2. A linha pontilhada na imagem (b) indica a magnitude do processo de morte celular após a subtração dos núcleos positivos para TUNEL associados à fissura óptica, o que possui um papel importante na morfogênese. Adaptado e traduzido de Chavarría *et al.*, 2013.

Outros trabalhos já demonstraram a funcionalidade de culturas de células de embriões de galinha para estudar fenômenos relacionados ao desenvolvimento, como a síntese de óxido nítrico. Este composto desempenha importantes papéis na regulação da liberação de neurotransmissores e em eventos que ocorrem no desenvolvimento, como proliferação e morte celular. O estudo em questão avaliou a disponibilidade de L-arginina, um precursor de óxido nítrico, em culturas de células de retina de embriões de galinha. Dentre as culturas utilizadas, havia culturas mistas (ou seja, que continham neurônios e células gliais), derivadas de embriões com 8 dias de idade embrionária (E8), e foi observado que, 6 dias após o plaqueamento, as células gliais proliferaram e formaram uma camada plana na qual os neurônios estavam agregados com neuritos em desenvolvimento (COSSENZA; PAES DE CARVALHO, 2001).

Há crescentes evidências de que, no desenvolvimento da retina de vertebrados, sistemas de neurotransmissores modulam a proliferação de RPCs (MARTINS; PEARSON, 2008). Além destes, foi proposto que os endocanabinoides, neuromoduladores que estão sendo cada vez mais compreendidos, possuem um

importante papel em diferentes fases do desenvolvimento (GALVE-ROPERH *et al.*, 2006). Estas substâncias são frequentemente associadas aos canabinoides exógenos, representados pelos principais compostos ativos da maconha (*Cannabis sativa*), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) e canabidiol (CBD) (HARKANY *et al.*, 2007).

1.3 – O SISTEMA ENDOCANABINOIDE

Após milênios de uso da *Cannabis*, tanto recreativa quanto medicinal, a substância foi classificada em 1970 como uma droga de classe 1, junto à heroína, LSD e metanfetamina, e, portanto, foi considerado que a substância não possui valor medicinal e, ao mesmo tempo, possui propriedades que podem gerar uma forte dependência (YAZULLA, 2008). No entanto, já há na literatura uma gama grande de artigos mostrando que o uso está longe de ser tão perigoso quanto o do álcool, por exemplo (BASTOS *et al.*, 2017). Além disso, a *Cannabis* e seus derivados já vêm sendo utilizados na clínica para diminuição da pressão intraocular, alívio de dor, de náusea e estimulação de apetite, entre outras patologias (MAURYA; VELMURUGAN, 2018; FREEMAN *et al.*, 2019).

O primeiro composto ativo identificado na *C. sativa* foi o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC). Também conhecido como dronabinol, ele produz alguns efeitos benéficos, como analgesia, estimulação de apetite, redução de náusea e redução da pressão intraocular, além de afetar a fertilidade, por interferir no eixo hipotalâmico-hipofisário (BRENTS, 2016), memória de curto prazo e coordenação motora (IVERSEN, 2003). O canabidiol (CBD) foi identificado posteriormente como um segundo composto ativo, sendo ele e o THC os principais compostos ativos encontrados na *C. sativa*. O THC e alguns canabinoides sintéticos mimetizam substâncias endógenas como endocanabinoides, que compõem um sistema de neuromodulação recentemente descoberto (YAZULLA, 2008).

O THC atua em receptores específicos do sistema endocanabinoide, sendo os principais os receptores canabinoides tipo 1 e tipo 2 (CB1 e CB2, respectivamente). Eles são estimulados, em condições fisiológicas normais, por dois principais ligantes endógenos: N-araquidonoil etanolamina ou anandamida (AEA), e 2-araquidonoilglicerol (2-AG). (SCHWITZER *et al.*, 2016).

Diferentemente de neurotransmissores solúveis em água, AEA e 2-AG são altamente lipofílicos e não são armazenados em vesículas sinápticas. Em vez disso, fosfolipídeos de membrana são metabolizados “sob demanda”: quando necessária a

produção de endocanabinoides, há um aumento do influxo de cálcio, causando a liberação de AEA ou 2-AG por fosfolipases cálcio-dependentes (YAZULLA, 2008). O fosfolípido de membrana precursor da AEA é a N-araquidonoil fosfatidil etanolamina (NAPE), formada pela transferência de ácido araquidônico da substância 1,2-sn-di-araquidonoilfosfatidilcolina (diAPC) para uma fosfatidiletanolamina, e esse processo é catalisado pela enzima N-aciltransferase (NAT) dependente de cálcio. A principal via de formação da anandamida ocorre quando a NAPE é hidrolisada por uma fosfolipase D específica (NAPE-PLD), liberando AEA e ácido fosfatídico (DI MARZO *et al.*, 1994).

Enquanto isso, a principal via de formação do 2-AG parece envolver a hidrólise de diacilgliceróis (DAG) por duas isozimas diacilglicerol lipase (DAGL α e β). Os DAGs podem ser produzidos a partir de um fosfatidil inositol, hidrolisado pela fosfolipase C, ou a partir da hidrólise de ácido fosfatídico, por meio de uma fosfohidrolase. Além disso, essas enzimas incorporam outros ácidos graxos em fosfolípidos de membrana, que, desta forma, tornam-se precursores de outros endocanabinoides, como a N-palmitoil etanolamina e a oleoletanolamina (BISOGNO *et al.*, 2005).

A liberação de endocanabinoides a partir dos fosfolípidos é realizada, então, devido ao aumento de cálcio intracelular, levando a uma ativação de fosfolipases cálcio-dependentes. Este aumento é causado por despolarização e, conseqüentemente, influxo dos canais de cálcio, também podendo ser causado pela ativação de receptores pós-sinápticos associados à proteína Gq, ou mesmo uma combinação destes dois fenômenos (OHNO-SHOSAKU *et al.*, 2005). No entanto, ainda não é claro como os endocanabinoides saem da porção lipídica da membrana uma vez que sejam liberados, ou como eles chegam à parte aquosa dos tecidos, considerando que estas substâncias são altamente lipofílicas. Como a AEA se liga de forma reversível à albumina sérica, supõe-se que este processo seja crucial para o transporte de AEA e mesmo do 2-AG pelo sangue, pela matriz extracelular e pelo citoplasma (BOJESEN; HANSEN, 2003).

O nível celular destes ligantes é regulado por diversas enzimas, especialmente a monoacilglicerol lipase (MAGL), hidrolase de amida de ácidos graxos (FAAH) e a ciclooxigenase-2 (COX-2). Este sistema exerce um importante papel na regulação da neurotransmissão no sistema nervoso central (SNC). Como a retina possui a mesma origem embriológica do SNC, ela possui propriedades similares ao mesmo, sugerindo que os endocanabinoides possuem ação no processamento visual, precocemente e tardiamente (SCHWITZER *et al.*, 2016).

A FAAH é uma proteína integral de membrana, com seu sítio hidrolítico voltado para a bicamada lipídica. A COX-2 é estruturalmente similar, enquanto a MAGL é uma enzima citosólica. Um dos motivos pelos quais é difícil determinar transportadores de membrana para a AEA é o fato de que a maior parte das drogas utilizadas para bloquear a recaptação de AEA também inibem sua hidrólise pela FAAH, além de sua estrutura fazer com que seja difícil determinar se as drogas estão agindo em um transportador ou na própria enzima (YAZULLA, 2008).

AEA e 2-AG são hidrolisadas pela FAAH em ácido araquidônico e etanolamina ou glicerol, respectivamente. A MAGL hidrolisa o 2-AG de forma similar, mas não possui ação sobre a AEA. Desta forma, estas são as principais enzimas de degradação de endocanabinoides. Vale ressaltar que a MAGL é a principal enzima de degradação do 2-AG, enquanto a FAAH é a principal enzima de degradação da AEA (SAARIO *et al.*, 2004; DEUTSCH; CHIN, 1993). A COX-2 oxida ácido araquidônico, AEA e 2-AG em substâncias que, posteriormente, se tornam prostaglandinas biologicamente ativas (YU *et al.*, 1997; KOZAK *et al.*, 2000).

Os efeitos dos endocanabinoides no SNC são mediados por receptores metabotrópicos e ionotrópicos. Os receptores canabinoides tipo 1 (CB1) são os mais numerosos no cérebro, enquanto os receptores canabinoides tipo 2 (CB2) são encontrados principalmente nas células do sistema imune, mas são encontrados no sistema nervoso particularmente em astrócitos (PERTWEE; ROSS, 2002). Foi estabelecido que os efeitos psicoativos da *Cannabis sativa* são primariamente mediados por receptores CB1 e suas propriedades terapêuticas são primariamente mediados por receptores CB2 (MACKIE; STELLA, 2006). Além disso, dois outros sistemas de receptores aparentemente também são ativados por endocanabinoides, sendo eles o receptor de potencial transitório vanilóide subtipos 1 a 4 (TRPV1-V4), o receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) e o GPR55, um receptor órfão associado à proteína G (KOKONA *et al.*, 2016). Abaixo, há um esquema contendo os mecanismos citados (Figura 3).

