

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ANÍSIA SOFIA MOTA BARROS

**Efeitos da Interleucina-1 β na plasticidade de neurônios diferenciados da linhagem
de neuroblastoma humano SH-SY5Y**

Ribeirão Preto- SP

2024

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ANÍSIA SOFIA MOTA BARROS

**Efeitos da Interleucina-1 β na plasticidade de neurônios diferenciados da linhagem
de neuroblastoma humano SH-SY5Y**

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da
Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da
USP (BDTD)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Francesca
de Souza Lisboa

Ribeirão Preto- SP

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Barros, Anísia Sofia Mota.

Efeitos da Interleucina-1 β na plasticidade de neurônios diferenciados da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y/ Anísia Sofia Mota Barros; orientadora: Sabrina Francesca de Souza Lisboa. Ribeirão Preto, 2024.

87 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

1. Neuroinflamação; 2. Neuroplasticidade; 3. Endocanabinoides; 4. IL-1 β ; 5. SHSY-5Y.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BARROS, Anísia Sofia Mota.

Título: Efeitos da Interleucina-1 β na plasticidade de neurônios diferenciados da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovado em: ___ / ___ / ___

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dra.: Sabrina Francesca de Souza Lisboa.

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP - USP).

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho a todos as(os) professoras(es) que repassam seu conhecimento com humildade. Dedico este trabalho a todos que ensinam com amor.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Sabrina Lisboa, pela oportunidade de Mestrado em seu laboratório. Obrigada pela confiança, paciência e por ter me recebido mesmo sabendo que eu era inexperiente na área de Neurociências.

Ao professor Thiago Cunha, pela disponibilização da interleucina utilizada no presente trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, em especial à Gislaine Pedroso e ao Waldick Ramon. Agradeço pela competência e profissionalismo de ambos ao lidarem com as questões burocráticas e administrativas da pós-graduação em Farmacologia.

À Nathalia Reges, por ter me auxiliado nos primeiros passos que dei na cultura celular e por me auxiliar a desenvolver ideias para o meu projeto mesmo de longe. Agradeço imensamente a paciência que ela teve comigo.

Ao professor Adriano Sebollela, por ter me recebido no seu laboratório e pela doação das células SH-SY5Y utilizadas no presente trabalho. Agradeço também aos discentes pertencentes ao Sebollelab pela recepção, em especial à Raquel Maria e Valentine Spagnol.

Ao corpo técnico da USP, em especial à Flávia Sallata e à Miriam Coutinho, pela ajuda durante o desenvolvimento do projeto. Agradeço também à técnica Silvana Silva, pela confiança e por ter me recebido tão bem no laboratório do professor Adriano.

Aos técnicos que auxiliaram na obtenção das imagens do presente estudo, Eduardo Tozzato e Elizabete Milani. Obrigada pela dedicação e persistência em conseguir belas imagens para as pesquisas dos alunos.

Às pós-docs do laboratório de Neuropsicofarmacologia, Izabela Vatanabe e Erika Meyer, que seguraram as pontas enquanto a professora Sabrina estava de licença maternidade. Elas auxiliaram todos com ética e firmeza. No futuro, serão grandes orientadoras.

Aos colegas de laboratório, Yurie Sato, Thales Andrade, Sávio Bastos, Arthur Coelho, Júlia Bilibio, Gabriela Silote, Laura Colete, Bruna Felipe, Livea Godoy e Letícia Vieira, pelas ajudas disponibilizadas no dia-a-dia do laboratório.

Aos iniciantes científicos do laboratório, Antônio Romano, Lorena Couvre, Anna Amorim, Karen Barbosa, Isabela Pavan e Maria Luiza Novelli. Agradeço pelos auxílios e momentos de descontração. Saibam que se seguirem na área da pesquisa, serão cientistas incríveis.

À Mylena Magalhães, pela valiosa amizade que temos e pelos conselhos. Nos momentos mais difíceis da minha trajetória de mestrado, recorri a ela. Ao Arlindo César, pela amizade e pelo auxílio nas estatísticas feitas no presente trabalho.

