

## EFEITOS DO THC E CBD OBTIDOS ATRAVÉS DA ASSOCIAÇÃO ABRACAM A SUSCETIBILIDADE À ABERTURA DO PORO DE TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL (mPTP), INDUZIDA POR CÁLCIO, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE PILOCARPINA OU 6-OHDA

<sup>1</sup> Ludmila Araújo Rodrigues Lima; <sup>2</sup> Pedro Everson Alexandre de Aquino; <sup>3</sup> Hebert T. Facundo; <sup>4</sup> Glauce Socorro de Barros Viana

<sup>1</sup> Pós-graduanda em Ciências Morfofuncionais pela Universidade Federal do Ceará – UFC; <sup>2</sup> Doutor em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará – UFC; <sup>3</sup> Professor da Universidade Federal do Cariri - UFCA; <sup>4</sup> Professora da Universidade Federal do Ceará – UFC.

**Área temática:** Temas transversais

**Modalidade:** Comunicação Oral

**E-mail do autor:** ludmilaaarlima@gmail.com

### RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) e o canabidiol (CBD) são os principais compostos farmacologicamente ativos da Cannabis sativa L. Esses compostos apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e atividade neuroprotetora. As mitocôndrias são atores críticos envolvidos tanto na vida quanto na morte celular através de múltiplas vias. A integridade estrutural, o metabolismo e a função das mitocôndrias são regulados pelo volume da matriz devido a alterações fisiológicas da homeostase iônica no citoplasma celular e nas mitocôndrias. O inchaço excessivo da matriz mitocondrial associado à abertura sustentada do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) compromete a função e a integridade mitocondrial, levando à morte celular. **OBJETIVO:** avaliar os efeitos do THC e do CBD no *swelling* de mitocôndrias cerebrais, a fim de investigar a suscetibilidade à abertura dos PTP, induzida por cálcio, na presença e ausência de neurotoxinas, pilocarpina ou 6-hidroxidopamina (6-OHDA). **MÉTODOS:** Para a extração das mitocôndrias cerebrais utilizou-se ratos *Wistar*, machos. Após o isolamento das mitocôndrias foi realizada a análise do *swelling* mitocondrial *in vitro*. **RESULTADOS:** Os dados obtidos no estudo demonstram que as neurotoxinas, 6-OHDA e pilocarpina, promovem aumento significativo no *swelling* mitocondrial, ao passo que a adição de CBD e THC, em pool mitocondrial que continham um dos agentes estressores, desencadeou redução do inchamento mitocondrial. **CONCLUSÃO:** Evidencia-se que o THC e o CBD promovem a inibição do mPTP, diminuindo o inchamento mitocondrial excessivo. Com base nesses resultados, levantou-se a hipótese de que ambas as substâncias podem agir como potencial agente terapêutico para o combate da disfunção mitocondrial de doenças neurodegenerativas.

**Palavras-chave:** Tetrahydrocannabinol, Canabidiol, Mitocôndrias.

### 1 INTRODUÇÃO

Além da função canônica de síntese de ATP, as mitocôndrias, são o epicentro de muitas vias metabólicas e diversas funções celulares importantes, tais como: homeostase do cálcio, metabolismo dos lipídios, sinalização de espécies reativas de oxigênio (ROS) e defesas antioxidantes, regulação de

canais iônicos e excitose, síntese e degradação de neurotransmissores e regulação da morte celular (DIMAURO; SCHON, 2003; FLIPPO; STRACK, 2017; GOLPICH et al., 2017).

O cérebro humano apesar de constituir apenas 2% do peso corporal, requer 20% da produção metabólica de ATP (trifosfato de adenosina). Tamanho demanda energética se relaciona com a manutenção das funções celulares normais, mas, em particular, para a restauração dos gradientes iônicos para permitir potenciais de ação, neurotransmissão, fornecer a maquinaria para plasticidade sináptica e manutenção das membranas celulares saudáveis e funcionais ao longo de axônios e dendritos (ATTWELL; LAUGHLIN, 2001; GODOY et al., 2021).

Apesar da miríade de mecanismos patogênicos, a disfunção mitocondrial, evidencie-se como um mecanismo biomolecular associada ao aumento da morte celular e à degeneração neural, relacionando-se com a etiopatogenia de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson (DP) e epilepsia (BORDONE et al., 2019; GOLPICH et al., 2017; SHENG et al., 2012).