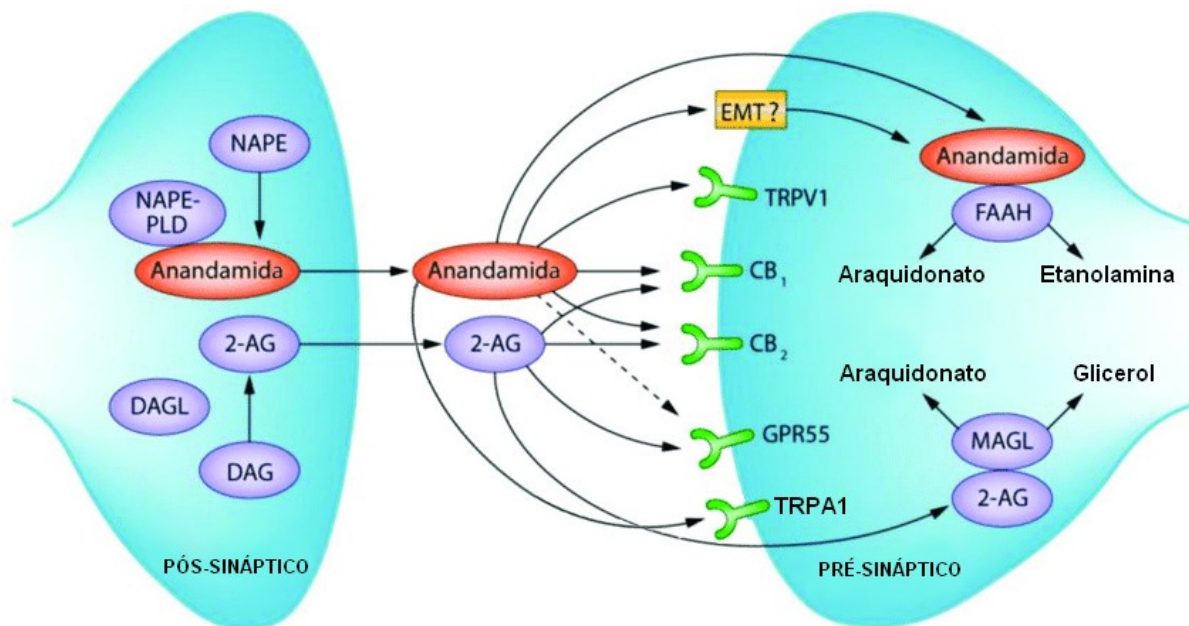


Figura 3: Representação do sistema endocanabinoide em uma sinapse, mostrando a ativação dos receptores CB₁, CB₂, GPR55 e TRPV1 pelos dois principais endocanabinoides, 2-AG e anandamida. É mostrada também a formação do 2-AG a partir da degradação do diacilglicerol pela diacilglicerol lipase, e a da anandamida, a partir da degradação da N-araquidonil fosfatidiletanolamina (NAPE) pela N-ácil fosfatidiletanolamina-fosfolipase D (NAPE-PLD). Além disso, pode-se observar a degradação do 2-AG pela enzima MAGL em araquidonato e glicerol, e a degradação da anandamida pela enzima FAAH em araquidonato e etanolamina. Já foi mostrado, também, que a anandamida pode ativar o receptor TRPA1 de maneira eficaz, além de possuir baixa potência micromolar assim como o ácido araquidônico, sendo estes os dois únicos endocanabinoides sobre os quais foi descrita uma relação com o receptor TRPA1 (Muller et al., 2019). Há controvérsias em relação à presença do transportador de membrana de endocanabinoide (EMT), e por isso há um ponto de interrogação na indicação da mesma (Figura adaptada e traduzida de Zhou et al., 2019).

1.4 - PRESENÇA DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NA RETINA

No SNC, o sistema endocanabinoide possui um papel central em diversos tipos de sinapses. Como o receptor CB₁ está presente, principalmente, em neurônios pré-sinápticos, este pode agir como um mecanismo regulatório para a liberação de neurotransmissores como glutamato e GABA. No entanto, no SNC como um todo e, particularmente, na retina, é comum identificar receptores endocanabinoides em terminais pós-sinápticos, indicando a complexidade deste sistema (KUBRUSLY *et al.*, 2018).

Com estudos imunohistoquímicos, foi detectada a presença e a localização do receptor CB₁ em neurônios da retina em diversas espécies animais. Na retina de camundongo, por exemplo, uma circuitaria específica do sistema endocanabinoide foi definida, realizando a colocalização do receptor CB₁ e de um repertório de proteínas que influenciam o sistema endocanabinoide. Além disso, foi detectada a expressão do mRNA

do receptor CB2 na retina de camundongos adultos. Já nas células de epitélio pigmentado da retina humana foi detectado o mRNA e a proteína em si. Também foram realizados estudos imunohistoquímicos em retinas de ratos e camundongos para embasar a presença do receptor CB2 na retina (KOKONA *et al.*, 2016; MULLER *et al.*, 2019).

A presença de receptores do sistema endocanabinoide na retina de embriões de galinha já foi descrita desde o quinto dia embrionário (E5) e a expressão se mantém alta até o dia pós-natal 7 (P7), havendo uma diminuição da expressão ao longo do desenvolvimento. Estes receptores estão localizados, predominantemente, nas células ganglionares e amácrinas da retina. Tais células se encontram, respectivamente, na camada de células ganglionares e na camada nuclear interna. O receptor CB2 também foi encontrado durante este período e é claramente observado na laminação da camada plexiforme interna. Além disso, a enzima MAGL, responsável pela degradação do endocanabinoide 2-AG, está presente em todas as camadas da retina de embriões de galinha, principalmente na camada plexiforme interna e na camada de células ganglionares, a partir do nono dia embrionário (E9). Foi vista colocalização desta enzima com o antígeno glial 2M6. No caso do receptor CB1, foi vista colocalização com neurônios dopaminérgicos (DA SILVA SAMPAIO *et al.*, 2018).

Ainda na retina, foi observada a expressão de ambos os receptores nas células de Müller. A ativação destes com WIN 55,212-2, um agonista para CB1 e CB2, diminui os níveis de AMP cíclico, reduz o transporte de íons cálcio nas células de Müller ativadas por ATP e reduz a liberação de GABA de neurônios, seja em condições basais ou estimuladas por ácido aspártico. Os mesmos resultados foram vistos durante um período de sinaptogênese. Isto é condizente com o resultado de um estudo, que observou a colocalização dos receptores CB1 com a sinaptofisina, um marcador pré-sináptico, nestes mesmos animais, principalmente nas camadas plexiforme interna e na camada de células ganglionares, a partir do décimo quarto dia embrionário (E14). A enzima FAAH também é detectada no dia pós-natal 1 (P1) em gânglios e células amácrinas colinérgicas. Ela é expressa de forma transiente, sugerindo uma redistribuição durante o desenvolvimento pós-natal e um importante papel nos processos de desenvolvimento em geral. No entanto, não há estudos avaliando o papel dos endocanabinoides ou de seus receptores na formação de sinapses entre neurônios da retina (KUBRUSLY *et al.*, 2018).

A presença dos receptores CB1 e CB2 na retina foi investigada nas camadas plexiformes interna e externa, assim como nas camadas nucleares interna e externa. Também foram analisadas as células amácrinas, ganglionares, bipolares, horizontais,

fotorreceptores e o epitélio pigmentado. O CB1 também foi encontrado em áreas cerebrais como o tálamo e o córtex, áreas conhecidas pela influência no *output* visual, além de ter sido encontrado no seio venoso escleral, na malha trabecular e no corpo ciliar, assim como o CB2 (STRAIKER *et al.*, 1999).

Já foi demonstrada, também, a presença do receptor TRPV1 e de outras subunidades TRP em nível de RNA mensageiro e em nível proteico, em retinas de mamíferos e não mamíferos. O TRPV1 pode ter um papel importante na porção mais interna da retina, visto que não foi detectado em fotorreceptores (RYSKAMP *et al.*, 2014). O GPR55 só foi detectado nos segmentos internos das retinas de macaco, sugerindo um papel na visão escotópica. Foram realizados eletroretinografias na presença de antagonistas de receptores CB1 e CB2 e foi sugerido que a sinalização proveniente de endocanabinoides modula a resposta retinal. Além disso, estas substâncias também estão relacionadas à neurotransmissão na retina, visto que pode modular a liberação de neurotransmissores como dopamina, noradrenalina, GABA e glutamato, controlando a atividade sináptica e modulando a resposta visual (KUBRUSLY *et al.*, 2018; RAPINO *et al.*, 2018).

Os principais endocanabinoides, 2-AG e AEA, assim como a N-palmitoiletanolamina, seu congênere, foram quantificados em tecidos oculares de humanos, utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foi demonstrado que o 2-AG está presente em maior quantidade do que a AEA em condições fisiológicas na retina humana, proporção que pode mudar em alguns quadros patológicos (RAPINO *et al.*, 2018).

A expressão da FAAH é notável em diferentes camadas da retina, desde a camada plexiforme externa até a camada de células ganglionares, e sua atividade é maior em bastonetes, células bipolares, células horizontais, células amácrinas, células ganglionares e na glia de Muller. (BISOGNO *et al.*, 1999) A NAPE-PLD foi identificada na retina de roedores e de outros mamíferos, e a presença de RNAs mensageiros da DAGL e da MAGL foi documentada na retina de ratos (RAPINO *et al.*, 2018). A DAGL é expressada nos terminais pós-sinápticos de cones bipolares e a MAGL nas camadas plexiforme interna e plexiforme externa (HU *et al.*, 2010).

A figura abaixo indica uma visão geral de onde cada elemento do sistema endocanabinoide está presente na retina (Figura 4).