Ao laboratório da professora Michelle Mazzaron, onde fiz muitos experimentos de *Western blotting* e revelei muitas membranas. Agradeço à Evellin Karina, Marcela Maria, Elielma Noronha, Leandro Manoel, Ruan Oliveira, Viviano Neves e Priscila Carreiro, com as quais compartilhei bons momentos e vários almoços no bandejão. Agradeço também à técnica Giuliana Bertozzi, pela recepção e prestatividade no laboratório da professora Michelle.

À minha família, que me espera no Pará. À minha mãe, Edilene Castro, que renunciou a si mesma pela vida dos filhos. Obrigada por tudo que fez pela minha educação e pelo imenso amor que me deu. Ao meu irmão, Osvaldo Neto, que me ensina muito sobre paciência e amor. À minha avó, Raimunda, por todas às orações pelo meu sucesso.

À Mabel Chaves e ao Gregory Isaac, que torcem por mim. À Nadine Chaves, minha melhor amiga, que me compreende como ninguém e me proporciona as melhores risadas.

Aos amigos que deixei no Pará, Léo, Larissa, Kaio, Athos, Ivson, Willy, Marcelo, Wallice, Cleyson, Cristian Kallahan, Alasse, Gabriel, Anne, Cláudia, Any, Eloá e Dona Lucelena. Agradeço especialmente ao meu amigo e irmão de outra mãe, Ruan Felipe, por todas as conversas, apoio, incentivos, conselhos, por torcer por mim e por permanecer ao meu lado, mesmo distante, com sua fiel e inabalável amizade.

Aos meus sogros, Lucilene Ramos e Anderson Resque, que sempre apoiam e incentivam meu crescimento profissional.

Ao meu companheiro de vida e melhor amigo, Luan Resque, que está ao meu lado desde a graduação em Farmácia. Obrigada por ter embarcado nessa aventura comigo. Tudo seria

imensante mais difícil sem você nessa jornada. As conquistas que obti nesse mestrado são suas também.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento das pesquisas no laboratório. Às bolsas de estudo disponibilizadas pela CNPq e FAPESP (Processo n° 2022/10801-0), que permitiram que eu realizasse o meu sonho de criança: ser independente.

“Não se pode aprender nada de uma lição que não seja acompanhada por dor, já que não se pode conseguir nada sem um sacrifício. Mas quando você aguenta essa dor e a supera, você consegue um coração forte que não perde pra nada. Isso mesmo, um coração de aço.”

Hiromu Arakawa- *Fullmetal Alchemist*

RESUMO

Barros, A. S. M. **Efeitos da Interleucina-1 β na plasticidade de neurônios diferenciados da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y.** 87 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

A neuroinflamação é um processo inflamatório que ocorre no Sistema Nervoso Central (SNC) frente à estímulos agressivos. Embora envolva uma via protetiva, o efeito gerado pode ser tóxico, visto que a neuroinflamação envolve a ativação de micróglia, o que pode acarretar o aumento da liberação de uma série de compostos potencialmente neurotóxicos, como a Interleucina-1 β (IL-1 β). Quando em níveis elevados e em quadros crônicos de neuroinflamação, tal interleucina torna-se excitotóxica. Nesse sentido, o Sistema Endocanabinoide (SECB) pode atuar como uma importante entidade neuroprotetora, capaz de impedir ou atrasar a perda neuronal ocasionada pela IL-1 β . Estudos anteriores realizados em modelos animais demonstram que a IL-1 β pode afetar componentes do SECB e da neuroplasticidade, trazendo à tona a importância de entender os efeitos desta citocina em modelos celulares humanos. A partir disso, foram investigados os efeitos da IL-1 β (0.01, 0.1, 1, 10 ng/mL) na neuroplasticidade e nos componentes do SECB em células da linhagem SH-SY5Y diferenciadas em um fenótipo neuronal maduro. Os dados obtidos por meio da padronização do protocolo de diferenciação das células SH-SY5Y em neurônios maduros revelou que a diferenciação celular de 8 dias com ácido retinoico (AR, 10 μ m) e com fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, 50 ng/mL) ocasionou mudança morfológica, levando ao surgimento de um aspecto alongado dos neurônios e grandes extensões neuríticas. Além disso, o processo de diferenciação levou a uma maior expressão de β III-tubulina, receptor D1 e *Neuronal Nuclei* (NeuN), assim como tornou as células diferenciadas mais sensíveis ao estímulo inflamatório lipopolissacarídeo (LPS, 1, 10, 20, 40, 80, 160, 320 e 640 μ g/mL). As células diferenciadas não apresentaram alterações na expressão de N-metil D-aspartato (NMDAR1) e Tirosina Hidroxilase (TH). Ainda, a exposição dos neurônios diferenciados à IL-1 β não alterou a viabilidade celular. Em células diferenciadas, após aplicação de diferentes concentrações de IL-1 β , não houve alterações na expressão de Tirosina Quinase B (TrKB) total e um perfil de aumento foi observado na expressão de sinaptofisina após aplicação de 0.01, 1 e 10 ng/mL de IL-1 β . Além disso, as diferentes concentrações de IL-1 β não modificaram a expressão de β III-

