



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Atividade neuroprotetora do óleo de *Cannabis* rico em
delta-9-tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC) em modelo de
epilepsia *in vitro* em linhagem celular do tipo
SH-SY5Y**

BIANCA LIRA CORDEIRO TAVARES

Orientador: Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

Coorientadora: Dra. Micheline Freire Donato

JOÃO PESSOA/PB

OUTUBRO - 2024

BIANCA LIRA CORDEIRO TAVARES

**ATIVIDADE NEUROPROTETORA DO ÓLEO DE *CANNABIS* RICO EM
DELTA-9-TETRAIDROCANABINOL (Δ^9 -THC) EM MODELO DE EPILEPSIA
IN VITRO EM LINHAGEM CELULAR DO TIPO SH-SY5Y**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Farmácia,
do Centro de Ciências da Saúde,
da Universidade Federal da
Paraíba, como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Bacharel
em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

JOÃO PESSOA/PB

OUTUBRO- 2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F737a Tavares, Bianca Lira Cordeiro.

Atividade neuroprotetora do óleo de Cannabis rico em delta-9-tetraidrocanabinol (THC) em modelo de epilepsia in vitro em linhagem celular do tipo SH-SY5Y / Bianca Lira Cordeiro Tavares. - João Pessoa, 2024.
43 f. : il.

Orientação: Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz.
Coorientação : Micheline Freire Donato.
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Sistema endocanabinoide. 2. Fitocanabinoides. 3. THC. 4. Epilepsia. 5. Neuroproteção. I. Diniz, Margareth de Fátima Formiga Melo. II. Donato, Micheline Freire. III. Título.

UFPB/CCS

CDU 615.21


Elaborado por TÁRIS VIRGÍNIA GOMES DA SILVA - CRB-PB000396/O

BIANCA LIRA CORDEIRO TAVARES


**ATIVIDADE NEUROPROTETORA DO ÓLEO DE CANNABIS RICO EM
DELTA-9-TETRAIDROCANABINOL (Δ^9 -THC) EM MODELO DE EPILEPSIA
IN VITRO EM LINHAGEM CELULAR DO TIPO SH-SY5Y**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Farmácia,
do Centro de Ciências da Saúde,
da Universidade Federal da
Paraíba, como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Bacharel
em Farmácia.


Aprovado em 11 de outubro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **MARGARETH DE FATIMA FORMIGA MELO DINIZ**
Data: 21/10/2024 18:49:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Margareth de Fátima F. Melo Diniz
Universidade Federal da Paraíba- UFPB

Documento assinado digitalmente
 **MARCIA REGINA PIUVEZAM**
Data: 18/10/2024 14:47:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Documento assinado digitalmente
 **LINDOMAR DE FARIAS BELEM**
Data: 17/10/2024 13:38:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Lindomar de Farias Belém
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

RESUMO

O Sistema Endocanabinoide (SEC) é o principal modulador do sistema nervoso central envolvido nos processos de plasticidade sináptica e eventos homeostáticos, portanto, apresenta a capacidade de promover regulações nas atividades neurofisiológicas, dentre elas no processamento neurocognitivo, nociceptivo e do humor. Esse mecanismo ocorre por meio do ajuste do SEC na neurotransmissão excitatória, especialmente em neurônios glutamatérgicos. Os eventos de excitotoxicidade mediados pelo *L*-glutamato estão envolvidos em diferentes quadros de neuropatologias, tais como doenças neurodegenerativas e epilepsia. Estudos não-clínicos e clínicos demonstram que a terapia usando fitocanabinoides pode gerar melhorias na qualidade de vida dos pacientes, principalmente os que sofrem com distúrbios que não respondem à terapia convencional. Dentre esses, temos os portadores de epilepsia refratária, a exemplo do observado na Síndrome de Dravet e na Síndrome de Lennox-Gastaut. Na última década, os estudos enfatizam uma possível potencialização dos efeitos farmacológicos e redução dos efeitos colaterais na terapia canabinoide devido ao efeito *entourage*, que ocorre através da sinergia entre fitocanabinoides, terpenos e flavonoides presentes na planta *Cannabis sativa*. Contudo, evidências científicas *in vitro* revelam os mecanismos farmacológicos que permeiam este sinergismo na neuroproteção necessitando ser mais bem avaliados. Objetivos: a investigar *in vitro* em modelo celular de epilepsia acerca dos mecanismos farmacológicos do óleo de *Cannabis full spectrum* rico em delta-9-tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC) nos eventos de excitotoxicidade induzidos pelo *L*-glutamato. Metodologia: análise computacionais *in silico*, cultivo *in vitro* da linhagem celular do tipo SH-SY5Y, viabilidade celular, ensaio de citotoxicidade do Δ^9 -THC, ensaio de excitotoxicidade pelo *L*-glut e bloqueadores farmacológicos, analisados através do ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT). Resultados: O estudo utilizou a ferramenta ProTox II para prever a toxicidade do Δ^9 -THC, demonstrando uma probabilidade de 84% de citotoxicidade inativa e 99% de ligação ao potencial de membrana mitocondrial. Análises *in vitro* revelaram que o Δ^9 -THC manteve a viabilidade celular em concentrações baixas, com 88,92% de sobrevivência a 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Quando exposto a *L*-glutamato, a viabilidade celular variou de 86,04% a 96,47% com Δ^9 -THC, sugerindo efeitos neuroprotetores. Os bloqueadores CNQX e MK-801 aumentaram a viabilidade em até 88,49%, evidenciando a sinergia entre substâncias na modulação da excitotoxicidade. Conclusões: o Δ^9 -THC apresenta atividade citotóxica e neuroprotetora *in vitro* em baixas concentrações na linhagem celular de neuroblastoma SH-SY5Y. Em adição, a combinação com os bloqueadores CNQX e MK-801 potencializou os efeitos neuroprotetores, possivelmente por meio de ação nos receptores CB1R. Esses achados são importantes para futuras pesquisas sobre novos agentes neuroprotetores, visando tratamentos mais eficazes para neuropatologias com efeitos neurotóxicos.

Palavras-chave: Sistema endocanabinoide. Fitocanabinoides. Δ^9 -THC. Epilepsia. Neuroproteção.

ABSTRACT

The endocannabinoid system (ECS) is the main modulator of the central nervous system involved in synaptic plasticity processes and homeostatic events. Therefore, it has the ability to promote regulation in neurophysiological activities, including neurocognitive, nociceptive and mood processing. This mechanism occurs through the adjustment of the ECS in excitatory neurotransmission, especially in glutamatergic neurons. Excitotoxicity events mediated by *L*-glutamate are involved in different neuropathological conditions, such as neurodegenerative diseases and epilepsy. Nonclinical and clinical studies demonstrate that therapy with phytocannabinoids can generate improvements in the quality of life of patients, especially those suffering from disorders that do not respond to conventional therapy. Among them, we have patients with refractory epilepsy, an example of the observation in Dravet Syndrome and Lennox-Gastaut Syndrome. In the last decade, studies have emphasized a possible potentiation of pharmacological effects and reduction of side effects in cannabinoid therapy due to the entourage effect, which occurs through the synergy between phytocannabinoids, terpenes and flavonoids present in the *Cannabis sativa* plant. However, *in vitro* scientific evidence that reveals the pharmacological mechanisms that allow this synergism in neuroprotection needs to be better evaluated. Objectives: an *in vitro* investigation in a cellular model of epilepsy of the pharmacological mechanisms of full spectrum *Cannabis* oil rich in Δ^9 -THC in the excitotoxicity events induced by *L*-glutamate. Methodology: computational analysis *in vitro* silico culture of the SH-SY5Y cell line, cell procurement, Δ^9 -THC cytotoxicity assay, *L*-glut excitotoxicity assay and pharmacological blockers, analyzed through the tetrazolium salt reduction assay (MTT). Results: The study used the ProTox II tool to prevent Δ^9 -THC toxicity, showing an 84% probability of inactive cytotoxicity and 99% binding to mitochondrial membrane potential. *In vitro* analyses revealed that Δ^9 -THC increased cell coverage at low concentrations, with 88.92% survival at 0.5 $\mu\text{g/mL}$. When exposed to *L*-glutamate, cell options ranged from 86.04% to 96.47% with Δ^9 -THC, comparing neuroprotective effects. The CNQX and MK-801 blockers increased recommendations by up to 88.49%, evidencing the synergy between matter in modulating excitotoxicity. Conclusions: Δ^9 -THC presents cytotoxic and neuroprotective activity *in vitro* at low concentrations in the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Furthermore, the combination with the CNQX and MK-801 blockers potentiated the neuroprotective effects, possibly through action on CB1R receptors. Therefore, these findings are important for future research on new neuroprotective agents, more effective treatments for neuropathologies with neurotoxic effects.

Keywords: Endocannabinoid system. Phytocannabinoids. Δ^9 -THC. Epilepsy. Neuroprotection.

DEDICATÓRIA



Aos meus avós, que sempre estiveram presentes na minha criação, com muito amor e cuidado. Especialmente, a você, vovô Antônio Lira, espero que estar te orgulhando! Aos meus amados pais, que sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para ajudar a realizar meus sonhos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus por me dar forças todos os dias para continuar e sempre estar provendo todas as coisas em minha vida. Muito obrigada.

Aos meus avós (Antônio, Francisco Tito, Ísis e Lindomar), por todo cuidado, apoio, incentivo, força que sempre me proporcionaram e fizeram chegar até aqui. Sou eternamente grata, obrigada.

Aos meus pais (Franco e Denise), por se sacrificarem pela minha educação, por toda força, carinho, cuidado, apoio e incentivo. Sem vocês nada disso seria possível, obrigada por tudo.

A minha irmã (Amanda), mesmo 10 anos mais nova sempre está preocupada comigo, com muito amor, carinho e atenção. Obrigada por tudo.

A minha irmã de vida (Tassia), por todo amor, cuidado, apoio, incentivo, força e nunca me deixar desistir e sempre perseverar. Obrigada por tudo.

Ao meu namorado (Andrey), por todo amor, apoio, carinho, incentivo e força para seguir e perseverar nessa caminhada. Obrigada por tudo.

Aos meus amigos (Bruno, Camylla, Geovanna, Magdalena, Vinícius e Vitória), por estarem comigo desde o início dessa caminhada, com muito amor, carinho, cuidado, incentivo e força. Obrigada por tudo.

A minha orientadora (Profa. Dr. Margareth de Fátima F Melo Diniz), por todo carinho, cuidado, respeito, dedicação e incentivo. Obrigada por tudo.

A minha coorientadora (Micheline Freire Donato), por todo cuidado, respeito, incentivo, dedicação e incentivo. Obrigada por tudo.

Aos colaboradores e parceiros (Prof. Demétrius, Igor e Debora), por acreditarem neste trabalho e ajudarem na realização deste trabalho. Obrigada por tudo.