A disfunção mitocondrial é caracterizada pela diminuição da expressão de proteínas de fosforilação oxidativa, prejuízos ao potencial de membrana mitocondrial, redução na síntese de ATP, bem como, fissão mitocondrial aumentada, produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e liberação de citocromo c. As mitocôndrias respondem a diferentes tipos de agentes estressores, incluindo o estresse oxidativo e metabólico. Ademais, a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , juntamente com altas concentrações de ROS e Pi, promove alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, via indução da abertura dos poros de transição de permeabilidade (mPTP), desencadeando aumento do volume da matriz mitocondrial. É importante salientar que o inchaço excessivo da matriz mitocondrial compromete a função bioenergética e a integridade estrutural das mitocôndrias, levando à morte celular (HALESTRAP et al., 1998; RASOLA; BERNARDI, 2011).

A cannabis (*Cannabis sativa* L.) é conhecida e utilizada desde a antiguidade. Nos últimos anos, moléculas de canabinóides, como o canabidiol (CBD) e o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), têm chamado atenção da comunidade científica, especialmente devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antiepiléticos, analgésicos e atividade neuroprotetor (ATALAY; JAROCKA-KARPOWICZ; SKRZYDLEWSKA, 2019; DAWIDOWICZ; OLSZOWY-TOMCZYK; TYPEK, 2021; HACKE, et al., 2019; VAN DEN ELSSEN et al., 2014).

Em vista deste panorama a presente pesquisa objetiva avaliar os efeitos do THC e do CDB no *swelling* de mitocôndrias cerebrais, a fim de investigar a suscetibilidade à abertura do mPTP, induzida por cálcio, na presença e ausência de neurotoxinas, pilocarpina ou 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

## 2 MÉTODO

### Animais

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos, com peso variando entre 250-300g provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. A escolha de utilizar animais machos para a condução do presente estudo é baseada nas evidências do papel neuroprotetor do estrógeno nas fêmeas, bem como nas evidências que sugerem que os genes dos cromossomos sexuais contribuem para o viés masculino na DP (LEE et al., 2019). Para os cuidados com os animais, esta pesquisa seguiu os princípios éticos da experimentação animal instituído pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os animais foram manuseados gentilmente por pesquisador treinado. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA), com protocolo sob nº 291012200.

### Protocolo experimental

O estudo contou com uma amostra de 3 ratos machos. Após o isolamento, o pool mitocondrial foi exposto a diferentes concentrações de solução de THC e CDB (0, 1, 5 ou 10 µg/mL) e/ou 6-OHDA (1 µg/mL) e/ou pilocarpina (1 µg/mL), durante um minuto. Em seguida, realizou-se o protocolo de avaliação do *swelling* mitocondrial.

### Isolamento Mitocondrial

Os animais foram sacrificados, por decapitação com guilhotina (Harvard, USA), sendo o encéfalo do animal retirado rapidamente. Logo em seguida, a estrutura foi acomodada sobre placa de gelo, para então isolar-se o cérebro, sendo em seguida o material submetido ao protocolo de isolamento mitocondrial, conforme descrito por Tahara e colaboradores (2009). A concentração de proteína mitocondrial foi determinada espectrofotometricamente de acordo com protocolo de Bradford (1976), com BSA como padrão.

### *Swelling* mitocondrial

As alterações na dispersão da luz devido à absorção e inchaço via influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  foram medidas através da diminuição, ao longo do tempo, da densidade óptica, aferida por