tubulina e a quantidade de células. Outrossim, houve redução no comprimento dos neuritos primários após aplicação de 10 ng/mL de IL-1 β . Também foi verificado uma redução na expressão de actina após aplicação de IL-1 β (0.1 e 10 ng/mL) nas células. Ademais, o tratamento com a IL-1 β (1 e 10 ng/mL) levou a um aumento significativo na expressão de receptor CB1, assim como 0.1 ng/mL da interleucina levou a uma redução na expressão de receptor vaniloide de potencial transitório tipo 1 (TRPV1). O tratamento com 0.1, 1 e 10 ng/mL de IL-1 β levou a redução na expressão de hidrolase amida de ácidos graxos (FAAH) e a aplicação de 0.01, 0.1 e 1 ng/mL da interleucina reduziu a expressão de lipase monoacilglicerol (MAGL). Nossos resultados sugerem que as concentrações de IL-1 β utilizadas podem estar acarretando um possível mecanismo de neuroproteção que envolve o SECB. Portanto, maiores investigações deverão ser realizadas para melhor entender os efeitos da IL-1 β .

Palavras-chave: Neuroinflamação; Neuroplasticidade; Endocanabinoides; IL-1 β .

ABSTRACT

Barros, A. S. M. **Effects of Interleukin-1 β on the plasticity of differentiated neurons from the human neuroblastoma lineage SH-SY5Y.** 87 p. Dissertation (Master's) - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

Neuroinflammation is an inflammatory process that occurs in the Central Nervous System (CNS) when exposed to aggressive stimuli. Although it involves a protective pathway, the effect generated can be toxic, since neuroinflammation involves the activation of microglia, which can lead to increased release of a series of neurotoxic compounds, such as Interleukin-1 β (IL-1 β). When at high levels and in chronic cases of neuroinflammation, such interleukin becomes excitotoxic. In this sense, the Endocannabinoid System (ECS) can act as an important neuroprotective entity, capable of preventing or delaying neuronal loss caused by IL-1 β . Previous studies carried out in animal models demonstrate that IL-1 β can affect components of the SECB and neuroplasticity, highlighting the importance of understanding the effects of this cytokine in human cellular models. From this, the effects of IL-1 β (0.01, 0.1, 1, 10 ng/mL) on neuroplasticity and our SECB components in cells of the SH-SY5Y lineage differentiated into a mature neuronal phenotype were investigated. Data obtained through standardization of the differentiation protocol of SH-SY5Y cells into mature neurons revealed that 8-day cell differentiation with retinoic acid (RA, 10 μ m) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF, 50 ng/mL) caused morphological changes, leading to the appearance of an elongated appearance of neurons and large neuritic extensions. Furthermore, the differentiation process led to a greater expression of β III-tubulin, D1 receptor and Neuronal Nuclei (NeuN), as well as the differentiated cells becoming more sensitive to an inflammatory stimulus lipopolysaccharide (LPS, 1, 10, 20, 40, 80, 160, 320 and 640 μ g/mL). The differentiated cells did not show changes in the expression of N-methyl D-aspartate (NMDAR1) and Tyrosine Hydroxylase (TH). Still, exposure of differentiated neurons to IL-1 β did not alter cellular choices. In differentiated cells, after application of different concentrations of IL-1 β , there were no changes in the expression of total Tyrosine Kinase B (TrKB) and an increase profile was presented in the expression of synaptophysin after application of 0.01, 1 and 10 ng/mL of IL-1 β . Furthermore, the different concentrations of IL-1 β did not modify the expression of β III-tubulin and the number of cells. Furthermore, there was a reduction in the length of primary neurites after application of 10 ng/mL of IL-1 β . A