Agradeço a todos do Laboratório de Ensaio Toxicológicos - LABETOX e à Universidade Federal da Paraíba - UFPB, por toda acolhida e por me fornecer as condições necessárias para a realização deste trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Foto da <i>Cannabis</i> spp.....	13
Figura 2 – Adaptado de Honório e col. (2006), as figuras demonstram a estrutura química do Δ^9 -THC	14
Figura 3 – Tricoma secretor presente na fase de inflorescência as <i>C. sativa</i>	15
Figura 4 – Sinalização do SEC	18
Figura 5 – Tabela criada com os dados da predição <i>in silico</i> do fitocanabinoide delta-9-tetraidrocanabinol.....	29
Figura 6 – Concentração inibitória em 50% (CI ₅₀) do Δ^9 -THC em células de linhagem do tipo SH-SY5Y tratadas durante o período de 24 horas.....	30
Figura 7 – CI ₅₀ do L-glutamato em células de linhagem do tipo SH-SY5Y tratadas durante o período de 24 horas.....	32
Figura 8 – Concentração eficaz em 50% (CE ₅₀) do Δ^9 -THC em células de linhagem do tipo SH-SY5Y após a indução da excitotoxicidade pelo L-glut (CI ₅₀), tratadas durante o período de 24 horas.....	33
Figura 9 – Efeito dos bloqueadores e do Δ^9 -THC após a excitotoxicidade induzida pelo L-glut em células de linhagem do tipo SH-SY5Y tratadas durante o período de 24 horas.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA - Ácido araquidônico
ABRACE - Associação Brasileira de Apoio a Cannabis Esperança
AEA - Anandamida
ANOVA - Análise de Variância
AMPc - Monofosfato de adenosina cíclico
AMPA - Amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolpropionato
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBC - Canabicromeno
CBD – Canabidiol
CBG – Canabigerol
CB1R - Receptor Canabinoide Tipo 1
CB2R - Receptor Canabinoide Tipo 2
CBRs - Receptores Canabinoides
CBDV - Canabidivarina
CE₅₀ - Concentração eficaz 50%
CI₅₀ - Concentração inibitória 50%
DA - Doença do Alzheimer
eCB – Endocanabinoides
FAAH - Hidrolase de ácidos graxos da amida
GABA - Ácido γ-aminobutírico
GPCRs - Receptores acoplados à proteína G
GPR55 - Receptor canabinoide GPR55
L-glu - L-glutamato
MAGL - Monoacilglicerol lipase
MK-801 - Antagonista do receptor NMDA
MMP - Potencial de Membrana Mitocondrial
NMDA - N-metil-D-aspartato
OPA - Organização Pan-Americana de Saúde
PKC - Proteína quinase C
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
ROS - Espécies reativas de oxigênio
SEC - Sistema Endocanabinoide
SN - Sistema Nervoso
SNC - Sistema nervoso central
Δ⁹-THC - Delta-9-tetraidrocanabinol
THCA - Ácido tetraidrocanabinólico
THCV - Tetraidrocanabivarina
2-AG - 2-araquidonoilglicerol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO JUSTIFICATIVA.....	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1	A PLANTA <i>CANNABIS SATIVA</i> E O Δ^9 -TETRAIDROCANABINOL (Δ^9 -THC).....	14
2.2	PRODUTOS DE <i>CANNABIS</i> E O EFEITO COMITIVA.....	17
2.3	O SISTEMA ENDOCANABINOIDE (SEC) E SEUS VIESES: BREVE VISÃO SOBRE RECEPTORES, SINALIZAÇÃO E TERAPÊUTICA.....	18
2.4	EPILEPSIA FÁRMACO-RESISTENTE.....	20
2.5	EXCITOTOXICIDADE E <i>L</i> -GLUTAMATO.....	21
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4	METODOLOGIA.....	24
4.1	MATERIAIS.....	24
4.1.1	SUBSTÂNCIAS E REAGENTES.....	24
4.1.2	EQUIPAMENTOS.....	24
4.1.3	LINHAGEM CELULAR.....	24
4.1.4	SUBSTÂNCIA TESTE.....	25
4.1.5	ENSAIO DE VIABILIDADE UTILIZANDO SAL DE TETRAZÓLIO - MTT.....	25
4.1.6	BLOQUEADORES FARMACOLÓGICOS.....	25
4.2	LOCAIS DA PESQUISA.....	25
4.3	MÉTODOS.....	25
4.3.1	ANÁLISES COMPUTACIONAIS <i>IN SILICO</i>	25
4.3.2	CULTIVO DA LINHAGEM CELULAR SH-SY5Y DE TUMOR DE CÉREBRO DE HUMANOS.....	26
4.3.3	VIABILIDADE CELULAR.....	26
4.3.4	ENSAIO DA CITOTOXICIDADE DO Δ^9 -THC.....	26
4.3.5	DETERMINAÇÃO DA CI_{50} DO <i>L</i> -GLUTAMATO.....	27
4.3.6	ENSAIO DA INDUÇÃO DA EXCITOTOXICIDADE PELO <i>L</i> -GLUTAMATO.....	28
4.3.7	BLOQUEADORES FARMACOLÓGICOS.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
5.1	ANÁLISES COMPUTACIONAIS <i>IN SILICO</i>	29
5.2	AValiação DA CITOTOXICIDADE DO Δ^9 -THC.....	31
5.3	EXCITOTOXICIDADE PELO <i>L</i> -GLUTAMATO.....	33
5.4	ENSAIO UTILIZANDO OS BLOQUEADORES FARMACOLÓGICOS.....	33
6	CONCLUSÕES.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O sistema endocanabinoide (SEC) é um importante modulador nas vias de sinalização presentes ao longo do corpo humano. No cérebro, atua como um modulador chave nos processos de plasticidade sináptica, neuroproteção e eventos homeostáticos (Lu *et al.*, 2021). Nesse contexto, algumas desordens neuropsiquiátricas vêm apresentando como causa ou consequência um déficit no SEC, tais como as doenças neurodegenerativas, neuro-inflamatórias, distúrbios de humor e epilepsias (Kendall *et al.*, 2017; Russo, 2018). Logo, isso indica que esse sistema neuromodulador pode ser um alvo farmacológico importante para o tratamento dessas patologias.

O SEC é composto pelos receptores canabinoides CB1 (CB1R) e CB2 (CB2R), seus ligantes endógenos, os principais endocanabinoides (eCB) como anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), e pelas enzimas de degradação, a ácido graxo hidrolase (FAAH) e monoglicerol lipase (MAGL), além do transportador de AEA, e pode ser modulado diretamente por ligantes dos receptores CB1R e CB2R, ou indiretamente através de inibidores de FAAH e MAGL (Kruk-Slomka *et al.*, 2019). Entretanto, a ampla expressão dos componentes desse sistema junto à complexidade da atuação de alguns nas transmissões excitatórias e inibitórias realçam o quão desafiador é elucidar o seu papel na terapêutica (Kendall *et al.*, 2017). Ademais, outros sistemas neurotransmissores que compõem o funcionamento do sistema nervoso (SN), tais como serotoninérgico e dopaminérgico também podem ser modulados pelo SEC, o que reflete a sua vasta atuação em diferentes neuropatologias.

Historicamente, há mais de 5.000 anos, uma das primeiras plantas a serem utilizadas para fins terapêuticos, religiosos e recreativos foi a *Cannabis sativa*. No século XIX, o primeiro fitocanabinoide vegetal a ser isolado foi canabinol (CBN), e posteriormente o delta9- tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC) e canabidiol (CBD), na década de 1960, tiveram as estruturas químicas, estereoquímica e as sínteses elucidadas pelo professor israelense Dr. Raphael Mechoulam (Paes-Collin, 2022).

A *Cannabis sativa* é uma planta que produz como metabólitos secundários mais de 100 fitocanabinoides além dos mais de 400 compostos

como alcalóides, flavonoides, terpenos, lignanas etc. Dentre os diferentes fitocanabinoides presentes nas flores da *Cannabis* sp. foram testados, como agentes anticonvulsivantes, o Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC) e o canabidiol (CBD) (Russo, 2018).

Ensaio não-clínicos e clínicos demonstram os efeitos benéficos da *Cannabis* no tratamento da epilepsia *in vitro* e *in vivo*, reduzindo a frequência das crises, neuroproteção e atividade antioxidante em animais. Dessa maneira, estudos realizados por Press e col. (2015). evidenciaram que os pacientes com a Síndrome de Lennox-Gastaut quando tratados com extratos ricos em fitocanabinoides apresentaram diminuição na frequência de convulsões em 88.9% dos casos.

Considerando que os óleos de *Cannabis* têm sido indicados e regulamentados pela RDC 327/2019 da ANVISA para o tratamento de patologias graves que apresentam quadros epileptiformes, nesse estudo foi utilizado o óleo *full spectrum* rico em Δ^9 -THC (óleo verde, 15 mg/mL) da Associação Brasileira de Apoio à *Cannabis* Esperança – ABRACE.

Nesse contexto, os ensaios realizados por nosso grupo de pesquisa vêm demonstrando o papel neuroprotetor *in vitro* do óleo integral de *Cannabis* rico em Δ^9 -THC (15 mg/mL), além de investigar se essa atividade é tempo-dependente e os possíveis mecanismos de neuroproteção contra a excitotoxicidade mediada pelo *L*-glutamato.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A planta *Cannabis sativa* e o Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC)

A *Cannabis* pertence à pequena família das Cannabaceae e os taxonomistas a classificaram inicialmente em três subespécies: *C. sativa sativa*, *C. sativa indica* Lamarck e *C. sativa ruderalis* (Sommano, 2020).

Historicamente, registros paleontológicos comprovam a presença da *Cannabis* spp. (figura 1) durante as eras evolutivas, como o período neolítico. O continente asiático apresenta os primeiros registros deixados há mais de 12.000 anos, pelas populações primitivas as quais tinham a cultura de consumo e manejo da planta através do alimento, confecção de tecidos e para fins medicinais. Dessa forma, a difusão da planta nos demais continentes ocorreu por meio do comércio, como é o caso da África. Todavia, na Europa e nas Américas, foram marcadas pelos seguintes eventos históricos: invasão muçulmana, colonização africana e colonização e comércio com a Índia, provocando uma introdução mais acelerada (Small, 2017; Neto, 2023).

Figura 1 – Foto da planta *Cannabis* spp.