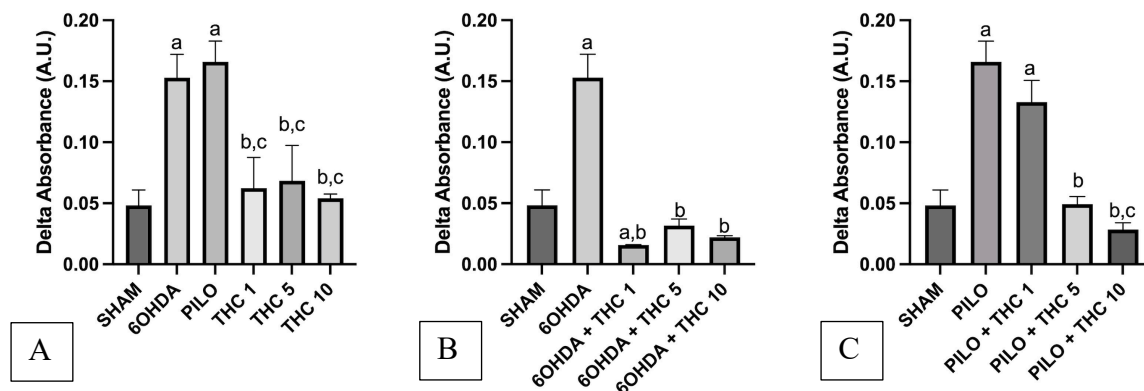
espectrofotometria e em comprimento de onda de 540 nm. O pool mitocondrial foi incubado em tampão contendo 150mM de KCl, 10mM de Hepes, 2mM de succinato, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 2mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1µg/mL de oligomicina, pH 7,2 (KOH). Para induzir a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, adicionou-se 2µM de Ca<sup>2+</sup>. Salienta-se que a dispersão de luz foi aferida por 5 minutos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suscetibilidade à abertura do mPTP foi avaliada através da análise de variação da absorbância da suspensão mitocondrial induzida por cálcio, onde a diminuição da absorbância indica uma intensificação do inchamento mitocondrial. Nos resultados apresentados na figura 1 e 2, podemos observar que tanto a adição de 6-OHDA como de pilocarpina, neurotoxinas utilizadas em modelos experimentais para DP e epilepsia, respectivamente, provocam aumento drástico no *swelling* mitocondrial, em comparação ao grupo controle. Mudanças no volume mitocondrial ocorrem em resposta a alterações no equilíbrio redox e energéticos da célula. O *swelling* mitocondrial, desencadeado pelo mPTP, é impulsionado pela pressão coloidosmótica conferindo um alto gradiente osmótico através da membrana mitocondrial interna. Além do Ca<sup>2+</sup>, a abertura do mPTP depende do pH, do potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) e do estado redox da célula (BERNARDI; DI LISA, 2015; HALESTRAP et al., 1998; JAVADOV et al., 2009), sendo o inchaço mitocondrial excessivo, um mediador importante da morte celular (KUSHNAREVA; SOKOLOVE, 2000; MCCOMIS et al., 2011).

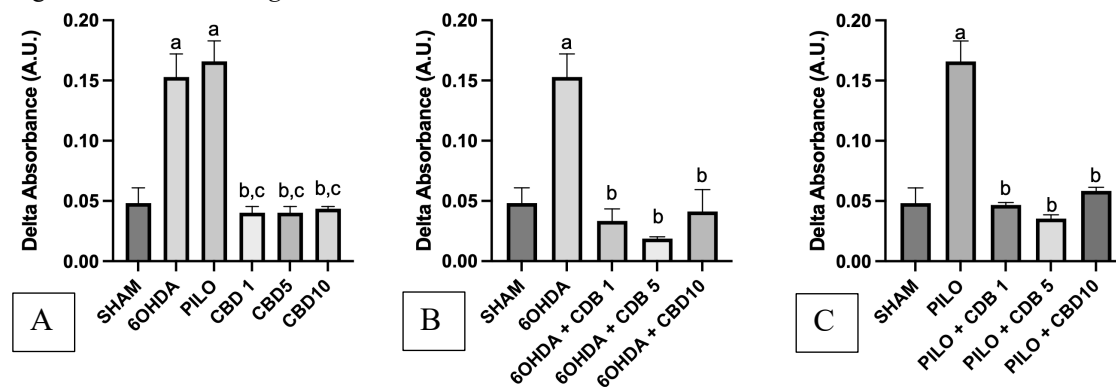
No entanto, a adição de THC (figura 1) ou de CBD (figura 2) em suspensões de mitocôndrias com 6-OHDA ou pilocarpina apresentaram redução significativa do inchaço mitocondrial, em comparação com as amostras que continham somente as neurotoxinas, indicando assim diminuição a suscetibilidade à abertura do mPTP. Nas amostras livres das neurotoxinas a adição de THC ou CBD não desencadeou mudanças significativas ao *swelling* mitocondrial. Ryan et al. (2009), evidencia que condições patológicas envolvendo disfunção mitocondrial e desregulação do Ca<sup>2+</sup>, o CBD pode ser benéfico na prevenção da sinalização apoptótica, via restauração da homeostase do Ca<sup>2+</sup>.