reduction in actin expression was also observed after application of IL-1 β (0.1 and 10 ng/mL) to the cells. Furthermore, treatment with IL-1 β (1 and 10 ng/mL) led to a significant increase in the expression of the CB1 receptor, just as 0.1 ng/mL of interleukin led to a reduction in the expression of the potential vanilloid receptor transient type 1 (TRPV1). Treatment with 0.1, 1 and 10 ng/mL of IL-1 β led to a reduction in the expression of fatty acid amide hydrolase (FAAH) and the application of 0.01, 0.1 and 1 ng/mL of interleukin prevented the expression of monoacylglycerol lipase (MAGL). Our results suggest that the IL-1 β concentrations used may be affecting a possible neuroprotection mechanism involving SECB. Therefore, further investigations should be carried out to better understand the effects of IL-1 β .

Keywords: Neuroinflammation; Neuroplasticity; Endocannabinoids; IL-1 β .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de IL-1 β em micróglia.

Figura 2. Sistema Endocanabinoide no SNC.

Figura 3. Delineamento experimental referente a diferenciação de neurônios da linhagem SH-SY5Y com AR e BDNF por 8 dias.

Figura 4. Medição dos neuritos dos neurônios por meio *plugin NeuronJ* do FIJI.

Figura 5. Imagens em campo claro de culturas de SH-SY5Y em diferentes estágios de diferenciação celular.

Figura 6. Expressão de β III-tubulina em células SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas com AR e BDNF por 8 dias.

Figura 7. Células SH-SY5Y diferenciadas por 8 dias com AR e BDNF, imunomarcadas com DAPI e β III-tubulina.

Figura 8. Ensaio de Viabilidade Celular por meio de MTT em células SH-SY5Y não-diferenciadas tratadas por 24 horas com LPS.

Figura 9. Ensaio de Viabilidade Celular por meio de MTT em células SH-SY5Y diferenciadas e tratadas por 24 horas com LPS.

Figura 10. Ensaio de Viabilidade Celular por meio de MTT em células SH-SY5Y não-diferenciadas e em células diferenciadas, tratadas por 24 horas com LPS.

Figura 11. Expressão de NMDA, TH e D1 em células SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas com AR e BDNF por 8 dias.

Figura 12. Expressão de NeuN em células SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas com AR e BDNF por 8 dias.

Figura 13. Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica MTT em células SH-SY5Y diferenciadas com AR e BDNF e tratadas por 24 horas com IL-1 β .

Figura 14. Expressão de SYP e TrKB em células SH-SY5Y diferenciadas por 8 dias e tratadas com IL-1 β .

Figura 15. Células SH-SY5Y diferenciadas por 8 dias com AR e BDNF e tratadas por 24 horas com IL-1 β , imunomarcadas com DAPI e β III-tubulina

Figura 16. Representação gráfica da intensidade de fluorescência para β III-tubulina de células SH-SY5Y diferenciadas por 8 dias com AR e BDNF e tratadas por 24 horas com IL-1 β .

Figura 17. Representação gráfica da quantificação de células após tratamento com diferentes dosagens de IL-1 β .

Figura 18. Imagens em campo claro de células SH-SY5Y diferenciadas por 8 dias e tratadas por 24 horas com IL-1 β .