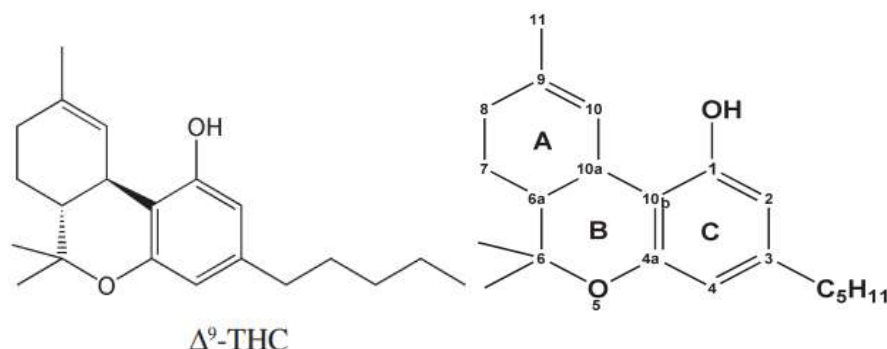
Fonte: <https://br.freepik.com/>

A Índia tem importante papel na descoberta e disseminação das propriedades terapêuticas promovidas pela planta, isso porque durante o período da colonização o médico e pesquisador irlandês, William O'Shaughnessy, acompanhou a famosa Companhia das Índias Orientais, onde aprendeu sobre diversas plantas medicinais, dentre elas a *Cannabis*. Durante a viagem, realizou diversos estudos em animais e pacientes, usando a planta para

tratar doenças como cólera, doenças reumáticas, raiva, tétano e, principalmente, no controle de crises convulsivas. Posteriormente, ele se tornou defensor publicamente do uso da *Cannabis*, publicando artigos com relatos de suas experiências. Dentre eles, houve um registro no *Provincial Medical Journal* de Londres, no qual expôs o uso do extrato da *Cannabis* para o tratamento de uma criança recém-nascida que apresentava crises de convulsões refratárias (Neto, 2023).

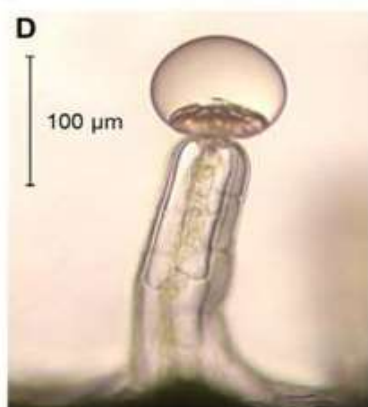
Desde a sua descoberta, o Δ^9 -THC (figura 2) continua sendo um dos fitocanabinoides mais estudados para fins de uso terapêutico. Estudos demonstram sua utilização principalmente relacionado diretamente com as modulações de estímulos ligados à dor, sedação, apetite, humor, como também em atividade broncodilatadora, antioxidante, neuroprotetora/neuroplasticidade e anti-inflamatório (Paes-Collin, 2022).

Figura 2 - Adaptado de Honório e col. (2006), as figuras demonstram a estrutura química do Δ^9 -THC.



Atualmente, existem mais de 100 tipos de fitocanabinoides e outros metabólitos derivados da *Cannabis* descobertos, a exemplo dos terpenos, alcalóides, flavonoides etc. (Sampson, 2020). Dentre os fitocanabinoides temos: Δ^9 -THC, CBD, canabigerol (CBG), canabicromeno (CBC), canabidivarina (CBDV) e tetrahydrocanabivarina (THCV). Essas substâncias são sintetizadas nas células secretoras presentes nos tricomas glandulares (figura 3) das inflorescências femininas não fertilizadas, da *Cannabis* spp., onde se apresentam altamente concentradas (Russo, 2011).

Figura 3 – Tricoma secretor presente na fase de inflorescência as *C. sativa*



Fonte: (André, 2016)

Dessa maneira, o termo “inflorescência” ou “*Buds* da maconha” foi empregado pelos botânicos para organizar a forma que se apresentavam as flores. Portanto, são um grupo ou aglomerados de flores que podem ser fertilizados, e, posteriormente, gerarão frutos (Small, 2017). Logo, são visíveis a olho nu e densamente cobertas por tricomas secretores presente nos caules floridos finais, quando não passam pelo processo de polinização há um aumento nas concentrações das estruturas especializadas responsáveis por sintetizar, armazenar, proteger e liberar os fitocanabinoides e os metabólitos secundários derivados, a exemplo dos terpenos, flavonoides e alcaloides (Small, 2017; Sousa, 2022).

O Δ^9 -THC é o fitocanabinoide majoritário presente na planta, sua estrutura química contém um sistema benzopirano (A, B, C) (figura 2), uma dupla ligação no átomo C9, esterificação de grupos fenólicos no anel C responsáveis por favorecer a atividade da molécula. Sua estrutura proporciona um arranjo espacial responsável por gerar uma atividade estereoseletiva. Essa característica tem o isômero (-) -trans, presente em maior concentração na planta, apresentando de 6 a 100 vezes a mais potência quando comparado com o isômero (+) -trans (Adams *et al.*, 1996; Honório *et al.*, 2006).

Nessa perspectiva, as estruturas químicas das moléculas vem sendo cada vez mais utilizadas como alvo de estudos para gerar possíveis determinações de toxicidade celular, sítios de ações e interações entre a molécula, como por exemplo a predisposição *in silico* (Alves *et al.*, 2023).

O software utiliza a estrutura química do composto para gerar uma simulação computacional através de diversos modelos, os quais têm como um dos princípios relacionar os compostos com estruturas similares e que apresentam comportamentos similares para desenvolver a estatística (Alves *et al.*, 2023).

Essa ferramenta gera algoritmos utilizando as avaliações de riscos por meio de metodologias, como relação estrutura-atividade (SAR: *structure-activity relationship*), relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR: *quantitative structure-activity relationship*), formação de categorias (*category formation*), métodos de extrapolação e interpolação (*read-across, trend analysis*), redes neurais (*neural networking modelling*) e árvores de decisão (*decision tree*). Dessa maneira, essa abordagem proporciona uma economia de tempo, dinheiro, redução de uso de animais em experimentos auxiliando na questão ética (Alves *et al.*, 2023).

2.2 Produtos de *Cannabis* e o Efeito Comitiva

Os avanços tecnológicos e científicos atrelados ao aumento do consumo de produtos de *Cannabis* no mundo, impulsionaram a intensificação dos estudos farmacológicos, fisiológicos e toxicológicos dos seus derivados, principalmente as moléculas mais abundantes na planta, o Δ^9 -THC e CBD (Pacher *et al.*, 2020).

Estudos recentes vêm evidenciando uma nova perspectiva farmacológica, o sinergismo entre os fitocanabinoides e seus fitoquímicos, encontrados no extrato integral da planta. Essa associação gera um “efeito comitiva” nas sinalizações além do SEC, causando um efeito polifarmacológico (Ferber *et al.*, 2020). Ensaio não-clínicos, realizados com camundongos, demonstraram essa combinação no tratamento da Doença do Alzheimer (DA), em que apresentaram uma melhora da cognição, aprendizado e melhora nos animais (Coles *et al.*, 2022). Nessa perspectiva, análises clínicas em pacientes com DA, tratadas com esse sinergismo apresentaram uma melhora no ganho de peso e nos sintomas não cognitivos e cognitivos (Paes-Collin, 2022).

Atualmente, os produtos de *Cannabis* autorizados para uso medicinal pela resolução da ANVISA RDC327/2019 compreendem os óleos medicinais do tipo

full spectrum (óleo integral da planta, com a presença de Δ^9 -THC em até 0.2%), *broad spectrum* (óleo integral da planta, sem o Δ^9 -THC) e o fitofármaco CBD. Esses óleos integrais apresentam em seus constituintes os fitocanabinoides associados com os demais metabólitos secundários (terpenos, alcalóides, flavonoides), o que gera o benefício do efeito comitativa. (Small, 2017; Anvisa, 2022)

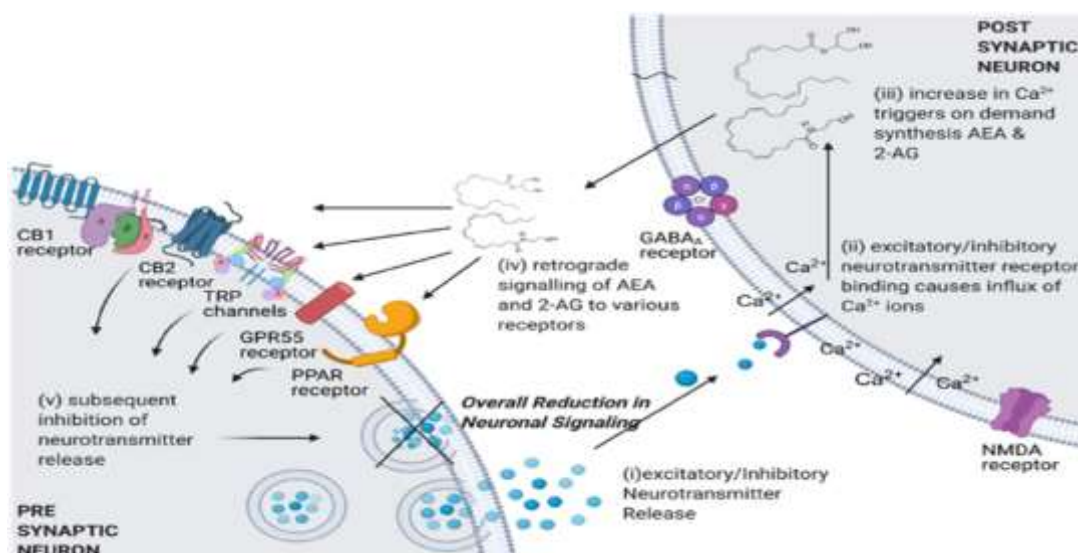
As interações farmacológicas sinérgicas pelas quais o efeito comitativa acontece ainda não são totalmente elucidadas, fazendo-se assim, a importância de pesquisas científicas não-clínicas e clínicas para uma melhor compreensão dos efeitos terapêuticos (Coles *et al.*, 2022).

2.3 O Sistema Endocanabinoide (SEC) e seus vieses: breve visão sobre receptores, sinalização e terapêutica

Os receptores canabinoides pertencem à maior família de receptores do proteoma humano, que são os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e compreendem dois subtipos amplamente caracterizados, o CB1R e CB2R (Howlett, *et al.*, 2002). Esses receptores são acoplados principalmente aos subtipos de proteína G_i/G_o e medeiam a liberação de diferentes neurotransmissores (NTs). A ativação do SEC no neurônio pós-sináptico gera um influxo de íons de cálcio (Ca^{2+}) que ativa as enzimas fosfolipases de membrana e direcionam a conversão do ácido araquidônico (AA) em eCB, como AEA e 2-AG (Castillo *et al.*, 2012).