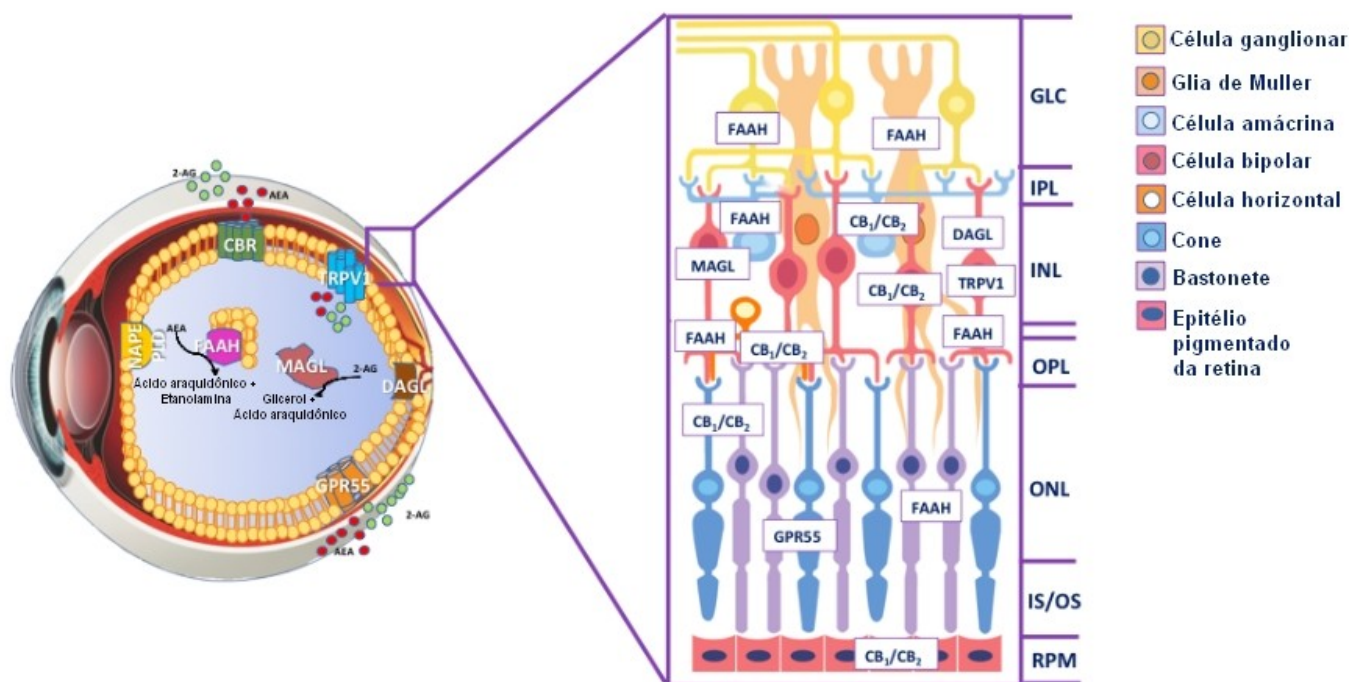


Figura 4: Representação do globo ocular, mostrando a localização dos componentes do sistema endocanabinoide no mesmo. Ao lado, representação da organização em camadas da retina, indicando cada tipo celular presente em cada camada, assim como uma visão global da localização de cada elemento do sistema endocanabinoide na retina. GLC, camada de células ganglionares; IPL, camada plexiforme interna; INL, camada nuclear interna; OPL, camada plexiforme externa; ONL, camada nuclear externa; IS/OS, camada de fotorreceptores; RPM, epitélio pigmentado da retina. Adaptado e traduzido de Rapino et al., 2018.

1.5 – SISTEMA ENDOCANABINOIDE E PATOLOGIAS

Como os endocanabinoides possuem um importante papel na cognição e no controle de emoções, está sendo investigada a possibilidade de uma abordagem terapêutica para depressão e ansiedade, por exemplo, relacionada ao controle do sistema endocanabinoide. Isto é sustentado pois, em pacientes depressivos, as expressões de AEA e 2-AG estão alteradas, assim como a expressão do receptor CB1. Além disso, já foi visto que agonistas endocanabinoides induzem efeitos antidepressivos e ansiolíticos-like em animais de laboratório e em humanos (GALVE-ROPERH *et al.*, 2009).

Há um número de estudos que indicam o envolvimento do sistema endocanabinoide com a morte celular de células ganglionares da retina e no controle da pressão intraocular modulando a produção e drenagem do humor aquoso. Portanto, moléculas que podem interagir ou interferir com os mecanismos deste sistema podem ser úteis no tratamento de glaucoma, por meio da redução da pressão intraocular e pelos

efeitos neuroprotetores (MERRITT *et al.*, 1980). AEA foi proposta como uma substância útil na investigação da terapia para glaucoma, pois ela diminui significativamente a pressão intraocular em coelhos normotensos, pigmentados e albinos. No entanto, ainda não se sabe como este efeito hipotensivo é gerado por este composto (MAURYA; VELMURUGAN, 2019). Além disso, já foi sugerido que o fumo e a administração de doses definidas de THC ou de Cannabis melhora a visão noturna e este mecanismo é mediado pelo sistema endocanabinoide na retina (RUSSO *et al.*, 2004).

O receptor CB1 está envolvido na contração de músculos ciliares bovinos, enquanto seus agonistas, como AEA, produz uma resposta contrátil dependente de concentração no mesmo músculo, via fosfolipase C. Isto indica que o receptor CB1 também está envolvido na modulação da pressão intraocular e que seus agonistas podem agir como agentes antiglaucomatosos (LOGRANO; ROMANO, 2004). Outro estudo mostrou que concentrações anormais de CBD e N-araquidonil glicina fazem com que a vasoconstrição das arteríolas retiniais seja inibida, por meio da inibição da endotelina-1. Desta forma, diferentes canabinoides produzem diferentes efeitos antiglaucomatosos (QIAN *et al.*, 2017).

Os efeitos dos canabinoides em casos de retinose pigmentar não foram muito estudados até então. Aparentemente, a progressão da doença parece ter um retardo quando é administrado o agonista canabinoide HU210 (LAX *et al.*, 2014). Já foi mostrado que os níveis de 2-AG e de AEA são altos em retinas afetadas por retinopatia diabética e degenerações maculares relacionadas à idade (CHEN *et al.*, 2005), enquanto em pacientes com glaucoma, a retina possui níveis reduzidos de 2-AG e de PEA, sem mudanças nos níveis de AEA (MATIAS *et al.*, 2006).

1.6 – SISTEMA ENDOCANABINOIDE E DESENVOLVIMENTO

Há evidências da presença do sistema endocanabinoide durante o desenvolvimento neural. O envolvimento deste sistema na regulação da plasticidade neural, por exemplo, reside em sua função neuromodulatória, já que o receptor CB1 exerce um amplo papel regulatório em diversos tipos de sinapses. Além disso, a sinalização por endocanabinoides está envolvida em processos neurogênicos (proliferação neuronal, diferenciação e maturação) (FREITAS *et al.*, 2019) e na

manutenção e sobrevivência de células neurais diferenciadas (GALVE-ROPERH *et al.*, 2009)

Uma hibridização *in situ* em embriões de galinha mostrou que, durante o desenvolvimento, o receptor CB1 começa a ser expresso no rombencéfalo assim que os primeiros neurônios começam a se desenvolver, e posteriormente é encontrado também no sistema nervoso periférico e em outras populações neurais, sendo também encontrado no mesoderma. Além disso, ele não é encontrado apenas em neurônios, visto que o receptor é encontrado também no prosencéfalo, que não produz neurônios em um primeiro momento do desenvolvimento. No entanto, a expressão do receptor em neurônios diminui em estágios mais avançados do desenvolvimento, sugerindo que seu papel é mais notório no início deste processo (BUKIYA, 2019).

Os níveis de AEA e 2-AG variam substancialmente durante o desenvolvimento pré-natal. Inicialmente (entre quatro e seis dias de gestação em camundongos), as concentrações de AEA no útero definem a receptividade dele para a implantação do embrião. De acordo com isso, uma redução transitória dos níveis uterinos de AEA, aliado a coincidente *downregulation* da expressão dos receptores CB1 e CB2 no embrião ainda não implantado determinam o início da receptividade uterina e da ativação do blastocisto, desta forma permitindo a implantação (PARIA *et al.*, 2001).

A princípio, baixas concentrações de AEA estão presentes no cérebro no meio da gestação. Seus níveis gradualmente aumentam ao longo do período pré-natal até serem atingidos os níveis encontrados em adultos. Notavelmente, as concentrações de 2-AG são maiores do que as de AEA durante o desenvolvimento cerebral. Em ratos, os níveis de 2-AG fetais são similares àqueles encontrados em cérebros jovens e adultos, com um pico característico no primeiro dia após o nascimento (HARKANY *et al.*, 2007).

Enquanto isso, o receptor CB2 parece ter um papel importante na formação das vias visuais, principalmente possuindo influência no desenvolvimento das células ganglionares da retina *in vitro* e em explantes de retina. A ativação deste receptor modula os níveis de AMP cíclico (AMPC), o que resulta numa modificação na área de crescimento dos cones e no número de filopódios. Além disso, foi visto que houve uma diminuição no desenvolvimento dos axônios da retina ao ser feito um tratamento com um agonista do receptor CB2, enquanto o efeito contrário foi observado com o tratamento utilizando um agonista inverso do mesmo receptor. A proteína DCC (*Deleted in colorectal cancer*) codifica o receptor de netrina, uma molécula que funciona como *guidance cue* de longa distância, orientando a formação de axônios em desenvolvimento por meio de atração e

repulsão (KEINO-MASU *et al.*, 1996). Foi visto, também, que esta proteína é necessária para que o receptor CB2 modifique a área de crescimento dos cones. *In vivo*, o receptor CB2 modula o tamanho das projeções das células ganglionares da retina e induz projeções aberrantes. Em sua ausência, há alteração na segregação específica dos olhos. Desta forma, o receptor CB2 possui um importante papel na formação de axônios e, conseqüentemente, na formação de sinapses (DUFF *et al.*, 2013).

A figura abaixo indica alguns dos papéis dos endocanabinoides durante o desenvolvimento do SNC e suas concentrações (Figura 5).