Figura 19. Comprimento dos neuritos primários de células SH-SY5Y diferenciadas por 8 dias e tratadas por 24 horas com IL-1 β .

Figura 20. Expressão de Actina em células SH-SY5Y diferenciadas com AR e BDNF por 8 dias e tratadas com IL-1 β .

Figura 21. Expressão de CB1r, TRPV1, FAAH e MAGL em células SH-SY5Y diferenciadas por 8 dias e tratadas com IL-1 β .

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

μL- microlitros

μM- micromolar

°C- graus Celsius

%- por cento

2-AG- 2-araquidonoilglicerol

A- amperagem

ACEA- araquidonil-2'-cloroetilamida

AEA- anandamida

Akt- proteína quinase B

AMPC- adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ANOVA- análise de variância

AR- ácido retinoico

Arc- *activity-regulated cytoskeleton-associated protein*

ASC- *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain*

ATP- adenosina trifosfato

BDNF- *brain derived neurotrophic factor*

BSA- *bovine serum albumine*

Ca²⁺- cálcio

CB1r- receptor Canabinoide do tipo 1

CB2r- receptor Canabinoide do tipo 2

cm²- centímetros quadrados

CO₂- dióxido de carbono

Ctrl.- células controle

DA- Doença de Alzheimer

DAGL- diacilglicerol lipase

DAMPS- padrões moleculares associados a danos

DAPI- Dicloridrato de 4',6-Diamidina-2'-fenilindol

DAT- transportador de dopamina

Df- graus de liberdade

DP- Doença de Parkinson

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

DMSO- dimetilsulfóxido

ECBs- endocanabinoides

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM- erro padrão da média

F-actina- actina filamentosa

FAAH- hidrolase amida de ácidos graxos

GABA- ácido gama-aminobutírico

GAPDH- gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

g/L- relação grama / litro

HPA- eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

IL-1 β - Interleucina-1 β

IL-1R- receptor de Interleucina-1

IL-1RAcP- proteína acessória do receptor Interleucina-1

K⁺- potássio

KDa- quilodalton

LCR- líquido cefalorraquidiano

L-DOPA- L-3,4-dihidroxifenilalanina

LDH- Lactato desidrogenase

LPS- lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*

LTP- *Long-term Potentiation*

M- molar

MAGL- lipase monoacilglicerol

mM- milimolar

mL- mililitro

mg- miligramas

mRNA- ácido ribonucleico mensageiro

MTT- *3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium*

m/v- relação massa / volume

NAPE-PLD- N-acilfosfatidiletanolamina fosfolipase D

NeuN- *Neuronal Nuclei*

NF κ B- *Nuclear Factor Kappa B*

ng- nanogramas

NGF- *Nerve Growth Factor*

NLRP3- *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3*

nm- nanômetros

NMDA- N-metil D-Aspartato

NMDAR1- receptor do tipo 1 N-metil D-Aspartato

Overnight- durante a noite

P2X7- receptor purinérgico 2 do tipo x7

PAMPS- padrões moleculares associados a patógenos

PBS- tampão de fosfato de sódio

pH- potencial hidrogeniônico

PSD-93- *Postsynaptic Density Protein-93*

PSD-95- *Postsynaptic Density Protein-95*

qRT-PCR- *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

RIPA- *radioimmunoprecipitation*

rpm- rotações por minuto

SECB- sistema endocanabinoide

SFB- soro fetal bovino

SDS- dodecilsulfato de sódio

SNC- sistema nervoso central

SYP- sinaptofisina

TBS- salina tris-tamponada

TBS-T- salina tris-tamponada com 0,05% de *Tween 20*

TH- tirosina hidroxilase

TLR- *toll like receptor*

TLR4- *toll like receptor 4*

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α

TRPV1- receptor vaniloide de potencial transitório tipo 1

TrKB- receptor tirosina quinase B

U/L- relação unidade / litro

V- voltagem

v/v- relação volume / volume

Vei.- veículo

vGlut- transportador vesicular de glutamato

WB- *Western Blotting*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Neuroinflamação: aspectos gerais.....	22
1.2 Interleucina-1 β	23