Os eCB são movidos por sinalização retrógrada (figura 4), sendo pouco conhecido o transporte de 2-araquidonoilglicerol (2-AG), porém sabe-se que anandamida (AEA) é transportado para o neurônio pré-sináptico por meio das proteínas carreadoras lipofílicas (transportador de AEA) (Castillo *et al.*, 2012). Os agonistas canabinoides podem ativar os CBR, com subsequente ativação da proteína G_i e modulam a secreção de NTs inibitório, como o ácido γ -aminobutírico (GABA) em diferentes áreas do SNC ou ainda modulam a liberação de outros NTs, como o *L*-glutamato (*L*-glut) (Huang *et al.*, 2016; Castillo *et al.*, 2012).

Figura 4 - **Sinalização do SEC.** Adaptado de Farrelly e col. (2021) as etapas representam a transmissão sináptica: (I) acontece a saída dos NTs excitatórios/inibitórios na fenda sináptica; (II) a excitação ou inibição no NT no receptor provoca um influxo de íons de cálcio; (III) o aumento de cálcio intracelular provoca a síntese de endocanabinoides, como AEA e o 2-AG que são liberados na fenda sináptica promovendo uma sinalização retrógrada; (IV) a sinalização retrógrada do AEA e 2-AG em diferentes receptores pré-sinápticos acontece diferentes modulações; (V) subsequente há inibição dos NTs.



Os fármacos canabinoides podem atuar de diferentes formas, quer seja como inibidores enzimáticos de FAAH ou MAGL ou agonistas CB1R e/ou CB2R ativando diferentes vias de sinalização (Maa *et al.*, 2014). Os CB1R medeiam os efeitos pré-sinápticos dos endocanabinoides no SNC sendo os responsáveis pelo maior efeito comportamental ocasionado pelos canabinoides exógenos, tais como o fitocanabinoide Δ^9 -THC (Smith *et al.*, 2015).

Além dos eCBs, os fitocanabinoides encontrados no extrato da planta *Cannabis* sp., tais como o Δ^9 -THC, tem demonstrado eficácia no tratamento de processos fisiopatológicos, devido às suas propriedades tais como neuroproteção, neuroplasticidade, analgesia, antiemético, antipruriginosa etc. (Pertwee, 2012).

Um trabalho com modelo de esquizofrenia induzida em camundongos pelo uso do antagonista do receptor glutamatérgico de NMDA (MK-801), mostrou que o uso agudo do inibidor da enzima FAAH (URB 597), na dose de 0,3 mg/kg atenuou os efeitos induzidos pelo MK-801 (Kruk-Slomka *et al.*, 2019). Esses achados demonstram a correlação entre os sistemas glutamatérgico e

canabinoide em distúrbios afetivos e psíquicos, apontando novos caminhos terapêuticos para esses distúrbios.

2.4 Epilepsia fármaco-resistente

A epilepsia é um distúrbio neurológico crônico presente em 50 milhões de pessoas no mundo e 5 milhões presentes no continente americano (OPAS, 2019). Dentre 20 a 30% deles não apresentam melhora significativa com a farmacoterapia convencional. Dessa maneira, a qualidade e expectativa de vida desses pacientes são drasticamente afetadas pela incapacidade de controlar as crises convulsivas (Aquino *et al.*, 2021)

O tratamento farmacológico convencional para os distúrbios epiléticos tem como objetivo controlar a frequência e intensidade das crises. O medicamento de escolha varia de acordo com o perfil do paciente, tolerância ou em alguns casos são necessários procedimentos cirúrgicos na região cerebral. Dentre esses medicamentos, estão a fenitoína e carbamazepina agindo no bloqueio dos canais para sódio dependentes de voltagem, gerando uma rápida despolarização da membrana celular neuronal durante os potenciais de ação, o que reduz a excitabilidade neuronal; e os benzodiazepínicos e barbitúricos agindo elevando a transdução de estímulos inibitórios mediados pela hiperpolarização por meio dos canais de cloreto ligado ao receptor GABAA (Aguirre *et al.*, 2019; Aquino *et al.*, 2021).

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), 70% dos pacientes que apresentam epilepsia fazem uso dos medicamentos básicos. Todavia, dentre os 30% restantes, 10% dos casos necessitam de uma abordagem especializada, como dieta cetogênica e/ou cirurgia; e aproximadamente 20% não respondem ao tratamento convencional (OPAS/OMS-Brasil, 2018). Portanto, gerando um grande prejuízo diretamente na qualidade vida dessas pessoas, assim, faz-se necessário buscar uma farmacoterapia alternativa para suprir o déficit causado na farmacoterapia.

Os mecanismos de resistência aos medicamentos antiepiléticos ainda são considerados hipotéticos, mas alguns modelos preditivos têm sido desenvolvidos. Um dos principais modelos envolve a hipótese do efluxo mediado por transportadores de membrana, que desempenham um papel crucial na

resistência a esses fármacos, pois diminuem suas concentrações nos alvos farmacológicos (Aquino *et al.*, 2021).

Estudos clínicos demonstram uma nova expectativa para o tratamento das crises convulsivas epiléticas por meio do uso farmacoterapêutico dos fitocanabinoides provenientes da *Cannabis* sp. e seus derivados. Dessa maneira, os fitocanabinoides agem modulando as vias de sinalização do sistema gerando, principalmente, reduções na expressão de CB1R, produção de AEA e causando um aumento da atividade no receptor órfão GPR55 (Kendall *et al.*, 2017; Russo, 2018, Aquino *et al.*, 2021). Portanto, por isso o uso dos fitocanabinoides em pacientes que apresentam desordens do SNC incluindo as doenças neurodegenerativas, epilepsia, deficiências cognitivas e do humor. Nessa perspectiva, fitocanabinóides a exemplo do CBD, o Δ^9 -THC e Ácido tetraidrocanabinólico estão sendo cada vez mais testados como agentes antiepiléticos em síndromes epileptiformes, como de Dravet e de Lennox-Gastaut, a fim de trazer um melhor bem-estar e expectativa de vida a esses pacientes. (Kendall *et al.*, 2017; Russo, 2018, Aquino *et al.*, 2021)

2.5 Excitotoxicidade e L-glutamato

A excitotoxicidade se define como a morte celular através da estimulação excessiva por liberação exacerbada de neurotransmissores excitatórios, tais como o L-glutamato (L-glu), no SNC (Garzon *et al.*, 2018). Ele é o principal neurotransmissor (NT) excitatório desse sistema, considerado um excelente medidor de neurotoxicidade, isso porque as anormalidades o envolvem têm como característica a produção, liberação e inibição da recaptação desse NT. Logo, estimulam os receptores glutamatérgicos ionotrópicos levando a eventos de neurotoxicidade e danos neuronais sendo presentes em algumas doenças, por exemplo a DA, doença de Huntington, diversos tipos de epilepsia, dentre outras (Garzon *et al.*, 2018; De Oliveira *et al.*, 2019),

Nesse viés, Lucas e Newhouse descreveram pela primeira vez os efeitos tóxicos do glutamato em testes usando camundongos bebês. O termo “excitotoxicidade do glutamato” foi criado por Olney, posteriormente, também em testes usando camundongos filhotes e adultos identificando lesões cerebrais importantes promovida após a administração de injeções com L-glut. Nesse viés,

a hiperexcitação crônica provocada pelo *L*-glut nas células neuronais está envolvida em doenças neurodegenerativas, a exemplo da doença de Huntington, doença de Parkinson e na DA. Além disso, distúrbios crônicos como a epilepsia também são marcados pela morte celular por essa exacerbação do NT (Lau, 2010).

Dentre os receptores glutamatérgicos envolvidos durante os processos que envolvem essas doenças, fazendo um destaque para a epilepsia, encontra-se principalmente o N-metil-D-aspartato (NMDA). Ele recebe esse nome pela afinidade com a molécula N-metil-D-aspartato e apresenta como característica ser um receptor composto por três combinações de subunidades: duas de NR1 e uma de NR2 (Scatton, 1993; Lau, 2010).

O mecanismo de atuação do receptor NMDA durante as crises epiléticas não envolve apenas ligações com vários ligantes, mas também a despolarização do neurônio. Sendo assim, as altas concentrações do *L*-glut liberado pelo neurônio pré-sináptico na fenda ativa o receptor glutamatérgico, da mesma família do NMDA, o amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolpropionato (AMPA) e kainato. Essa ativação provoca um aumento do influxo de sódio (Na^+) superior ao normal despolarizando a membrana do neurônio conseguindo retirar o íon de Mg^{2+} , responsável por inativar o NMDA. Ao ser ativado, haverá um aumento do influxo de íons de cálcio (Ca^{2+}) e Na^+ para dentro da célula neuronal, no qual o Ca^{2+} poderá ativar a proteína quinase C (PKC). Ela irá promover ativação de mecanismos que causam a fosforilação de *feedback* positivo em receptores AMPA e Kainato para que eles continuem ativos (Scatton, 1993; Lau, 2010; Dupuis, 2023).

A sobrecarga de íons cálcio intracelular ocasiona uma excitotoxicidade provocando morte celular. Outrossim, o Ca^{2+} pode se acumular dentro das mitocôndrias alterando o funcionamento da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS), gerando um estresse oxidativo na célula levando à morte (Taleanu *et al.*, 2022).

Destarte, estudos, como o realizado por De Oliveira e col. (2019)., recriam através de um modelo celular *in vitro*, utilizando as células de linhagem celular

de neuroblastoma de humanos do tipo SH-SY5Y, para simular como as células neuronais se comportam durante as crises na epilepsia induzindo a excitotoxicidade pelo *L-glut* durante 24h de exposição.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar *in vitro* em modelo celular de epilepsia acerca dos mecanismos farmacológicos do óleo de *Cannabis full spectrum* rico em Δ^9 -THC nos eventos de excitotoxicidade induzidos pelo *L*-glutamato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as características farmacológicas e toxicológicas – ProTox II do fitocanabinóide majoritário Δ^9 -THC por meio de ensaios *in silico*;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* do óleo de *Cannabis full spectrum* rico em Δ^9 -THC em células de linhagem neuronal do tipo SH-SY5Y por ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT);
- Determinar a Concentração Inibitória em 50% (CI₅₀) do óleo de *Cannabis full spectrum* rico em Δ^9 -THC;
- Avaliar a atividade neuroprotetora *in vitro* do óleo de *Cannabis full spectrum* rico em Δ^9 -THC a partir da indução da excitotoxicidade pelo *L*-glutamato em células tumorais de neuroblastoma do tipo SH-SY5Y por ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT);
- Determinar a CI₅₀ do *L*-glut;
- Determinar a Concentração Eficaz em 50% (CE₅₀) do óleo de *Cannabis full spectrum* rico em Δ^9 -THC;
- Investigar aguda dos mecanismos de ação envolvidos na neuroproteção pelo Δ^9 -THC por ensaio de MTT na presença de bloqueadores farmacológicos.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Substâncias e reagentes

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados as seguintes materiais: azul de tripan (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), solução fosfato tamponada (PBS) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), dimetilsulfóxido (DMSO) (Dinâmica®, Indaiatuba, São Paulo, Brasil), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), meio Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (DMEM F12) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), L-glutamina (Nutricell®, Campinas, São Paulo, Brasil), soro fetal bovino (SBF) (GIBCO®, 69 Grand Island, New York, EUA), solução estabilizada de penicilina (100 UI/mL) - estreptomicina (100 µg/MI), (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA) e L-Glutamic acid monosodium salt monohydrate (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA).