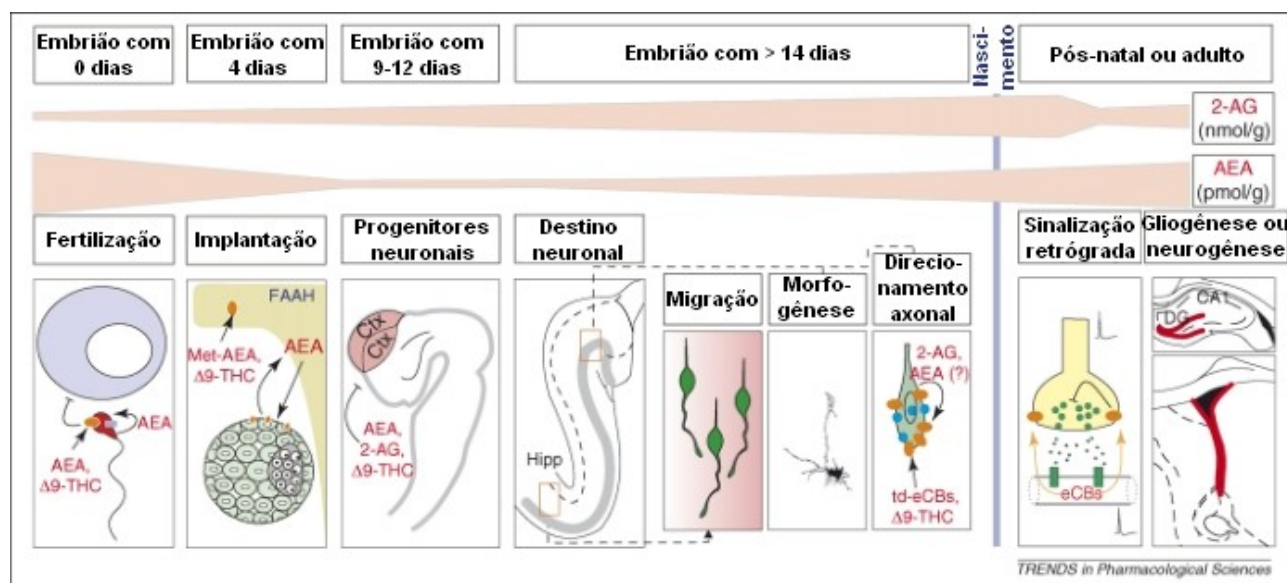


Figura 5: Possíveis papéis dos endocanabinoides no desenvolvimento do SNC. A porção superior indica as concentrações dos dois principais endocanabinoides encontrados, 2-AG e AEA, ao longo do tempo. As concentrações de 2-AG, em geral, são maiores do que as quantidades de AEA no cérebro em desenvolvimento. A porção inferior da figura indica alguns dos principais eventos da embriogênese, que são regulados pela sinalização por meio do receptor CB1. Apenas as ações de endocanabinoides conhecidos e do THC são mostradas. O termo td-eCBs se refere a endocanabinoides derivados de alvos, potencialmente liberados de células-alvo pós-sinápticas putativas durante o direcionamento axonal. Vale ressaltar que o evento de morte celular, apesar de fazer parte do desenvolvimento do SNC, não consta na figura, pois as ações dos endocanabinoides neste evento são pouco exploradas até o momento (Adaptado e traduzido de Harkany *et al.*, 2007).

1.7 – SISTEMA ENDOCANABINOIDE E DESENVOLVIMENTO FETAL

O uso de *C. sativa* por pacientes grávidas parece ter efeitos prejudiciais na formação do feto, sugerindo uma influência negativa dos princípios ativos da *Cannabis* no período embrionário (FRIED; SMITH, 2001). Há evidências de que, neste caso, ocorre uma perturbação na sinalização de receptores CB1, impedindo sua distribuição

adequada, temporalmente e espacialmente, quando se trata do desenvolvimento de neurônios corticais no feto (DE SALAS-QUIROGA *et al.*, 2015). Pode-se observar, considerando este estudo e os demais citados, que, mesmo possuindo efeitos deletérios no período embrionário, o aumento da ativação do receptor CB1, no sistema nervoso de um adulto, leva à clássica função de neuromodulação. Portanto, o ocorrido nos filhos de gestantes usuárias de *Cannabis* é uma consequência da perturbação ocorrida na sinalização fisiológica do receptor CB1 durante o período pré-natal, quando a atividade sináptica ainda não está totalmente estabelecida. Desta forma, os efeitos de um canabinoide exógeno em adultos são diferentes dos efeitos provocados, pelas mesmas substâncias, em embriões e em fetos (YAZULLA, 2008; DE SALAS-QUIROGA *et al.*, 2015; GREWEN *et al.*, 2015).

Um estudo recente indicou que 48-60% das usuárias de *Cannabis* continuou o uso durante a gravidez, por acreditarem que é seguro o uso mesmo neste caso já que se trata de uma droga pouco citada em campanhas que promovem a saúde durante a gravidez (MOORE *et al.*, 2010). No entanto, um estudo avaliou a associação entre natimortos a partir de 20 semanas de gestação e o uso de tabaco e drogas ilícitas, e, apesar da influência do cigarro de tabaco, o THC foi associado, em humanos, ao aumento da probabilidade de uma criança nascer morta (VARNER *et al.*, 2014). Além disso, também foram percebidos a diminuição do tamanho da cabeça e do peso em crianças que sofreram exposição pré-natal ao THC. Foi verificada, também, uma maior incidência de anencefalia em descendentes de usuárias da *Cannabis*, mas isto pode ter ocorrido pela exposição ao THC decorrente dos canabinoides exógenos ou pela tendência de usuários da *C. sativa* a não realizar suplementação de ácido fólico. Além disso, é possível perceber, na infância, que o desenvolvimento cerebral foi afetado: estas crianças obtinham menores pontuações em testes de solução de problemas visuais, coordenação visual-motora, e análises visuais, em comparação a crianças que não foram expostas à *C. sativa*. No entanto, tais efeitos podem ser influenciados, também, pela exposição a outras drogas, lícitas e ilícitas, e pela preexistência de condições socioeconômicas adversas (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS COMMITTEE ON OBSTETRIC PRACTICE, 2015).

Esta exposição à canabinoides exógenos, durante o período pré-natal, é frequentemente associada às disfunções cognitivas e neurocomportamentais. Foi mostrado que o THC é capaz de atravessar a placenta e a barreira hematoencefálica, podendo se ligar aos receptores CB1. Em neonatos expostos à *C. sativa*, foram

encontradas reduções nas conexões funcionais entre o núcleo caudado e o cerebelo, assim como nas que ocorrem entre a ínsula anterior esquerda e o cerebelo. Há uma redução, também, nas conexões funcionais entre a porção direita do núcleo caudado e as regiões occipital e fusiforme, quando comparados a neonatos não expostos à *C. sativa*. Tais efeitos foram considerados específicos da maconha (GREWEN *et al.*, 2015). Vale ressaltar que os endocanabinoides e os fitocanabinoides podem ser passados para o neonato através do leite (BATTISTA *et al.*, 2014). Conseqüentemente, a exposição pré-natal à canabinoides exógenos pode provocar alterações pós-natal na atividade locomotora, função cognitiva e comportamento emocional, frequentemente percebidos em crianças e adolescentes que sofreram este tipo de exposição (WILLFORD *et al.*, 2010; FRIED E SMITH, 2001), e pode, também, aumentar a susceptibilidade ao uso de drogas psicoativas por parte destes indivíduos na idade adulta, já que se tratam de regiões associadas ao vício (VOLKOW; BALER, 2015).

Isto condiz com o fato de que um sistema endocanabinoide corretamente regulado é crucial nos primeiros estágios da gravidez em mamíferos. É necessária uma sincronização do desenvolvimento embrionário com a receptividade uterina para a implantação para haver a manutenção de uma gravidez viável. Este papel é percebido em todos os estágios desta sincronização, desde a preparação do embrião para a implantação até a formação da placenta. Neste último caso, o receptor CB1 possui um papel essencial e mais perceptível do que o CB2. Isto é reforçado pela presença do receptor CB1 a partir do estágio de quatro células de um embrião, e pela presença do receptor CB2 a partir do estágio de uma célula (zigoto). Portanto, é possível dizer que a comunicação adequada entre os sistemas endocanabinoides da mãe e do embrião é essencial para o desenvolvimento do embrião antes mesmo de sua implantação (BUKIYA, 2019).

1.8 – MODULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA RETINA COM AGONISTAS, ANTAGONISTAS E INIBIDORES DE ENZIMA DE DEGRADAÇÃO DE ENDOCANABINOIDES

Em contraste à *Cannabis*, que contém agonistas e antagonistas canabinoides, os canabinoides sintéticos são notoriamente diferentes em relação à seletividade, potência e função. Se tratando de agonistas canabinoides, por exemplo, em geral os sintéticos são mais potentes e eficazes que o THC. O WIN 55,212-2 é um exemplo destas substâncias

(COHEN; WEINSTEIN, 2018). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que os efeitos farmacológicos dos canabinoides sintéticos são de 2 a 100 vezes mais potentes que o THC (CASTANETO *et al.*, 2014).

Já foi demonstrado que o composto URB 602, um inibidor não-competitivo da enzima MAGL, aumenta os níveis de 2-AG em culturas de prosencéfalos de ratos, mas não altera os níveis de AEA. Em contrapartida, o composto URB 597, um inibidor da enzima FAAH, aumenta os níveis de AEA nestas mesmas culturas, porém o URB 602 não possui este efeito. Portanto, há evidências de que a inibição das enzimas de degradação do sistema endocanabinoide aumentam a concentração de endocanabinoides em culturas de células, de forma que a inibição da MAGL tem como consequência o aumento de 2-AG e a inibição da FAAH tem como consequência o aumento de AEA (MAKARA *et al.*, 2005). A figura abaixo demonstra o efeito do URB 602, URB 597 e URB 754 (um potente inibidor da MAGL, com efeito similar ao do URB 602) nas culturas mencionadas (Figura 6).

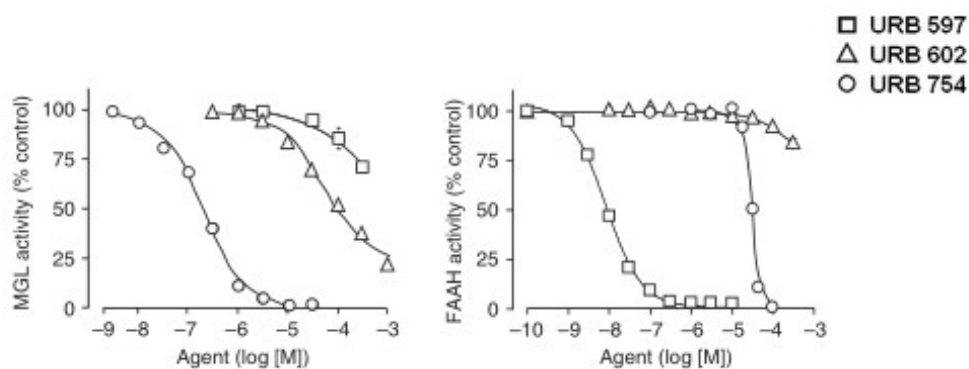


Figura 6: Efeitos dos inibidores das enzimas de degradação. À esquerda, são mostrados os efeitos do URB 754 (círculos), do URB 602 (triângulos) e do URB 597 (quadrados) na redução da atividade da MAGL. À direita, são mostrados os efeitos dos mesmos compostos na redução de atividade da FAAH. Quanto maior a concentração, mais perceptível é o efeito do URB 754 e do URB 602 na inativação da MAGL, e o efeito do URB 597 na inativação da FAAH. Modificado de Makara *et al.*, 2005.