Figura 1: THC e swelling mitochondrial



Legenda: Efeitos do THC no *swelling* mitocondrial *in vitro* de mitocôndrias extraídas de cérebro de ratos (3 animais), na ausência (A) ou na presença de 6-OHDA (B) ou de pilocarpina (C). **A:** a. vs. SHAM; b. vs. 6-OHDA; c. vs. PILO (pilocarpina),  $p < 0,05$ . **B:** a. vs. SHAM; b. vs. 6-OHDA,  $p < 0,05$ . **C:** a. vs. SHAM; b. vs. PILO; c. vs. PILO + THC1,  $p < 0,05$ . One-way ANOVA e Tukey para comparações múltiplas como teste post hoc.

Figura 2: CBD e swelling mitocondrial



Legenda:

Efeitos do CBD no *swelling* mitocondrial *in vitro* de mitocôndrias extraídas de cérebro de ratos (3 animais), na ausência (A) ou na presença de 6-OHDA (B) ou de pilocarpina (C). **A:** a. vs. SHAM; b. vs. 6-OHDA; c. vs. PILO (pilocarpina),  $p < 0,05$ . **B:** a. vs. SHAM; b. vs. 6-OHDA,  $p < 0,05$ . **C:** a. vs. SHAM; b. vs. PILO,  $p < 0,05$ . One-way ANOVA e Tukey para comparações múltiplas como teste post hoc.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente estudo sugerem os efeitos biologicamente relevantes do THC e CBD no funcionamento mitocondrial, uma vez que quando adicionado em amostras adicionadas de neurotoxinas, esses promoveram o apacamento do inchamento mitocondrial. Todavia, destaca-se a necessidade de novas pesquisas que adicionem dados ainda mais robustos sobre os efeitos do THC e CBD na função mitocondrial e sua atuação em doenças neurodegenerativas.

## REFERÊNCIAS

- ATALAY S., JAROCKA-KARPOWICZ I., SKRZYDLEWSKA E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants*. v.9, p21-1. 2019.
- ATTWELL D, LAUGHLIN SB. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. v.2, p.1133–45, 2001.
- BERNARDI P, DI LISA F. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* v.78, p.100–106, 2015.
- BORDONE MP, et al. The energetic brain - A review from students to students. *J. Neurochem* v.151, p.139–165, 2019.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Biochemistry* v.72, p.248–254, 2016.
- DAWIDOWICZ A.L., OLSZOWY-TOMCZYK M., TYPEK R. CBG, CBD, Δ9-THC, CBN, CBGA, CBDA and Δ9-THCA as antioxidant agents and their intervention abilities in antioxidant action. *Fitoterapia*. p152-104915, 2021.
- DIMAURO S, SCHON EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med*. v.348, p.2656-68, 2003.
- FLIPPO KH, STRACK S. Mitochondrial dynamics in neuronal injury, development and plasticity. *J Cell Sci*. 130, p.671-681, 2011.
- GODOY JA, et al. Mitostasis, Calcium and Free Radicals in Health, Aging and Neurodegeneration. *Biomolecules*. v10,p.117-112, 2016.
- GOLPICH M, et al. Mitochondrial dysfunction and biogenesis in neurodegenerative diseases: pathogenesis and treatment. *CNS Neurosci Ther* v.23, p.5–22, 2017.
- HACKE A.C.M., et al. Probing the antioxidant activity of Δ(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in Cannabis sativa extracts. *Analyst*. v.144, p.4952–4961, 2019.
- HALESTRAP AP., et al. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* v.1366, 79–94.1998.
- JAVADOV S, KARMAZYN M, ESCOBALES N. Mitochondrial permeability transition pore opening as a promising therapeutic target in cardiac diseases. *J Pharmacol Exp Ther* v.330, p.670–678, 2009.
- LEE, J., et al. Sex-specific neuroprotection by inhibition of the Y-chromosome gene, SRY, in experimental Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am*. v.116, p.16577–16582, 2019.
- RASOLA A, BERNARDI P. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*. v.50, p.222–233, 2011.
- RYAN D, et al. Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. *J Neurosci*. v.29, p.2053-63, 2009.
- SHENG B., et al. Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Neurochem* v.120, p.419–429, 2012.
- TAHARA, E.B., NAVARETE, F.D.T., KOWALTOWSKI, A.J., 2009. Tissue, substrate, and site specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic. Biol. Med*. v.46, p.1283–1297.
- VAN DEN ELSEN G.A., et al. Efficacy and safety of medical cannabinoids in older subjects: A systematic review. *Ageing Res. Rev*. p.14:56–64, 2014.