4.1.2 Equipamentos

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos: centrífuga Rotina 380R (Hettich®, North Rhine-Westphalia, Alemanha), microscópio invertido Nikon eclipse TS100 (Olympus®, Tóquio, Japão), balança analítica eletrônica SHI-AUW220D (Shimadzu®, São Paulo, Brasil), cabine de fluxo de ar laminar vertical Aeolus V (Telstar®, São Paulo, Brasil), incubadora de CO₂ MCO-18ACL-PA (Panasonic®, Osaka, Japão), leitor de multidetecção Synergy HT (BioTek®, Vermont, EUA), autoclave vertical linha CS-A (Prismatec®, São Paulo, Brasil), estufa de secagem (DeLeo® equipamentos laboratoriais, Rio Grande do Sul, Brasil), banho-maria AQUAline (LAUDA®, São Paulo, Brasil), geladeira DFN49 (Eletrolux®, Paraná, Brasil).

4.1.3 Linhagem Celular

A linhagem celular de neuroblastoma de humano SH-SY5Y (ATCC® CRL2266) foi isolada a partir da biópsia de um paciente na década de 1970 e desde 1980 vem sendo utilizada como modelo de célula neuronal (Biedler *et. al.*

1973; JOSHI, et. al., 2006) por apresentar propriedades bioquímicas e funcionais de células neuronais (Xie *et al*, 2010).

As células de linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y (ATCC® CRL2266) foram cedidas pela Profa. Dra. Micheline Donato (UNILA).

4.1.4 Substância teste

O óleo de Cannabis *full spectrum* rico em Δ^9 -THC (Óleo THC *Gold* 15 mg/ml), foi produzido e gentilmente cedido pela Associação Brasileira de Apoio à Cannabis Esperança (ABRACE ESPERANÇA).

4.1.5 Ensaio de viabilidade utilizando Sal de tetrazólio - MTT

No ensaio para determinação da viabilidade celular e citotoxicidade da substância, foi utilizado o sal de tetrazólio (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), e avaliado por método espectrofotométrico utilizando o solvente DMSO (Dinâmica®, Indaiatuba, São Paulo, Brasil), para leitura.

4.1.6 Bloqueadores farmacológicos

Os bloqueadores farmacológicos glutamatérgicos foram: CNQX (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), bloqueador do receptor ionotrópicos glutamatérgico de AMPA/Cainato e o MK-801 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA) bloqueador do receptor ionotrópicos glutamatérgico do NDMA e o AM630 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA) que é bloqueador do receptor CB2R.

4.2 LOCAIS DA PESQUISA

Os cultivos das celulares das células de linhagem e os ensaios de citotoxicidade foram executados no Laboratório de Ensaio Toxicológicos - LABETOX (IPeFarM-UFPB) e no Laboratório de Cultivo Celular em colaboração com o Prof. Dr. Demétrius Araújo (CBiotec-UFPB).

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Análises Computacionais *in silico*

Predição da toxicidade química utilizando a ferramenta (ProTox II) Os dados do *in silico* foram gerados por meio do programa ProTox -

(https://toxnew.charite.de/prottox_II/), para predição da toxicidade de compostos químicos (ADMET), o qual desenvolve cálculos probabilísticos sobre possíveis relações da atividade nos alvos presentes nas vias de sinalizações celulares e toxicidade oral para o fitocanabinóide majoritário do óleo de Cannabis medicinal, o Δ^9 -THC. A fórmula estrutural da molécula foi obtida pela plataforma do PubChem®.

4.3.2 Cultivo da linhagem celular SH-SY5Y de tumor de cérebro de humanos

As células de linhagem SH-SY5Y foram alocadas em garrafas de cultivo estéreis, juntamente com meio de cultivo celular DMEM/F12 (Sigma Aldrich) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1% (v/v) de antibiótico Penicilina/Estreptomicina, 1% (v/v), ajustando o pH em 7,4. As garrafas foram incubadas a 37°C em estufa de cultivo celular umidificada, contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂ até atingirem a confluência celular de 80%, monitorada por microscopia óptica e utilizadas para os testes (Zabeu *et al.*, 2022)

4.3.3 Viabilidade celular

No ensaio de MTT, as desidrogenases mitocondriais convertem o 3- (4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difeniltetrazol brometo (MTT), um sal solúvel de coloração amarela, em um produto de coloração roxa, o formazam (composto insolúvel) (Mosmann, 1983). A concentração do produto, o formazam, revela o índice de viabilidade celular, tendo em vista que corresponde a dosagem indireta do que foi metabolizado pelas enzimas mitocondriais das células viáveis (Gonçalves *et al.*, 2020).

4.3.4 Ensaio da citotoxicidade do Δ^9 -THC

Para esse ensaio, as linhagens tumorais de neuroblastoma SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 1×10^5 células/poço previamente mantidas em estufa de cultivo celular, a 37 °C, umidificada com 5% de CO₂. Dessa maneira, foram tratadas da seguinte forma Grupo I: óleo rico em Δ^9 -THC em diferentes concentrações em µg/mL; Grupo II: KCl (3M), utilizado como controle positivo de morte celular (100 % de morte celular); Grupo III: grupo não-tratado, apenas com meio de cultura, que foi o controle negativo (baseline). Os tempos de incubação foram de 24 horas em

estufa de cultivo celular umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C (Gonçalves *et al.*, 2020).

Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com tampão PBS 1X. Em seguida, as células foram tratadas com o reagente MTT (Sigma) a 5 mg/mL, ajustando-se a um volume final de 150 µL/poço com o mesmo tampão, e incubadas por 4 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e adicionado 100 µL do detergente DMSO (Sigma) para a solubilização dos cristais de formazan.

Em seguida, a placa foi submetida à leitura em aparelho espectrofotômetro de placas, tipo leitor de ELISA, na absorbância de (Y) 570 nm, e a partir daí, foi calculada a CI₅₀.

4.3.5 Determinação da CI₅₀ do L-glutamato

Para esse ensaio, as linhagens tumorais de neuroblastoma SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 1x10⁵ células/poço previamente mantidas em estufa de cultivo celular, a 37 °C, umidificada com 5% de CO₂. Dessa forma, foram tratadas da seguinte forma: Grupo I: diferentes concentrações do L-glutamato em mM; Grupo II: KCl (3M), utilizado como controle positivo de morte celular (100 % de morte celular); Grupo III: grupo não-tratado, apenas com meio de cultura, que foi o controle negativo (baseline). Os tempos de incubação foram de 24 horas em estufa de cultivo celular umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C (Oliveira *et al.*, 2019).

Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com tampão PBS 1X. Em seguida, as células foram tratadas com o reagente MTT a 5 mg/mL, ajustando-se a um volume final de 150 µL/poço com o mesmo tampão, e incubadas por 4 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e adicionado 100 µL do detergente DMSO para a solubilização dos cristais de formazan.

Em seguida, a placa foi submetida à leitura em aparelho espectrofotômetro de placas, tipo leitor de ELISA, na absorbância de (Y) 570 nm, e a partir daí, foi CI₅₀.

4.3.6 Ensaio da indução da excitotoxicidade pelo L-glutamato

Para esse ensaio, as linhagens tumorais de neuroblastoma SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 1×10^5 células/poço previamente mantidas em estufa de cultivo celular, a 37 °C, umidificada com 5% de CO₂. Dessa forma, foram tratadas da seguinte forma: Grupo I: induzido a excitotoxicidade pelo L-glutamato, durante 24h e após esse período tratados com diferentes concentrações do Δ^9 -THC em µg/mL; Grupo II: KCl (3M), utilizado como controle positivo de morte celular (100 % de morte celular); Grupo III: grupo não-tratado, apenas com meio de cultura, que foi o controle negativo (baseline). O tempo de incubação foi de 24 em estufa de cultivo celular umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C (Oliveira *et al.*, 2019).

Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com tampão PBS 1X. Em seguida, as células foram tratadas com o reagente MTT a 5 mg/mL, ajustando-se a um volume final de 150 µL/poço com o mesmo tampão, e incubadas por 4 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e adicionado 100 µL do detergente DMSO para a solubilização dos cristais de formazan.

Em seguida, a placa foi submetida à leitura em aparelho espectrofotômetro de placas, tipo leitor de ELISA, na absorbância de (Y) 570 nm, e a partir daí, foi calculada a concentração eficaz em 50% (CE₅₀) do THC para reverter o efeito excitotóxico do L-glut.

4.3.7 Bloqueadores farmacológicos

Para esse ensaio, as linhagens tumorais de neuroblastoma SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 1×10^5 células/poço previamente mantidas em estufa de cultivo celular, a 37 °C, umidificada com 5% de CO₂. Dessa forma, foram tratadas da seguinte forma: Grupo I: foi induzido a excitotoxicidade pelo L-glut (CI₅₀) durante o período de 24 horas e posteriormente tratados 30 minutos com bloqueadores farmacológicos para após a adição do Δ^9 -THC, sendo dividido nos seguintes subgrupos: a) apenas tratados com bloqueadores (AM630;CNQX; MK-801) b) tratados com bloqueadores e o Δ^9 -THC (CE₅₀) utilizado como controle positivo de morte celular (100 % de morte celular); Grupo II: KCl 3M; Grupo III: grupo

não-tratado, apenas com meio de cultura, que foi o controle negativo (baseline). Os tempos de incubação foram de 24 em estufa de cultivo celular umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C.

Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com tampão PBS 1X. Em seguida, as células foram tratadas com o reagente MTT (Sigma) a 5 mg/mL, ajustando-se a um volume final de 150 µL/poço com o mesmo tampão, e incubadas por 4 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e adicionado 100 µL do detergente DMSO (Sigma) para a solubilização dos cristais de formazan.

Em seguida, a placa foi submetida à leitura em aparelho espectrofotômetro de placas, tipo leitor de ELISA, na absorbância de (Y) 570 nm, e a partir daí, foi calculada a porcentagem de morte celular.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análises Computacionais *in silico*

A predição da toxicidade química foi realizada por meio da ferramenta computacional ProTox II, onde anexamos a molécula do composto de entrada, o Δ^9 -THC, na sua forma estrutural C₂₁H₃₀O₂ [(-)-(6aR,10aR)-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-ol] (IUPAC) com a finalidade de identificarmos previsões probabilísticas da sua toxicidade oral e celular. Sendo assim, o ProTox II gerou cálculos estatísticos os quais demonstraram para modelos de toxicidade oral, uma probabilidade de 93% não apresentar hepatotoxicidade e de se ligar às enzimas aromatases do grupo do citocromo P450, responsáveis pela mediação da aromatização de andrógenos em estrógenos.