Um estudo recente avaliou se o agonista de receptores canabinoides CB1 e CB2 WIN modulava a proliferação, viabilidade, e respostas relacionadas ao íon cálcio em progenitores retiniais de embriões de galinha. Foi visto que este agonista, assim como os inibidores enzimáticos URB 602 e URB 597, diminuam a incorporação de timidina, detectada pela administração de timidina tritiada ($[^3\text{H}]$ -timidina). Além disso, o WIN também reduziu o número de células positivas para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), sugerindo que a ativação dos receptores CB1 e CB2 inibe a proliferação de progenitores retiniais *in vitro*. Os efeitos do URB 602 são mais notórios do que os do

URB 597, sendo possível teorizar que, neste caso, o endocanabinoide 2-AG possui uma influência maior nas culturas de progenitores retiniais de embriões de galinha. A morte celular aqui sugerida foi relacionada apenas a estes receptores, e não ao TRPV ou ao GPR55, por exemplo, que também fazem parte do sistema endocanabinoide (FREITAS *et al.*, 2019). Logo, é visto um contraste em relação à administração de canabinoides exógenos em situações patológicas, nas quais ocorre neuroproteção mediada por eles.

Já foi mostrado que a dose de 100 μ M de URB 602 é suficiente para elevar a concentração de 2-AG nas culturas, enquanto a dose de 1 μ M de URB 597 já é suficiente para elevar a concentração de AEA (Figura 7; MAKARA *et al.*, 2005).

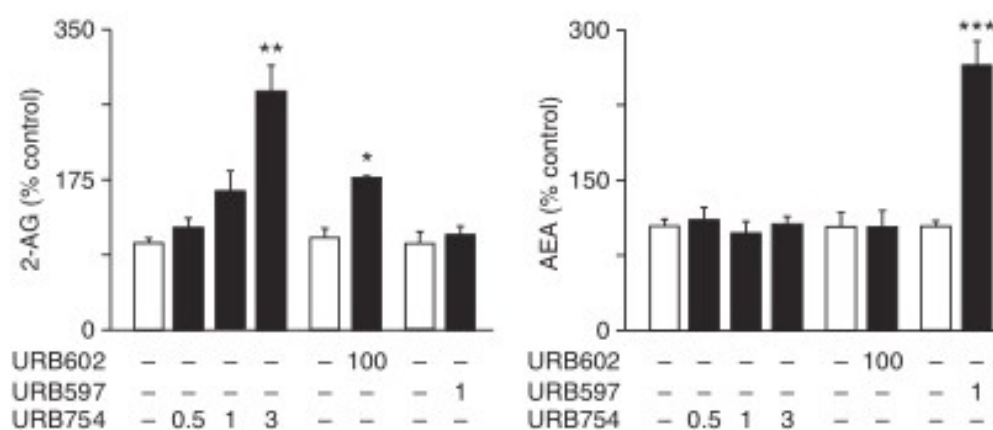


Figura 7: Doses de inibidores de enzima de degradação efetivas para aumentar 2-AG ou AEA. À esquerda, é mostrado que o URB 602 na concentração de 100 μ M aumenta significativamente os níveis de 2-AG em culturas de prosencéfalo de ratos, enquanto o URB 597 não possui este efeito em nenhuma das concentrações utilizadas. No entanto, o URB 597 na concentração de 1 μ M aumenta significativamente os níveis de anandamida nas mesmas culturas, enquanto o URB 602 não possui este efeito em nenhuma das concentrações utilizadas. O URB 754 não foi utilizado neste estudo, mas se trata, também, de um inibidor da MAGL, de forma similar ao URB 602. Modificado de Makara *et al.*, 2005.

Além disso, um estudo sugere que o WIN 55,212-2, além de agir no receptor CB1, age também no receptor TRPA1, de forma que a eficácia da neuroproteção relacionada aos endocanabinoides seja determinada pela interação destes receptores (KOCH *et al.*, 2011). Os antagonistas endocanabinoides AM251 e AM630 aparentemente possuem efeitos em respostas mediadas por TRPA1 e TRPV1, principalmente em neurônios sensoriais (PATIL *et al.*, 2011), reforçando que tais drogas, quando administradas, possuem efeito nos receptores do sistema endocanabinoide, e, assim, é válida a realização de experimentos utilizando-os.

Portanto, há evidências de que o sistema endocanabinoide está presente nas células da retina, e modula o desenvolvimento da mesma, podendo ser deletério caso esteja em concentrações acima das fisiologicamente encontradas. Neste estudo, visa-se compreender a atuação e os efeitos causados por este sistema, primeiramente, na morte celular, buscando compreender os receptores envolvidos nesta. Futuramente, pretende-se investigar a influência do sistema endocanabinoide na neuritogênese e na sinaptogênese das células da retina, para a compreensão da influência deste sistema especificamente durante os processos citados.

2 – JUSTIFICATIVA

Há evidências da presença de todos os componentes do sistema canabinoide na retina. Há também estudos demonstrando que o sistema canabinoide tem um papel na regulação das conexões funcionais entre diversas áreas do sistema nervoso, sendo que, quando a ação do sistema está exacerbada (como no caso do uso de canabinoides exógenos), é observado um comprometimento dos circuitos em formação. Isto é notado em relação a ambos os principais receptores envolvidos no sistema, CB1 e CB2 (GREWEN *et al.*, 2015; DUFF *et al.*, 2013).

Desta forma, é importante caracterizar de forma mais detalhada o papel deste sistema e de seus impactos no desenvolvimento embrionário da retina, melhor elucidando sua função neste período e averiguando seus efeitos durante o mesmo.

3 – OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel dos endocanabinoides na morte celular na retina.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar se há morte celular proveniente do aumento dos endocanabinoides em culturas de células de embriões, utilizando drogas inibidoras das enzimas de degradação de endocanabinoides;

Avaliar os receptores envolvidos na morte induzida por endocanabinoides;

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo, foram utilizados ovos contendo embriões de galinha (*Gallus gallus domesticus*), mantidos em uma incubadora a 37°C, até o dia que atingissem a idade embrionária adequada para a realização do estudo. Foram utilizados embriões de 8 dias de idade (E8). Os procedimentos estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da SBCAL, sob o protocolo número (820/2018).

4.1 – CULTURA DE CÉLULAS

Os ovos foram abertos para eutanásia dos embriões por decapitação, com a utilização de pinças, e as células da retina foram retiradas para a realização da cultura, sendo desprezado o restante do embrião. As células foram deixadas em uma solução de 1 mL de tripsina e 1 mL de CMF em banho maria a 37°C por cerca de 15 minutos para dissociação química. Após isso, a solução de tripsina e CMF foi retirada do recipiente, para ser colocado o meio de cultura. Desta forma, foi realizada a dissociação mecânica com a pipeta dentro do recipiente. Posteriormente, as células foram contadas para que todos os poços contivessem a mesma densidade celular (1 milhão de células por poço). Foram usadas placas que continham 24 poços, e cada poço recebia 0,5 mL de meio, contendo a quantidade desejada de células. As placas foram deixadas na estufa a 37,5°C e a 5% de CO₂.

O tratamento era feito no dia seguinte, junto com a troca de meio. Este era feito com URB 602, um inibidor da hidrólise de 2-AG, ou URB 597, um inibidor seletivo da enzima FAAH, que degrada, principalmente, a anandamida. Desta forma, supõe-se que há acúmulo de 2-AG e anandamida nas células *in vitro*, caracterizando um agonismo para os receptores CB1 e CB2. As placas ou poços recebiam DMSO (grupo controle), URB 602 ou URB 597 em diferentes doses, caracterizando uma curva de concentração. As doses utilizadas, inicialmente, foram de 1, 10, 50 e 100 µM para URB 602 e de 0,01, 0,1 e 1 µM para URB 597. Após o primeiro experimento utilizando estas drogas, foi decidido não utilizar a concentração de 100 µM para URB 602, devido ao fato de o resultado encontrado com a concentração de 50 µM ser semelhante.

As culturas eram, então, colocadas em um dessecador de vidro, mantido a temperatura de 37,5°C em um ambiente a 5% CO₂. No caso de embriões E7, a

imunocitoquímica era realizada no dia seguinte ao tratamento. Já no caso de embriões E8, os ensaios de MTT eram realizados três dias após o tratamento. O controle utilizado para o URB 602 recebeu 5 µL de DMSO e o controle utilizado para o URB 597 recebeu 0,5 µL de DMSO, pois estas foram as quantidades utilizadas para aplicar a maior concentração de cada uma das drogas.

4.2 – ENSAIOS DE MTT

Nos experimentos mais recentes, foram feitos ensaios de MTT para determinar a quantidade de células vivas em cada grupo, determinando se houve ou não morte celular nos grupos tratados. Esta substância permite, a partir da intensidade da cor observada em cada poço, determinar a atividade metabólica geral presente nas células de cada um dos poços. Para realizar o procedimento, foram pesados 4 mg de MTT, que foram diluídos em 1,33 mL de água MilliQ, de forma que a concentração atingida foi de 3 mg/mL de MTT em água MilliQ. Esta solução foi mantida em banho-maria a 37°C até a hora de seu uso. As culturas foram retiradas da estufa e o meio de cultura foi retirado. Posteriormente, foram feitas duas lavagens com 200 µL, por poço, de MEM HEPES pH 7,4. Após a retirada da segunda lavagem, foram adicionados 300 µL de MEM HEPES pH 7,4 e, junto a isso, 50 µL da solução de MTT em água MilliQ, em cada poço. A placa, então, era deixada em banho-maria a 37°C por uma hora e meia. Depois, a placa era retirada, e o conteúdo dos poços também. Foram adicionados 300 µL de solução ácido-alcoólica (HCL 6:1000 de álcool isopropílico) em cada poço e foi feita a homogeneização do conteúdo com a pipeta.

Ao final do processo, cada poço da placa de 24 poços continha cerca de 200 µL de conteúdo. Este material foi transferido para uma placa de 96 poços, de forma que cada poço da nova placa tivesse 100 µL de conteúdo. Logo, cada poço da placa de 24 poços equivaleria a dois poços na placa de 96 poços.

A nova placa, então, era levada a um leitor de microplacas (ELISA), para ser feita uma leitura em 550/660 nm, obtendo valores numéricos. Estes valores foram escolhidos devido à tonalidade arroxeada que o MTT assume após a reação ocorrida. Quanto mais intensa a cor detectada, maior a atividade mitocondrial nas células analisadas.