1.3 Sistema Endocanabinoide	26
1.4 Relação entre o Sistema Endocanabinoide e a IL-1 β	29
1.5 SH-SY5Y como modelo <i>in vitro</i> para o estudo dos efeitos da Interleucina-1 β no Sistema Endocanabinoide	30
2 HIPÓTESE.....	33
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo Geral.....	35
3.2 Objetivos específicos	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Drogas	37
4.2 Cultura de neurônios da linhagem SH-SY5Y e diferenciação celular em fenótipo maduro	37
4.3 Análise da diferenciação de células SH-SY5Y em neurônios maduros	38
4.4 Tratamentos	38
4.5 Ensaio de Viabilidade Celular	38
4.6 <i>Western Blotting</i>	39
4.7 Análises de prolongamentos neuríticos	40
4.8 Análise Estatística.....	42
5. RESULTADOS.....	44
5.1 Experimento 1: o processo de diferenciação com AR e BDNF alterou a morfologia das células SH-SY5Y.....	44
5.2 Experimento 2: o processo de diferenciação das células SH-SY5Y com AR e BDNF aumentou a expressão de β III-tubulina.....	45

5.3 Experimento 3: a redução da viabilidade celular induzida por LPS em células SH-SY5Y é acentuada após o processo de diferenciação celular.	46
5.4 Experimento 4: o processo de diferenciação das células SH-SY5Y com AR e BDNF aumentou a expressão de receptor D1, mas não alterou a expressão de Tirosina Hidroxilase e receptor do tipo 1 do N-metil D-aspartato.....	49
5.5 Experimento 5: o processo de diferenciação das células SH-SY5Y com AR e BDNF aumentou a expressão de <i>Neuronal Nuclei</i>	50
5.6 Experimento 6: tratamento com IL-1 β durante 24 horas não alterou viabilidade celular de células diferenciadas com AR e BDNF.....	51
5.7 Experimento 7: tratamento com IL-1 β durante 24 horas não alterou a expressão de TrKB total e levou a uma tendência de aumento na expressão de sinaptofisina em células diferenciadas com AR e BDNF.	52
5.8 Experimento 8: tratamento com IL-1 β durante 24 horas não alterou a intensidade de fluorescência para a β III-tubulina e o número de células diferenciadas com AR e BDNF.....	53
5.9 Experimento 9: tratamento com IL-1 β durante 24 horas reduziu o comprimento dos prolongamentos neuríticos primários de células diferenciadas com AR e BDNF.....	56
5.10 Experimento 10: tratamento com IL-1 β durante 24 horas reduziu a expressão de actina de células diferenciadas com AR e BDNF.....	57
5.11 Experimento 11: tratamento com IL-1 β durante 24 horas alterou a expressão de componentes do Sistema Endocanabinoide em células diferenciadas com AR e BDNF.	58
6 DISCUSSÃO.....	62
7 CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹	72

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neuroinflamação: aspectos gerais

A neuroinflamação consiste em um processo de defesa imunológica que ocorre no Sistema Nervoso Central (SNC), especificamente no cérebro e medula, em resposta à diversos estímulos agressivos, tais como infecções, lesões e doenças neurodegenerativas¹. No entanto, apesar da tentativa de fornecer proteção e benefícios, uma reação inflamatória prolongada e exacerbada pode resultar em danos nos tecidos e contribuir para o desenvolvimento de patologias².

O processo de neuroinflamação envolve a ativação de células gliais, como as micróglia, que são células imunes residentes do SNC³. Em um contexto de homeostase, as micróglia geralmente se apresentam no estado ramificado e contribuem para a estabilidade do SNC, visto que tais células cooperam para a sobrevivência neuronal e sinaptogênese por meio da liberação de fatores anti-inflamatórios e neurotróficos, como o Fator de Crescimento Nervoso (*Nerve Growth Factor-NGF*)^{4,5}. Além disso, as micróglia também estão envolvidas na “poda sináptica”, eliminando sinapses defeituosas do nervo lesionado para promover o restabelecimento de circuitos neurais maduros e eficientes^{6,7,8}.