Nessa perspectiva, as análises para toxicidade a nível celular, demonstraram uma baixa carcinogenicidade, mutagenicidade e citotoxicidade (probabilidade baixa de 16%) conforme. Além disso, a citotoxicidade apresentou estimativa de 99% para ligação com o Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM). Essa ativação pode sugerir uma influência na via de modulação do

estresse oxidativo celular, influenciando na sua capacidade ser citotoxicidade (Lu *et al.*, 2018).

Nessa perspectiva, em relação ao caráter citotóxico, a análise corrobora com os resultados dos ensaios *in vitro*, os quais demonstraram nos períodos de 24 horas de tratamento com óleo de *Cannabis* rico em Δ^9 -THC em baixas concentrações, um aumento da viabilidade celular, isso podendo sugerir uma possível atividade de proteção celular.

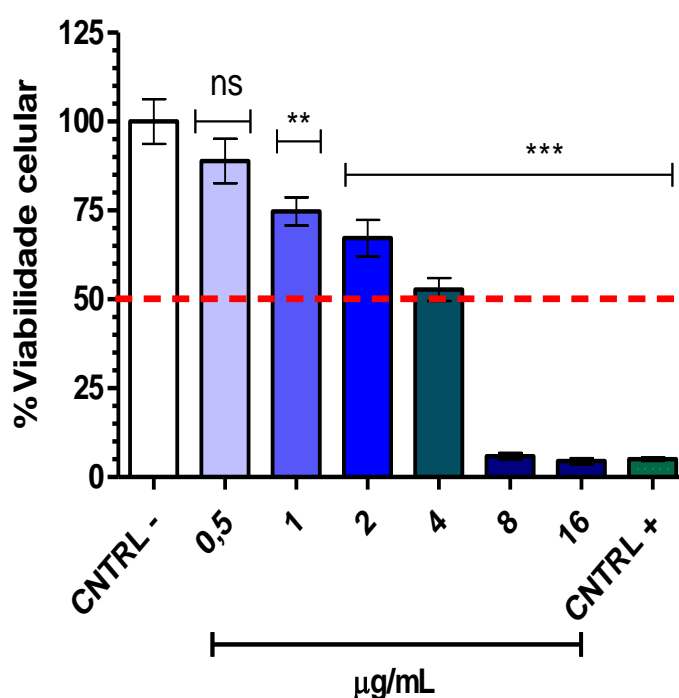
Figura 5 – Tabela criada com os dados da predição *in silico* do fitocanabinoide delta9-tetraidrocanabinol ($C_{21}H_{30}O_2$). Propriedades de classificação do programa ProTox II.

Alvo	Predição	% de probabilidade
Hepatotoxicidade	Inativo	93
Mutagenicidade	Inativo	77
Citotoxicidade	Inativo	84
Potencial de Membrana Mitocondrial	Ativo	99
Aromatase	Ativo	100

5.2 Avaliação da Citotoxicidade do Δ^9 -THC

A figura 6 demonstra a concentração-resposta das células de linhagem do tipo SH-SY5Y tratadas com óleo rico em Δ^9 -THC no período de 24 horas.

Figura 6 - **Concentração inibitória em 50% (CI_{50}) do Δ^9 -THC em células de linhagem do tipo SH-SY5Y tratadas durante o período de 24 horas.** As células foram incubadas com o Δ^9 -THC (0,5 a 16 $\mu\text{g/mL}$) e a viabilidade celular foi determinada pelo acúmulo dos cristais de formazam colorindo as células viáveis. KCl 3 M foi utilizado como controle positivo de morte celular. Como teste estatístico utilizou-se o ANOVA One-way, com pós-teste de Bonferroni. Os valores representam a média \pm SEM de cada experimento em triplicata ($n=3$). ns= não significativo. Os ensaios foram estatisticamente significativos quando comparados ao controle negativo de morte celular (Cntrl -) sendo *** $p<0,05$.



A concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ gerou uma taxa de sobrevivência de 88.92%, seguido por uma taxa de 74.74% e 67.19% nas concentrações de 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, quando comparados com o controle negativo para morte celular (células tratadas apenas com meio de cultura sem soro fetal bovino). A partir da concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$, houve uma redução da viabilidade celular de 54.48% até 4.48%. Portanto, a CI_{50} calculada foi de aproximadamente 2.993 $\mu\text{g/mL}$.

Nas concentrações de 4 até 16 $\mu\text{g/mL}$ houve uma redução na viabilidade celular de 55% até 4.48%, sugerindo que a morte das células é concentração

dependente. Nessa perspectiva, esse evento decorre do Δ^9 -THC apresentar atividade antitumoral, provavelmente em altas concentrações.

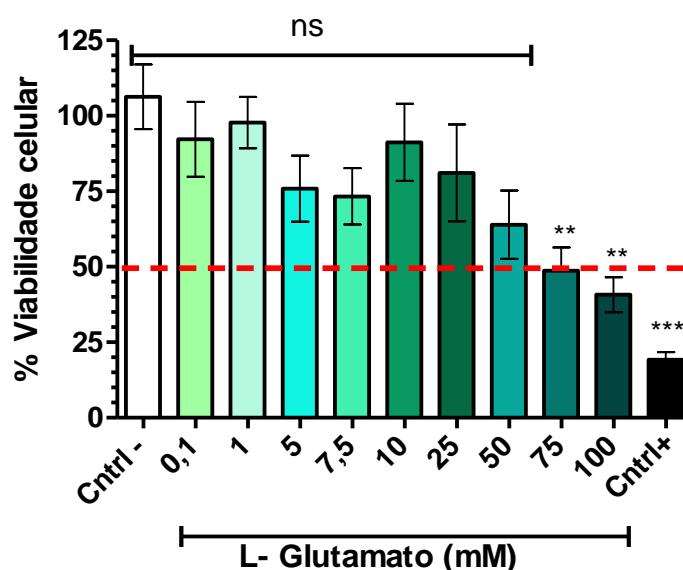
Ensaio *in vitro* realizados por Mohammadpour-Asl e col. (2023), utilizando diferentes concentrações de Δ^9 -THC para tratamento em células do tipo células de Sertoli, avaliadas por meio do ensaio por MTT, demonstraram que a substância reduziu a viabilidade celular das células de maneira dependente da concentração durante um período de 24 horas, assim, a CI_{50} determinada por eles foi de aproximadamente 10 μ M, corroborando com o presente estudo.

Outrossim, estudos recentes vêm evidenciando uma nova perspectiva farmacológica, o sinergismo entre os fitocanabinóides e outros metabólitos secundários como terpenos e flavonoides encontrados no extrato integral (*full spectrum*) da planta. Logo, o “feito comitiva” causado pelo óleo *full spectrum* pode corroborar para a atividade antitumoral (Ferber *et al.*, 2020).

5.3 Excitotoxicidade pelo L-Glutamato

A figura 7 demonstra o gráfico concentração-resposta, dos experimentos previamente realizados, das células de linhagem do tipo SH-SY5Y tratadas com diferentes concentrações (0,1 a 100 mM) do L-glutamato no período de 24 horas. Dessa maneira, a concentração de 1 até 25 mM gerou uma taxa de sobrevivência de 97,75% até 73,31% quando comparadas com o controle positivo para morte celular (células tratadas apenas com meio de cultura sem soro fetal bovino). A partir da concentração de 50mM houve uma redução da viabilidade celular de 63,91% até 40,73%, sendo a CI_{50} próxima a 75mM.

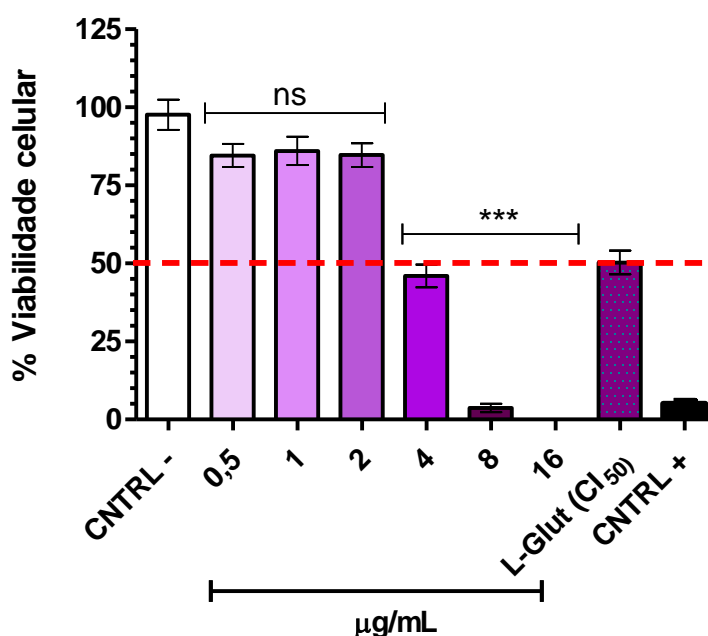
Figura 7 – CI_{50} do L-glutamato em células de linhagem do tipo SH-SY5Y tratadas durante o período de 24 horas. As células foram incubadas com diferentes concentrações do L-glut (de 0,1 a 100 mM) na linhagem de neuroblastoma de humano (SH-SY5Y) e a viabilidade celular foi determinada pelo acúmulo dos cristais de formazam colorindo as células viáveis. KCl 3 M foi utilizado como controle positivo de morte celular. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão de média (epm) por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste Dunnett ($p < 0,05$). Os ensaios foram estatisticamente significativos quando comparados ao controle negativo (Cntrl -), sendo ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Ensaio realizado por Oliveira e col. (2019), utilizaram um modelo celular de epilepsia *in vitro* em células de linhagem celular de neuroblastoma de humanos, do tipo SH-SY5Y, através da indução da excitotoxicidade pelo L-glut durante 24h de exposição. Logo, determinaram que a CI_{50} para L-glut foi de aproximadamente 80mM, portanto, corroborando com o presente estudo.

A figura 8 demonstra concentração-resposta das células de linhagem do tipo SH-SY5Y que foram induzidas à excitotoxicidade pelo L-glut durante 24h e posteriormente tratadas com diferentes concentrações do óleo rico em Δ^9 -THC (0,5 até 16 $\mu\text{g/mL}$) no período de 24h.