4.3 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram colocados em planilhas utilizando o programa Excel, e, então, foram montados gráficos utilizando o Prisma. Foi realizado ONE-WAY ANOVA por meio do Prisma para determinar significância, $p < 0,05$ considerado significativo.

5 – RESULTADOS

Foram realizados três ensaios de MTT com resultados conclusivos, utilizando culturas de células de embriões de galinha de 8 dias (E8): neles, foi observado que os grupos que receberam URB 602 nas concentrações de 50 μM e 100 μM apresentaram uma menor absorvância do MTT em relação ao grupo controle, indicando que mais células sofreram morte celular com este tratamento. Os demais grupos não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle (Figura 8). Neste caso, o tratamento foi feito no primeiro dia de cultura (C1), e a placa foi deixada na estufa durante os 3 dias seguintes, de modo que, no quarto dia de cultura (C4), era feito o ensaio de MTT.

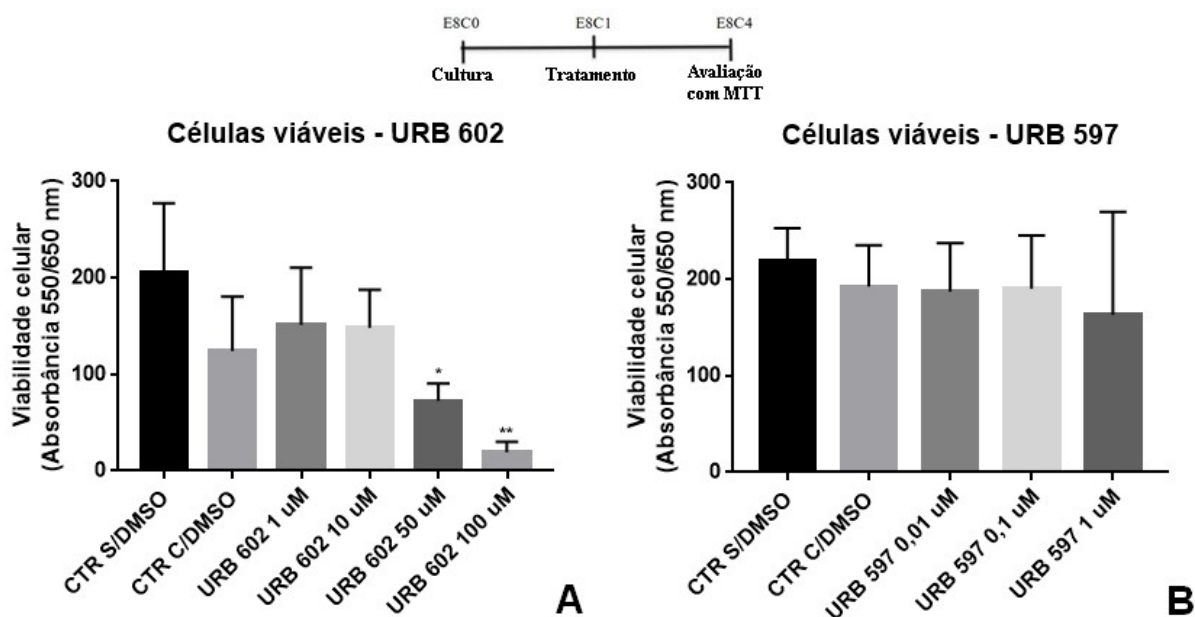


Figura 8: Gráfico da absorvância do MTT para cada grupo estudado, sendo que (A) contém os grupos que foram expostos ao URB 602 e (B), ao URB 597. A exposição ao URB 602 em concentrações a partir de 50 μM induz a redução da viabilidade celular, sugerindo a ocorrência de morte celular nestas culturas. Não foi vista diferença significativa entre os grupos controle e os grupos expostos às concentrações de 1 μM e 10 μM . A exposição ao URB 597 também não possuiu efeito significativo ($n=3$).

Após a obtenção destes resultados, observamos os efeitos do URB 602 e do URB 597 em um momento diferente do crescimento das células *in vitro*: a cultura foi

realizada da mesma forma que vista anteriormente, em uma placa contendo 24 poços; no entanto, houve apenas troca de meio no dia seguinte ao plaqueamento, e a cultura foi deixada na estufa até dois dias depois da troca de meio. O tratamento foi realizado da mesma forma, porém, excluindo o tratamento com URB 602 na concentração de 100 μM , já que, quando nesta dose, pouquíssimas células sobrevivem. Foi feito o ensaio de MTT no dia seguinte ao tratamento e observou-se a perda do efeito de morte celular anteriormente visto quando as células eram expostas a uma alta concentração de URB 602, sugerindo que este efeito depende da idade das células *in vitro*. O URB 597 não provoca efeito significativo, assim como no experimento anterior (Figura 9).

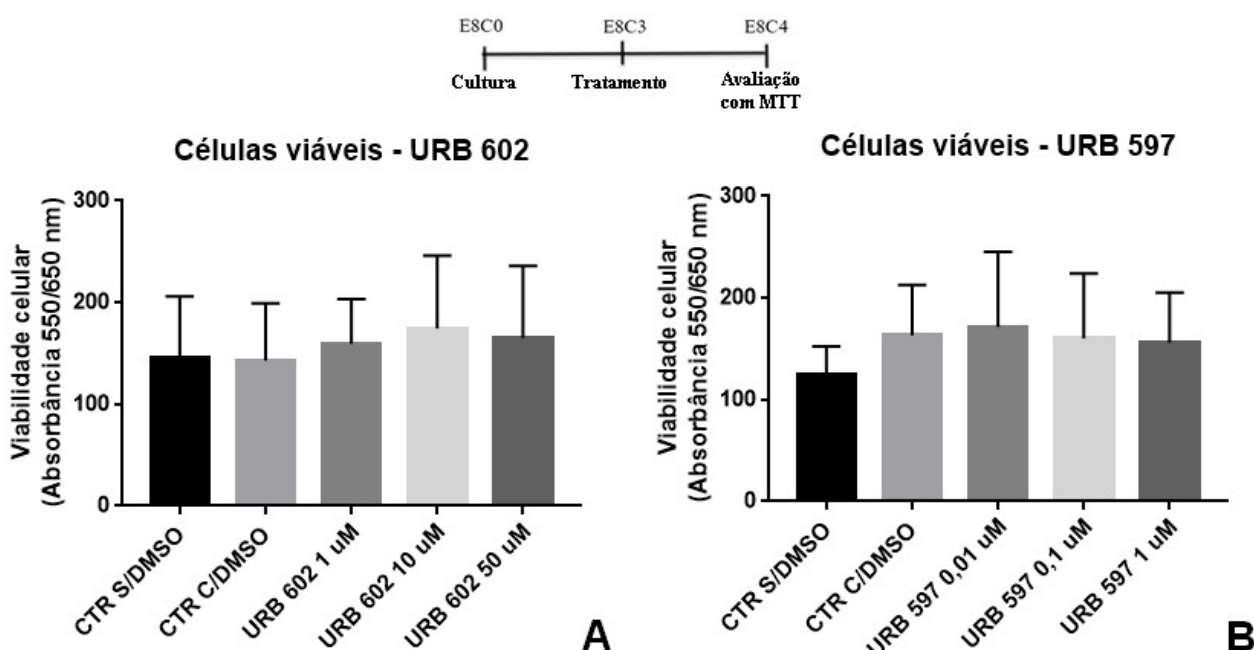


Figura 9: Gráfico da absorbância do MTT para cada grupo estudado, sendo que (A) contém os grupos que foram expostos ao URB 602 e (B), ao URB 597. Vale ressaltar que, diferentemente do experimento anterior, a exposição ao URB 602, mesmo na concentração de 50 μM , aparentemente não induz morte celular. Considerando que trataram-se de culturas tratadas após três dias do plaqueamento, estes resultados sugerem que o efeito de morte celular causado pela inibição da MAGL é dependente da idade na qual as células se encontram. A exposição ao URB 597 não possui efeito significativo ($n=3$).

No momento, planeja-se utilizar os antagonistas de receptores endocanabinoides CB1 e CB2, AM251 e AM630, para verificar se há bloqueio do efeito de morte celular observado e facilitar a identificação dos receptores envolvidos com este efeito.

6 – DISCUSSÃO

Os endocanabinoides são moléculas capazes de regular uma série de eventos durante e após o desenvolvimento do sistema nervoso central. Estudos anteriores demonstraram, também, a eficácia do uso de inibidores de enzimas de degradação e de canabinoides sintéticos na modulação do sistema endocanabinoide. Utilizando estes mecanismos, o presente estudo tem como finalidade elucidar o papel dos endocanabinoides no desenvolvimento da retina, sendo o enfoque inicial o fenômeno de morte celular.

Para atingir este objetivo, foram realizadas culturas de células retiniais de embriões de galinha com 8 dias embrionários (E8). De acordo com os resultados apresentados, a inibição farmacológica da enzima MAGL em culturas que estão nos estágios iniciais de desenvolvimento, utilizando URB 602, induz morte celular, enquanto em culturas mais desenvolvidas não se observa o mesmo efeito. Em relação à inibição farmacológica da FAAH por meio da exposição à URB 597, não foram vistas alterações significativas em relação ao grupo controle em nenhum dos protocolos de cultura de células utilizados.

Pode-se supor que a inibição farmacológica da MAGL e da FAAH aumenta os níveis de 2-AG e AEA, respectivamente (MAKARA *et al.*, 2005). Desta forma, o aumento de 2-AG induziria morte celular em culturas de células mais jovens, enquanto o aumento de AEA não surtiria efeito comparado às células não tratadas.

Já foi demonstrado, também, que a expressão do receptor CB1 em neurônios diminui ao longo do desenvolvimento, de forma que, no início deste processo, a expressão deste receptor seja mais exacerbada do que em estágios mais avançados (BUKIYA, 2019). Vale ressaltar que os receptores CB1 são os mais presentes no SNC, enquanto os receptores CB2 são mais encontrados em células do sistema imune (PERTWEE; ROSS, 2002). Este também pode ser um motivo pelo qual o efeito de morte celular ocorre de forma mais intensa em culturas mais jovens. Além disso, os níveis de 2-AG durante o desenvolvimento fetal de ratos são maiores do que os de AEA, aumentando as evidências de que este endocanabinoide possui uma maior influência no desenvolvimento do SNC e, conseqüentemente, alterações em seus níveis poderão influenciar o desenvolvimento de forma mais notória do que alterações nos níveis de AEA (HARKANY *et al.*, 2007).