Quando ativadas, as micróglia geralmente se transformam em células ameboides reativas, caracterizadas pela rápida produção e secreção de um amplo espectro de citocinas e outros mediadores imunológicos em resposta ao insulto⁹. A liberação acentuada dessas citocinas pró-inflamatórias, assim como a liberação de outros mediadores inflamatórios, como espécies reativas de oxigênio, pode levar a comprometimento neuroplástico e morte neuronal¹⁰.

À vista disso, a neuroinflamação aparece como um pilar em várias doenças neurodegenerativas e transtornos de humor. A exemplo, estudos demonstram que a neuroinflamação crônica associada a Doença de Alzheimer (DA) impulsiona a perda sináptica/neuronal progressiva e o declínio cognitivo observado na doença, visto que o acúmulo anormal de proteínas no cérebro leva a ativação microglial¹¹, o que consequentemente provoca a expressão de várias citocinas inflamatórias que ocasionam deterioração ou morte neuronal¹². Nesse sentido, identificou-se que níveis elevados de citocinas inflamatórias no cérebro de um modelo murino de DA provocou a exacerbção da expressão de proteínas β -amiloide¹³. No que se refere a Doença de Parkinson (DP) verificou-se que o uso de um inibidor do Fator Nuclear de Transcrição Kappa B (*Nuclear*

Factor Kappa B/ NF-kB) reduziu a ativação microglial e os níveis de mediadores inflamatórios no hipocampo de um modelo murino de DP, além de reduzir disfunções motoras avaliadas pelo Teste da Barra Rotativa¹⁴. O NF-kB é um elemento chave para o desenvolvimento de neuroinflamação crônica, visto que sua atividade em micróglia leva a uma maior liberação de citocinas pró-inflamatórias¹⁵.

Com relação a depressão, estudos clínicos indicam uma relação bidirecional entre neuroinflamação e o desenvolvimento da doença, haja vista que a mesma pode induzir processos neuroinflamatórios e a neuroinflamação pode provocar episódios depressivos¹⁶. Já foi exposto que pacientes com transtornos depressivos apresentam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias no sangue em comparação com os controles correspondentes¹⁷. Em modelos animais, foi observado que camundongos com comportamentos depressivos possuíam transcrição elevada de genes pró-inflamatórios nos tecidos do hipocampo¹⁸, assim como foi observado que a inativação microglial por meio do uso de minociclina levou a redução da neuroinflamação e atenuou a anedonia em um modelo murino de depressão¹⁹.

Nessa perspectiva, sugere-se que a ativação microglial e a subsequente liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias podem estar relacionadas ao desenvolvimento de inúmeras doenças neurológicas. Nesse sentido, julga-se relevante entender como a IL-1 β pode afetar os neurônios saudáveis, já que a mesma é uma das principais citocinas envolvidas em processos de plasticidade sináptica²⁰, assim como também é um elemento relevante liberado no contexto da neuroinflamação²¹.

1.2 Interleucina-1 β

A Interleucina-1 β (IL-1 β) faz parte da família de citocinas IL-1, que possui uma infinidade de atividades biológicas na imunidade e na inflamação²². Embora geralmente proteja o hospedeiro durante a infecção, a sinalização elevada de IL-1 β impulsiona a patogênese de várias doenças inflamatórias²³. Este cenário ocorre porque a interleucina em questão induz a produção de potentes moléculas inflamatórias no sistema periférico, tais como prostaglandinas, leucotrienos, fatores de ativação de plaquetas e outras citocinas²⁴.

Em condições não patológicas, a IL-1 β atua em funções vitais do SNC, como mecanismos moleculares de plasticidade cerebral e em complexos processos afetivos, motivacionais e cognitivos^{25,26}. Assim sendo, estudos observaram que existe influência

da IL-1 β (10 ng/mL) na diferenciação neuronal de células corticais imaturas²⁷. Além disso, há evidências da contribuição da IL-1 β (0.1, 1 e 10 ng/mL) na migração de neurônios corticais durante o desenvolvimento cerebral de forma concentração-dependente²⁸.