Figura 8 – Concentração eficaz em 50% (CE_{50}) do Δ^9 -THC em células de linhagem SH-SY5Y após a indução da excitotoxicidade pelo L-glut (CI_{50}), tratadas durante o período de 24 horas. As células foram incubadas com o Δ^9 -THC (0,5 a 16 $\mu\text{g/mL}$) e a viabilidade celular foi determinada pelo acúmulo dos cristais de formazam colorindo as células viáveis. KCl 3 M foi utilizado como controle positivo de morte celular. Como teste estatístico utilizou-se ANOVA One way, com pós-teste de Bonferroni. Os valores representam a média \pm SEM de cada experimento em triplicata ($n=3$). ns= não significativo. Os ensaios foram estatisticamente significativos quando comparados ao controle negativo (Cntrl -), sendo *** $p<0,05$.



A partir da concentração de 0,5 até 2 $\mu\text{g/mL}$ houve uma taxa de viabilidade celular de 84.72% até 86.04%, quando comparadas com o controle positivo para morte celular (células tratadas com meio de cultura sem soro fetal bovino). A partir da concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ houve uma redução da viabilidade celular de 46.01% até 0.87%, logo a contração eficaz 50% (CE_{50}) do Δ^9 -THC que conseguiu reverter o efeito excitotóxico do L-glut foi de aproximadamente 3.403 $\mu\text{g/mL}$.

Ensaio *in vitro* demonstrando as atividades neuroprotetoras do Δ^9 -THC com seu uso em diferentes neuropatologias estão cada vez mais frequentes, a exemplo do realizado por Carroll e col. (2012), no qual realizaram testes *in vitro*

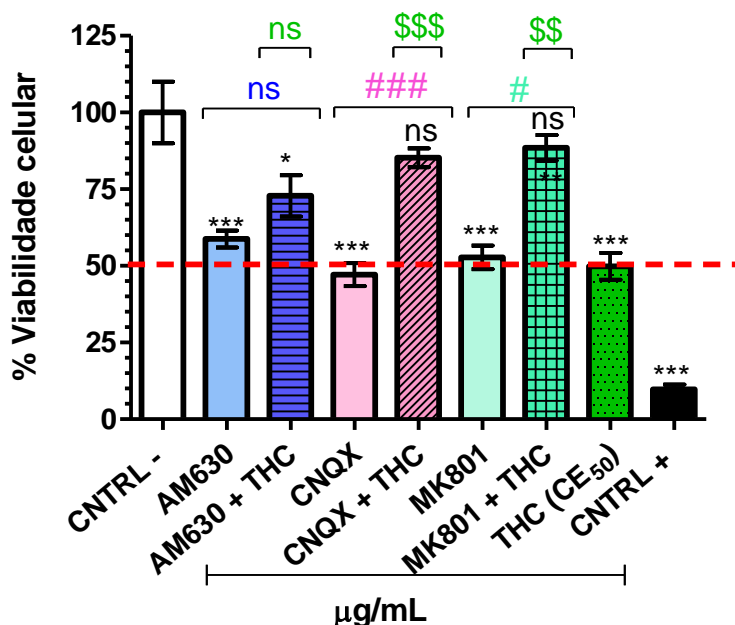
em células de linhagem do tipo SH-SY5Y induzidas pela Doença de Parkinson, observaram quando expostas as seguintes substâncias citotóxicas: 1-metil-4-fenilpiridínio - MPP +, paraquat e a lactacistina, e posteriormente administrado o Δ^9 -THC na concentração de 10 μ M, obtiveram um efeito neuroprotetor direto. Logo, houve reduções no estresse oxidativo e na apoptose, consequentemente, aumentando a viabilidade celular.

Nesse viés, posteriormente, o mesmo grupo evidenciou um importante papel neuroprotetor do Δ^9 -THC no processo de modulação da homeostase mitocondrial. Sendo assim, promovendo a prevenção para que não ocorra a diminuição da massa mitocondrial, por meio do aumento da expressão dos receptores PPAR γ -1- alfa, o qual está relacionado com a regulação do metabolismo e biogênese da organela, consequente prevenindo a diminuição da transcrição mitocondrial e indução da morte celular (Paes-Collin *et al.*, 2022).

5.4 Ensaio utilizando os bloqueadores farmacológicos

A figura 9 demonstra o efeito dos bloqueadores farmacológicos:AM630 (3.96 mM), CNQX (10 μ M), MK-801 (10 μ M) e do Δ^9 -THC (3,403 μ g/mL) após a indução da excitotoxicidade pelo L-glut, nas células de linhagem do tipo SH-SY5Y tratadas com diferentes concentrações após o período de 24 horas. As análises realizadas promoveram um comparativo entre os seguintes grupos: I) tratados apenas com bloqueadores e bloqueadores + Δ^9 -THC vs controle negativo; II) tratados com bloqueadores vs. bloqueadores + Δ^9 -THC; III) tratados com bloqueadores + Δ^9 -THC vs. apenas com Δ^9 -THC.

Figura 9 - **Efeito dos bloqueadores e do Δ^9 -THC após a excitotoxicidade induzida pelo L-glut em células de linhagem do tipo SH-SY5Y tratadas durante o período de 24 horas.** As células foram incubadas previamente com os bloqueadores farmacológicos, durante 30 minutos, em seguida expostas ao Δ^9 -THC (3.403 μ g/ml) para o tratamento durante 24h. A viabilidade celular foi determinada pelo acúmulo dos cristais de formazam colorindo as células viáveis. KCl 3 M foi utilizado como controle positivo de morte celular. Como teste estatístico utilizou-se ANOVA One-way, com com pós-teste de Bonferroni. Os valores representam a média \pm SEM de cada experimento em triplicata (n=3), ns= não significativo, CNTRL - = células não tratadas. As análises foram, foram estatisticamente significativos quando comparados entre os seguintes grupos: I) CNTRL - vs bloqueadores, sendo *** p<0.05; II) CNTRL - vs bloqueadores + Δ^9 -THC, sendo *** p<0.05; III) entre bloqueador vs. bloqueador + Δ^9 -THC, sendo ### p<0,05; IV) entre Δ^9 -THC (CE₅₀) vs bloqueadores + Δ^9 -THC, sendo \$\$\$ p<0,05.



Nessa perspectiva, para o grupo I, as células quando tratadas previamente com os bloqueadores AM630, CNQX e MK-801, e posteriormente com o Δ^9 -THC, apresentaram taxas de sobrevivência de 72.83%, 82.21% e 88.49% respectivamente, quando comparados com o controle negativo para

morte celular. As análises para grupo II demonstraram que apenas as células tratadas apenas com AM630 + Δ^9 -THC demonstraram serem significativas para morte quando as células foram tratadas apenas com os bloqueadores sem a presença do Δ^9 -THC. Por fim, o grupo III demonstrou também que apenas as células tratadas com AM630 + Δ^9 -THC não foram significativas quando comparado com o Δ^9 -THC (CE_{50}).

Essa ausência de resultados significativos para o grupo tratado com AM630 + Δ^9 -THC, sugere que a inibição do receptor CB2R não promove o mesmo efeito neuroprotetor quanto no CB1R, portanto sugerindo uma atividade neuroprotetora através da modulação da excitabilidade sináptica por meio desta via (Kibret, 2022).

Aquino (2024) relata estudos dos quais indicam que a ativação do CB1-R causa a hiperpolarização das membranas neuronais, o que regula as vias de transdução de sinal e modula a liberação de neurotransmissores, incluindo o L-glutamato, que é excitatório, e o GABA, que é inibitório, além de influenciar a liberação de citocinas.

Os resultados relacionados ao uso MK-801 junto ao Δ^9 -THC sugerem uma potencialização do efeito no bloqueio da via do receptor NMDA, promovendo um aumento de 52.73% para 88.49% na viabilidade das células. Nessa perspectiva, o uso do CNQX junto ao Δ^9 -THC também sugere uma potencialização do efeito da droga para o bloqueio da via do receptor AMPA e consequentemente nos receptores NMDA, promovendo um aumento de 47.09% para 85.21% na viabilidade celular. Após indução de excitotoxicidade, o uso dos bloqueadores isolados foi incapaz de reverter a toxicidade induzida pelo L-Glu. Contudo, quando o Δ^9 -THC foi adicionado ao bloqueador o efeito foi revertido em MK801+ Δ^9 -THC e em CNQX+ Δ^9 -THC, estando similar ao controle. Isso reflete que o THC pode estar agindo por uma via que não seria diretamente nos receptores ionotrópicos glutamatérgicos.

Outrossim, ao analisarmos o grupo III, identificamos que as células tratadas com os bloqueadores glutamatérgicos (CNQX e MK-801) juntos ao Δ^9 -THC quando comparadas com as células tratadas apenas com o Δ^9 -THC (CE_{50}), também houve um aumento significativo na viabilidade das células promovido

pelo sinergismo entre as substâncias, sugerindo mais uma vez a modulação pela mesma via.

Ambas as drogas citadas anteriormente atuam em receptores glutamatérgicos sendo moduladores da via. O MK-801 é um antagonista não-competitivo do receptor NMDA (Mabunga, 2019). Ele é utilizado em ensaios que apresentam como finalidade estudar o papel do glutamato na excitotoxicidade e em condições como a esquizofrenia, doenças neurodegenerativas e transtornos de humor. Contudo, o CNQX é um antagonista seletivo dos receptores de glutamato do tipo AMPA, responsável por bloquear a transmissão sináptica mediada por glutamato (Gagliardi, 2000). Quando comparado bloqueador vs bloqueador + THC oil, é nítido que o efeito do THC não é diretamente sobre o receptor de NMDA (MK801) e de AMPA/Cainato (CNQX), porém reduz o seu efeito quando o receptor CB2 está bloqueado (ns).

Nessa perspectiva, Δ^9 -THC possivelmente está ativando o receptor CB1R pré-sináptico, o qual é acoplado a proteínas $G_{i/o}$, podendo ocasionar dois possíveis efeitos. O primeiro, pode estar relacionado com a inibição de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, reduzindo o influxo desse íon intracelular, consequentemente, diminuindo exocitose do *L*-glutamato na fenda sináptica. Outro efeito possível, está relacionado com uma redução dos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), provocando uma menor ativação da proteína quinase A, que, por sua vez, afeta várias proteínas envolvidas na liberação de neurotransmissores, como o *L*-glut (Lutz, 2020).

Um estudo realizado por Shen e col. (1999), utilizando células presentes no hipocampo de ratos, cultivadas em cultura primária e tratadas com o Δ^9 -THC e com o bloqueador CNQX, demonstraram um sinergismo farmacológico entre as substâncias atuando na inibição da transmissão sináptica glutamatérgica. Em adição, constataram uma redução na concentração de Ca^{2+} intracelular, corroborando com os presentes achados.

Destarte, esses achados demonstram a correlação entre os sistemas glutamatérgico e endocanabinoide em tratamento das crises convulsivas apontando novos caminhos terapêuticos para essas alterações neurológicas.