Em relação aos canabinoides sintéticos, o WIN, assim como a maior parte destes compostos, é mais efetivo e mais potente em comparação aos fitocanabinoides, como o

THC. (COHEN; WEINSTEIN, 2018; CASTANETO *et al.*, 2014). É possível, portanto, que este composto possua um efeito mais exacerbado do que o 2-AG em si, mesmo em níveis aumentados, como no caso do estudo em questão. Já foi visto, também, que esta substância age no receptor TRPA1. A interação entre a atividade deste receptor com a dos receptores CB1 e CB2 pode ser a responsável pelo efeito final da ação do WIN, o que pode incluir ações neuroprotetoras como as observadas nos casos patológicos (KOCH *et al.*, 2011). De acordo com os resultados obtidos, a idade das células afetadas poderá ser um dos fatores que determina se haverá neuroproteção ou morte celular.

Outro fator que corrobora para esta ideia é de que efeitos deletérios já foram percebidos no desenvolvimento fetal, quando estes eram expostos à canabinoides exógenos. Uma das razões propostas para isto é a perturbação na sinalização dos receptores CB1, comprometendo o desenvolvimento de neurônios corticais (DE SALAS-QUIROGA *et al.*, 2015). As consequências deste evento são observadas já na infância, pois são observadas alterações na atividade locomotora, função cognitiva e comportamento emocional, podendo gerar, também uma maior susceptibilidade ao uso de drogas durante a juventude e a vida adulta (WILLFORD *et al.*, 2010; FRIED; SMITH, 2001; VOLKOW; BALER, 2015). Foi possível perceber também que estas crianças obtinham menores pontuações em testes de solução de problemas visuais, coordenação visual-motora, e análises visuais, em comparação a crianças que não foram expostas à *C. Sativa*, o que pode ser um indício de que houve um distúrbio na formação das vias visuais (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS COMMITTEE ON OBSTETRIC PRACTICE, 2015). Há um estudo mostrando, também, uma associação entre natimortos e o uso de *Cannabis* realizado pelas gestantes (VARNER *et al.*, 2014). É possível propor que o sistema endocanabinoide possui um equilíbrio delicado e deve ser corretamente regulado, especialmente nos primeiros estágios da gravidez (BUKIYA, 2019).

Enquanto isso, no SNC de adultos, ocorre neuromodulação, como no caso de tratamentos vistos para ansiedade e depressão. Nestes casos, os níveis de endocanabinoides estão alterados, assim como os dos receptores CB1, e o tratamento com canabinoides sintéticos ou exógenos interfere com tais níveis, podendo levá-los à normalidade (GALVE-ROPERH *et al.*, 2009). Se tratando, especificamente, da retina, foi visto que os níveis de 2-AG e AEA eram altos em situações de retinopatia diabética e degenerações maculares relacionadas à idade, enquanto em pacientes com glaucoma, a

retina possui níveis reduzidos apenas de 2-AG, justificando uma possível influência dos endocanabinoides nestas situações (CHEN *et al.*, 2005; MATIAS *et al.*, 2006).

Ainda em casos de glaucoma, muitos estudos já demonstraram a eficácia do uso de canabinoides para reduzir a pressão intraocular (MAURYA; VELMURUGAN, 2018; FREEMAN *et al.*, 2019; BRENTS, 2016), além de evidências de que o receptor CB1 está envolvido nessa modulação e que seus agonistas podem agir como agentes antiglaucomatosos (LOGRANO; ROMANO, 2004). Desta forma, são observados, também, efeitos neuroprotetores e neuromoduladores.

É notório que os efeitos de um canabinoide exógeno ou sintético em adultos são diferentes dos efeitos provocados, pelas mesmas substâncias, em embriões e em fetos (YAZULLA, 2008; DE SALAS-QUIROGA *et al.*, 2015; GREWEN *et al.*, 2015). Pode-se fazer uma analogia com os resultados obtidos pelo presente estudo: enquanto culturas de células mais jovens, contendo alta quantidade de progenitores retiniais, são muito afetadas pelo aumento dos níveis de 2-AG, culturas mais desenvolvidas e, conseqüentemente, com menos progenitores retiniais, são mais resistentes aos efeitos da alteração das doses de 2-AG que seriam encontradas fisiologicamente.

7 – CONCLUSÃO

Conclui-se que o tratamento de culturas de células retiniais de embriões de galinha de 8 dias (E8) com URB 602 terá efeitos diferentes dependendo da idade e do nível de desenvolvimento da cultura. Se o tratamento for realizado precocemente, a morte celular observada tenderá a ser maior, devido à maior presença de progenitores de células retiniais e à maior susceptibilidade do receptor CB1 à mudanças nos níveis de 2-AG. Enquanto isso, um tratamento realizado tardiamente não provocará morte celular de forma significativa, visto que os números de progenitores retiniais será menor em culturas mais desenvolvidas e o sistema endocanabinoide como um todo estará mais desenvolvido. Vale ressaltar que este efeito é visto, também, ao se comparar fetos e adultos humanos, não só no SNC como um todo, mas também quando se trata especificamente da retina. Propõe-se que a morte celular de células retiniais mediada por endocanabinoide possui um fator idade-dependente.

REFERÊNCIAS

American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Obstetric Practice. **Committee Opinion No. 637.** *Obstetrics & Gynecology*, v. 126, n. 1, p. 234–238, 2015.

BASTOS, F.I.P.M. *et al.* (Org.). **III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ/ICICT, 528 p. 2017.

BATTISTA, N.; SERGI, M.; MONTESANO, C.; NAPOLETANO, S. *et al.* **Analytical approaches for the determination of phytocannabinoids and endocannabinoids in human matrices.** *Drug Test Anal.* v. 6, n. 1-2, p. 7-16, 2014.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. **Fisiologia.** 6. ed. Guanabara Koogan, 2009.

BELLIVEAU, M.J.; CEPKO, C.L. **Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina.** *Development.* v. 126, n. 3, p. 555-66, 1999.

BISOGNO, T.; DELTON-VANDENBROUCKE, I; MILONE, A. *et al.* **Biosynthesis and inactivation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) and N-docosahexaenylethanolamine in bovine retina.** *Arch Biochem Biophys.* v. 370, n. 2, p. 300-7, 1999.

BISOGNO, T.; LIGRESTI, A.; DI MARZO, V. **The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects.** *Pharmacol Biochem Behav.* v. 81, n. 2, p. 224-38, 2005.

BOJESEN, I.N.; HANSEN, H.S. **Binding of anandamide to bovine serum albumin.** *J Lipid Res.* v. 44, n. 9, p. 1790-4, 2003.

BRENTS, L.K. **Marijuana, the Endocannabinoid System and the Female Reproductive System.** *Yale J Biol Med.* v. 89, n. 2, p. 175–191, 2016.

BUKIYA, A.N. **Physiology of the Endocannabinoid System During Development.** *Adv Exp Med Biol.* v. 1162, p. 13-37, 2019.

CASTANETO, M.S.; GORELICK, D.A.; DESROSIERS, N.A. *et al.* **Synthetic Cannabinoids: Epidemiology, Pharmacodynamics, and Clinical Implications.** *Drug Alcohol Depend.* v. 144, p. 12-41, 2014.

COHEN, K.; WEINSTEIN, A.M. **Synthetic and Non-synthetic Cannabinoid Drugs and Their Adverse Effects-A Review From Public Health Prospective.** *Front Public Health.* v. 6, p. 162, 2018.

CHAVARRÍA, T.; BALERIOLA, J.; MAYORDOMO, R. *et al.* **Early neural cell death is an extensive, dynamic process in the embryonic chick and mouse retina.** *ScientificWorldJournal.* v. 2013, ID 627240, 2013.

CHEN, J.; MATIAS, I.; DINH, T. *et al.* **Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma.** *Biochem Biophys Res Commun.* v. 330, n. 4, p. 1062-7, 2005.

COSSENZA, M.; PAES DE CARVALHO, R. **L-arginine uptake and release by cultured avian retinal cells: differential cellular localization in relation to nitric oxide synthase.** *J Neurochem.* v. 74, n. 5, p. 1885-94, 2000.

DA SILVA SAMPAIO, L.; KUBRUSLY, R.C.C; COLLI, Y.P. *et al.* **Cannabinoid Receptor Type 1 Expression in the Developing Avian Retina: Morphological and Functional Correlation With the Dopaminergic System.** *Front Cell Neurosci.* v. 12, p. 58, 2018.

DE SALAS-QUIROGA, A; DÍAZ-ALONSO, J; GARCÍA-RINCÓN, D. *et al.* **Prenatal exposure to cannabinoids evokes long-lasting functional alterations by targeting CB1 receptors on developing cortical neurons.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* v.112, n. 44, p. 13693–13698, 2015.

DEUTSCH, D.G.; CHIN, S.A. **Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist.** *Biochem Pharmacol.* v. 46, n. 5, p. 791-6, 1993.

DI MARZO, V.; FONTANA, A.; CADAS, H. *et al.* **Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons.** *Nature.* v. 372, n. 6507, p. 686-91, 1994.

DUFF, G.; ARGAW, A.; CECYRE, B. *et al.* **Cannabinoid receptor CB2 modulates axon guidance.** *PLoS One.* v. 8, n. 8 : e70849, 2013.

DYER, M.A.; CEPKO, C.L. **Regulating proliferation during retinal development.** *Nat Rev Neurosci.* v. 2, n. 5, p. 333-42, 2001.

FAN, W.J.; LI, X.; YAO, H.L. *et al.* **Neural differentiation and synaptogenesis in retinal development.** *Neural Regen Res.* v. 11, n. 2, p. 312-318, 2016.

FREEMAN, T.P.; HINDOCHA, C.; GREEN, S.F.; BLOOMFIELD, M.A.P. **Medicinal use of cannabis based products and cannabinoids.** *BMJ (Clinical research ed.)*, v. 365, l1141, 2019.

FREITAS, H.R.; ISAAC, A.R.; SILVA, T.M. *et al.* **Cannabinoids Induce Cell Death and Promote P2X7 Receptor Signaling in Retinal Glial Progenitors in Culture.** *Mol Neurobiol.* v. 56, n. 9, p. 6472-6486, 2019.

FRIED, P. A.; SMITH, A. M. **A literature review of the consequences of prenatal marihuana exposure.** *Neurotoxicology and Teratology*, v. 23, n. 1, p. 1–11, 2001.

GALVE-ROPERH, I.; AGUADO, T.; RUEDA, D. *et al.* **Endocannabinoids: a new family of lipid mediators involved in the regulation of neural cell development.** *Curr Pharm Des.* v. 12, n. 18, p. 2319-25, 2006.

GALVE-ROPERH, I.; PALAZUELOS, J.; AGUADO, T.; GUZMÁN, M. **The endocannabinoid system and the regulation of neural development: potential implications in psychiatric disorders.** *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* v. 259, n. 7, p. 371-82, 2009.

GOMER, R.H.; AMMANN, R.R. **A Cell-Cycle Phase-Associated Cell-Type Choice Mechanism Monitors the Cell Cycle Rather Than Using an Independent Timer.** *Dev. Biol.* v. 174, n. 1, p. 82-91, 1996.

GREWEN, K.; SALZWEDEL, A.P.; GAO, W. **Functional Connectivity Disruption in Neonates with Prenatal Marijuana Exposure.** *Front Hum Neurosci.* v. 9, p. 601, 2015.

HARKANY, T.; GUZMÁN, M.; GALVE-ROPERH, I. *et al.* **The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development.** *Trends Pharmacol Sci.* v. 28, n. 2, p. 83-92, 2007.

HU, S.S.; ARNOLD, A.; HUTCHENS, J.M. *et al.* **Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina.** *J Comp Neurol.* v. 518, n. 18, p. 3848-66, 2010.

IVERSEN, L. **Cannabis and the brain.** *Brain,* v. 126, p. 1252-1270, 2003.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.; JESSELL, T.M. *et al.* (2014). **Princípios de Neurociências.** 5 ed. *Artmed,* 2014.

KEINO-MASU, K.; MASU, M.; HINCK, L. *et al.* **Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor.** *Cell.* v. 87, n. 2, p. 175-85, 1996.

KOCH, M.; KREUTZ, S.; BÖTTGER, C. *et al.* **The cannabinoid WIN 55,212-2-mediated protection of dentate gyrus granule cells is driven by CB1 receptors and modulated by TRPA1 and Cav 2.2 channels.** *Hippocampus.* v. 21, n. 5, p. 554-64, 2011.

KOKONA, D.; GEORGIU, P.; KOUNENIDAKIS, M. *et al.* **Endogenous and Synthetic Cannabinoids as Therapeutics in Retinal Disease.** *Neural Plasticity.* 2016.

KOZAK, K.R.; ROWLINSON, S.W.; MARNETT, L.J. **Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2.** *J Biol Chem.* v. 275, n. 43, p. 33744-9, 2000.

KUBRUSLY, R.C.C.; GÜNTER, A; SAMPAIO, L. *et al.* **Neuro-glial cannabinoid receptors modulate signaling in the embryonic avian retina.** *Neurochem Int.* v. 112, p. 27-37, 2018.

LAX, P.; ESQUIVA, G.; ALTAVILLA, C.; CUENCA, N. **Neuroprotective effects of the cannabinoid agonist HU210 on retinal degeneration.** *Exp Eye Res.* v. 120, p. 175-85, 2014.

LOGRANO, M.D.; ROMANO, M.R. **Cannabinoid agonists induce contractile responses through Gi/o-dependent activation of phospholipase C in the bovine ciliary muscle.** *Eur J Pharmacol.* v. 494, n. 1, p. 55-62, 2004.

MACKIE, T.; STELLA, N. **Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Evidence for New Players.** *AAPS J.* v. 8, n. 2, p. E298–E306, 2006.

MAKARA, J.K.; MOR, M.; FEGLEY, D. *et al.* **Selective inhibition of 2-AG hydrolysis enhances endocannabinoid signaling in hippocampus.** *Nat Neurosci.* v. 8, n. 9, p. 1139-41, 2005.

MARTINS, R.A.; PEARSON, R.A. **Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina.** *Brain Res.* v. 1192, p. 37-60, 2008.

MATIAS, I.; WANG, J.W.; MORIELLO, A.S. *et al.* **Changes in endocannabinoid and palmitoylethanolamide levels in eye tissues of patients with diabetic retinopathy and age-related macular degeneration.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* v. 75, n. 6, p. 413-8, 2006

MAURYA, N.; VELMURUGAN, B.K. **Therapeutic applications of cannabinoids.** *Chemico-Biological Interactions.* v. 293, p. 77–88, 2018.

MERRITT, J.C.; CRAWFORD, W.J.; ALEXANDER, P.C. *et al.* **Effect of Marijuana on Intraocular and Blood Pressure in Glaucoma.** *Ophthalmology.* v. 87, n. 3, p. 222-8, 1980.

MOORE, D.G.; TURNER, J.D., PARROTT, A.C. *et al.* **During pregnancy, recreational drug-using women stop taking ecstasy (3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine) and reduce alcohol consumption, but continue to smoke tobacco and cannabis: initial findings from the Development and Infancy Study.** *J Psychopharmacol.* v. 24, n. 9, p.1403–1410, 2010.

MULLER, C.; MORALES, P.; REGGIO, P.H. **Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels.** *Front Mol Neurosci.* v. 11, p. 487, 2018.

OHNO-SHOSAKU, T.; HASHIMOTODANI, Y.; MAEJIMA, T.; KANO, M. **Calcium signaling and synaptic modulation: regulation of endocannabinoid-mediated synaptic modulation by calcium.** *Cell Calcium.* v. 38, n. 3-4, p. 369-74, 2005.

PARIA, B.C.; SONG, H.; WANG, X. *et al.* **Dysregulated cannabinoid signaling disrupts uterine receptivity for embryo implantation.** *J Biol Chem.* v. 276, n. 23, p. 20523-8, 2001.

PATIL, M.; PATWARDHAN, A.; SALAS, M.M. *et al.* **Cannabinoid receptor antagonists AM251 and AM630 activate TRPA1 in sensory neurons.** *Neuropharmacology.* v. 61, n. 4, p. 778–788, 2011.

PERTWEE, R.G.; ROSS, R.A. **Cannabinoid receptors and their ligands.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* v. 66, n. 2-3, p. 101-21, 2002.

QIAN, W.J.; YIN, N.; GAO, F. *et al.* **Cannabinoid CB1 and CB2 receptors differentially modulate L- and T-type Ca²⁺ channels in rat retinal ganglion cells.** *Neuropharmacology.* v. 124, p. 143-156, 2017.

RAPINO, C.; TORTOLANI, D.; SCIPIONI, L; MACCARRONE, M. **Neuroprotection by (Endo)Cannabinoids in Glaucoma and Retinal Neurodegenerative Diseases.** *Curr Neuropharmacol.* v. 16, n. 7, p. 959–970, 2018.

RUSSO, E.B.; MERZOUKI, A.; MESA, J.M. et al. **Cannabis improves night vision: a case study of dark adaptometry and scotopic sensitivity in kif smokers of the Rif mountains of northern Morocco.** *J Ethnopharmacol.* v. 93, n. 1, p. 99-104, 2004.

RYSKAMP, D.A.; REDMON, S.; JO, A.O.; KRIŽAJ, D. **TRPV1 and Endocannabinoids: Emerging Molecular Signals that Modulate Mammalian Vision.** *Cells.* v. 3, n. 3, p. 914–938, 2014.

SAARIO, S.M.; SAVINAINEN, J.R.; LAITINEN, J.T. et al. **Monoglyceride lipase-like enzymatic activity is responsible for hydrolysis of 2-arachidonoylglycerol in rat cerebellar membranes.** *Biochem Pharmacol.* v. 67, n. 7, p. 1381-7, 2004.

SANTOS, A.M.; CALVENTE, R.; TASSI, M. et al. **Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina.** *J Comp Neurol.* v. 506, n. 2, p. 224-39, 2008.

SCHWITZER, T.; SCHWAN, R.; ANGIOI-DUPREZ, K. et al. **The Endocannabinoid System in the Retina: From Physiology to Practical and Therapeutic Applications.** *Neural Plasticity.* 2016.

STRAIKER, A.; STELLA, N.; PIOMELLI, D. et al. **Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: Localization and function of an endogenous signaling system.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 96, n. 25, p. 14565–14570, 1999.

VARNER, M.W.; SILVER, R.M.; HOGUE, C.J.R. et al. **Association Between Stillbirth and Illicit Drug Use and Smoking During Pregnancy.** *Obstet Gynecol.* v. 123, n. 1, p. 113–125, 2014.

VECINO, E.; ACERA, A. **Development and programmed cell death in the mammalian eye.** *Int J Dev Biol.* v. 59, n. 1-3, p. 63-71, 2015.

VOLKOW, N.D.; BALER, R.D. **NOW vs LATER brain circuits: implications for obesity and addiction.** *Trends Neurosci.* v. 38, n. 6, p. 345-52, 2015.

WILLFORD, J.A.; CHANDLER, L.S.; GOLDSCHMIDT, L., DAY, N.L. **Effects of Prenatal Tobacco, Alcohol and Marijuana Exposure on Processing Speed, Visual-Motor Coordination, and Interhemispheric Transfer.** *Neurotoxicol Teratol.* v. 32, n. 6, p. 580–588, 2010.

XIANG, M. **Intrinsic control of mammalian retinogenesis.** *Cell Mol Life Sci.* v. 70, n. 14, p. 2519-32, 2013.

YAZULLA, S. **Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection.** *Prog Retin Eyes Res.* v. 27, n. 5, p. 501-526, 2008.

YU, M.; IVES, D.; RAMESHA, C.S. **Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2.** *J Biol Chem.* v. 272, n. 34, p. 21181-6, 1997.

ZHOU, J.; NOORI, H.; BURKOVSKIY, I. *et al.* **Modulation of the Endocannabinoid System Following Central Nervous System.** *Int J Mol Sci.* v. 20, n. 2, p. 388, 2019.