6 CONCLUSÕES

Ademais, com os presentes resultados, pode-se concluir que o óleo medicinal *full spectrum* rico no fitocanabinóide Δ^9 -THC , o óleo ABRACE esperança verde 15 mg/ml - Linha Farmacêutica, possui reduzida atividade citotóxicas e uma atividade neuroprotetora em modelo de epilepsia *in vitro* em baixas concentrações frente à linhagem celular de neuroblastoma SH-SY5Y. Outrossim, o sinergismo farmacológico com os bloqueadores CNQX e MK-801 promovem uma potencialização dos efeitos neuroprotetores, possivelmente atuando nos receptores CB1R. Esses resultados são de crucial importância para posteriores estudos na perspectiva de progressão das pesquisas de novos agentes, antitumorais e neuroprotetores , para tratamentos mais eficazes contra neuropatologias que envolvam efeito neurotóxico.

REFERÊNCIAS

ADAMS, I. B.; MARTIN, B. R. *Cannabis*: farmacologia e toxicologia em animais e humanos. **Addiction, Abingdon**, v. 91, n. 11, p. 1585-1614, 1996.

<https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.1996.911115852.x>

ALVES, G. S. *et al.* The relationship between chronic stress and neurodegenerative diseases: insights from animal models. **Neuroscience**, v. 431, p. 153-164, 2020. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1157>

ANDRE, C. M. *et al.* Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa aprova mais três produtos de Cannabis para uso medicinal. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-mais-tres-produtos-de-Cannabis-para-uso-medicinal>.

AQUINO, Débora Nascimento de Aquino. Canabidiol (CBD) e Neuroproteção: Farmacoterapia promissora nos casos de epilepsia fármaco resistente. Cap.7, 551-570. **Educação Avançada**, 2021.

AQUINO, Débora Nascimento de. Avaliação Toxicológica não-clínica *in silico*, *in vivo* e subcrônica do extrato de *Cannabis sativa* rico em delta-9- Δ^9 -THC.

Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos

Bioativos/UFPB. Qualificação. 2024

BIEDLER, June L.; HELSON, Lawrence; SPENGLER, Barbara A. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. **Cancer Research**, v. 33, n. 11, p. 2643-2652, 1973.

CASTILLO, P. *et al.* Endocannabinoid signalling and synaptic function. **Neuron**, v. 76, p. 70-80, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.020>.

COLES, Madilyn *et al.* Propriedades terapêuticas de estratégias de tratamento multicanabinóides para a doença de Alzheimer. **Frontiers in Neuroscience**, p. 1-11, set. 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.020>.

DE OLIVEIRA, Marcos Roberto et al. Carnosic acid pretreatment attenuates mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y cells in an experimental model of glutamate-induced excitotoxicity. **Neurotoxicity Research**, v. 36, n. 3, p. 551-562, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00044-8>

FERBER, S. G. *et al.* O “efeito entourage”: terpenos juntos com canabinóides para o tratamento de transtornos de humor e transtornos de ansiedade. *Current Neuropharmacology*, p. 87-96, fev. 2020.

<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.962922>

FRAGUAS-SÁNCHEZ, Ana Isabel; TORRES-SUÁREZ, Ana Isabel. Medical use of cannabinoids. *Drugs*, v. 78, n. 16, p. 1665-1703, 29 out. 2018.

GARZON, Fernando *et al.* NeuroEPO preserves neurons from glutamate-induced excitotoxicity. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 65, n. 4, p. 1469-1483, 2018. DOI: 10.3233/JAD-180668

GAGLIARDI, Rubens José. Neuroprotection, excitotoxicity and nmda antagonists. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, [S.L.], v. 58, n. 2, p. 583-588, jun. 2000. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-282x2000000300030>.

GONÇALVES, Juan Carlos Ramos; SOBRAL, Marianna Vieira. Cultivo celular: da teoria à banca. *Editora UPFB*, v.1, 2020.

HONÓRIO, Káthia Maria; ARROIO, Agnaldo; SILVA, Albérico Borges Ferreira da. Aspectos terapêuticos de compostos da planta Cannabis sativa. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 318-325, abr. 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200024>

HOWLETT, A. *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews*, v. 54, p. 161-202, 2002. <http://dx.doi.org/10.1124/pr.54.2.161>.

HUANG, W.-J.; CHEN, W.-W.; ZHANG, X. Endocannabinoid system: role in depression, reward and pain control. *Molecular Medicine Reports*, v. 14, p. 2899-2903, 2016. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2016.5585>.

KENDALL, D.; YUDOWSKI, G. Cannabinoid receptors in the central nervous system: their signaling and roles in disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 10, p. 1-10, 2017. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00294>

KIBRET, B. G.; ISHIGURO, H.; HORIUCHI, Y.; ONAIVI, E. S. New insights and potential therapeutic targeting of CB2 cannabinoid receptors in CNS disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 975, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23020975>

KRUK-SLOMKA, M. *et al.*. Effects of FAAH inhibitors acute administration on the positive and cognitive symptoms of schizophrenia in mice. ***Molecular Neurobiology***, abr. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-019-1596-0>.

LAU, Anthony; TYMIANSKI, Michael. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. ***Pflügers Archiv: European Journal of Physiology***, v. 460, n. 2, p. 525-542, 2010. DOI: 10.1007/s00424-010-0809-1.

LUTZ, B. Neurobiology of cannabinoid receptor signaling. ***Dialogues in Clinical Neuroscience***, v. 22, n. 3, p. 207-222, 2020

MARSICANO, Giovanni *et al.* Receptores canabinoides CB1 e defesa sob demanda contra a excitotoxicidade. ***Science***, Nova Iorque, v. 302, n. 5642, p. 84-88, 2003. DOI: 10.1126/science.1088208.

MABUNGA, Darine Froy N. *et al.* Recapitulation of neuropsychiatric behavioral features in mice using acute low-dose MK-801 administration. ***Experimental Neurobiology***, v. 28, n. 6, p. 697-708, 2019. DOI: 10.5607/en.2019.28.6.697.

NETO, Pedro Antonio; PIERRO, Luiz Marcelo Chiarotto; FERNANDES, Sergio Tadeu. Cannabis: 12.000 anos de experiências e preconceitos. ***Brazilian Journal of Pain***, v. 6, n. 2, jun. 2023. GN1 Sistemas e Publicações Ltda. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/2595-0118.20230055-pt>.

MOHAMMADPOUR-ASL, Shadi *et al.* Avaliação *in vitro* da viabilidade celular e perfil de expressão de fatores de crescimento em células de Sertoli de camundongo expostas ao Delta-9-tetrahydrocannabinol: uma visão mecanicista sobre a toxicidade testicular induzida por canabinoides. ***BMC Pharmacology & Toxicology***, v. 24, n. 1, p. 61, 9 nov. 2023. DOI: 10.1186/s40360-023-00704-8.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. ***Journal of Immunological Methods***, p. 55-63, 1983.

OPAS, Organização Mundial Pan-Americana de Saúde. Mais da metade das pessoas com epilepsia na América Latina e no Caribe não recebem tratamento, 2019.

PACHER, P.; KOGAN, N. M. MECHOULAM, R. Além do Δ^9 -THC e dos endocanabinóides. ***Annual Review of Pharmacology and Toxicology***, p. 637-659, jan. 2020. DOI: [10.1146/annurev-pharmtox-010818-021441](https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021441)

PAES-COLLI, Yolanda *et al.* Phytocannabinoids and Cannabis-based products as alternative pharmacotherapy in neurodegenerative diseases: from hypothesis to clinical practice. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 16, art. 917164, 30 de maio de 2022. DOI: [10.3389/fncel.2022.917164](https://doi.org/10.3389/fncel.2022.917164).

PRESS, C. A. KNUPP, K. G.; CHAPMAN, K. E. Relato parental de resposta a extratos orais de Cannabis para tratamento de epilepsia refratária. **Epilepsy & Behavior**, v. 45, p. 49–52, 2015. DOI: [10.1016/j.yebeh.2015.02.043](https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.02.043)

PERTWEE, R. Targeting the endocannabinoid system with cannabinoid receptor agonists: pharmacological strategies and therapeutic possibilities. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, p. 3353-3363, 2012. doi: [10.1098/rstb.2011.0381](https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0381)

RUSSO, Ethan B. Taming Δ^9 -THC: potential Cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1344-1364, 2011. doi: [10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x)

RUSSO, E. Cannabis therapeutics and the future of neurology. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 12, p. 1-11, out. 2018. <https://doi.org/10.3389/fnint.2018.00051>

SAMPSON, P. B. Farmacologia dos fitocanabinóides: propriedades medicinais dos constituintes da *Cannabis sativa*, além dos “dois grandes”. **Journal of Natural Products**, v. 84, p. 142-160, 2020. DOI:[10.1021/acs.jnatprod.0c00965](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00965).

SHEN, Maoxing; THAYER, Stanley A. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol acts as a partial agonist to modulate glutamatergic synaptic transmission between rat hippocampal neurons in culture. **Molecular Pharmacology, Bethesda**, v. 55, n. 1, p. 8-13, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.55.1.8>

SMALL, Ernest. Classification of Cannabis sativa L. in Relation to Agricultural, Biotechnological, Medical and Recreational Utilization. *Cannabis sativa L. - Botany And Biotechnology*, p. 1-62, 2017. Springer International Publishing. DOI:[10.1007/978-3-319-54564-6_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_1)

SCATTON, B.. The NMDA receptor complex. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 7, n. 8, p. 389-400, nov. 1993. DOI:[10.1007/978-3-319-54564-6_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_1)

SMITH, T. *et al.* Cannabinoid receptor-interacting protein 1a modulates CB1 receptor signaling and regulation. ***Molecular Pharmacology***, v. 87, p. 747-765, 2015. DOI: [10.1124/mol.114.096495](https://doi.org/10.1124/mol.114.096495)

SOMMANO, Sarana Rose *et al.* The Cannabis Terpenes. ***Molecules, Basel***, v. 25, n. 24, p. 5792, 8 dez. 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25245792>

TELEANU, Raluca Ioana *et al.* Neurotransmissores: fatores-chave em distúrbios neurológicos e neurodegenerativos do sistema nervoso central. ***Revista Internacional de Ciências Moleculares***, v. 23, n. 11, p. 5954, 25 maio 2022. DOI: 10.3390/ijms2311595.

XIE, H. *et al.* SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. ***Chinese Medical Journal***, v. 123, n. 8, p. 1086-1092, 2010. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.08.021

ZABEU, Antonieta Marques Caldeira; ROSSATO, Rafaella; SOARES, Cristina Pacheco; SILVA, Newton Soares da. Estresse oxidativo em células de linhagem do tipo SH-SY5Ydiante da exposição ao peróxido de hidrogênio. ***Research, Society And Development***, v. 11, n. 3, p. 1-13, 22 fev. 2022 DOI:[10.33448/rsd-v11i3.26474](https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26474)