No SNC, a produção de IL-1 β em micróglia inicia com o reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs). Os PAMPs e DAMPs se ligam aos receptores *Toll-Like* (TLRs) na superfície celular e induzem a atividade do Fator Nuclear de Transcrição Kappa B (NF- κ B), que é translocado para o núcleo²⁹. Este fator, por sua vez, contribui para a expressão de pró-IL-1 β , assim como contribui para a expressão do receptor NLRP3 (*NOD-Like Receptor Protein 3*), da proteína adaptadora ASC (*Apoptosis-associated Speck-like protein Containing a CARD domain*) e da enzima pró-caspase 1³⁰.

Para que ocorra a oligomerização desses componentes supracitados, é necessário um segundo sinal, como a ativação do receptor P2X7 (Receptor Purinérgico 2 do tipo X7) por meio de ATP (Adenosina Trifosfato)³¹. Após essa ativação, ocorre efluxo de potássio, o que acarreta interação entre o NLRP3 e ASC, que por conseguinte recruta a pró-caspase 1, formando o inflamassoma NLRP3. Em sequência, a pró-caspase 1 é ativada em caspase 1, que catalisa o processo de transformação da pró-IL-1 β em IL-1 β , que enfim é liberada para o meio extracelular diretamente pela membrana plasmática ou por meio de vesículas (Figura 1)³².

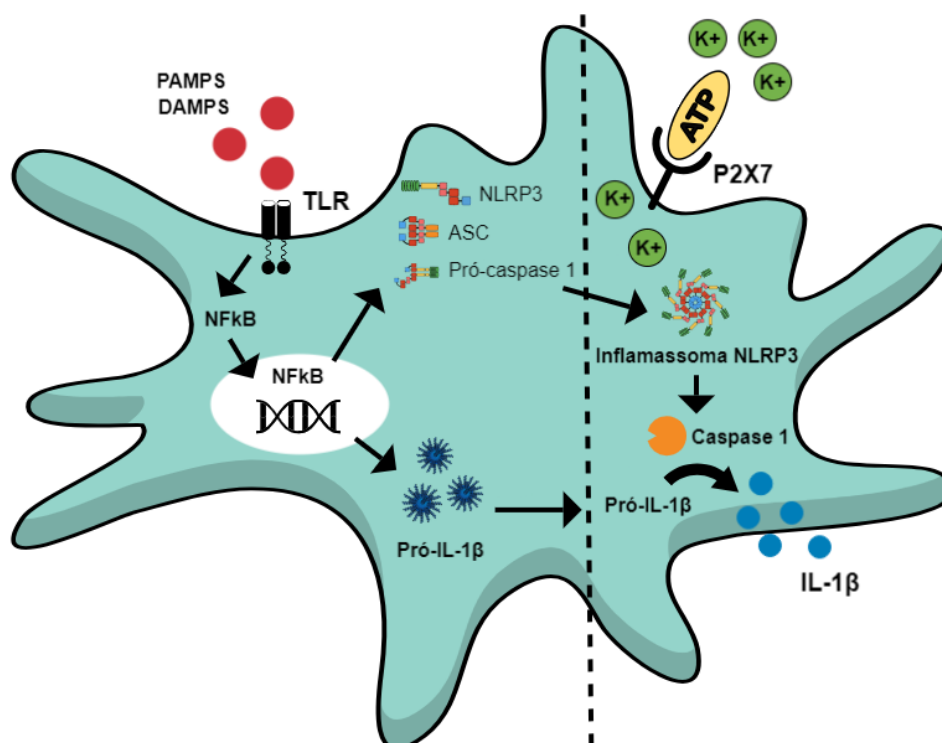


Figura 1. Produção de IL-1 β em micróglias. Adaptado de Place, 2018. Feito no *Mind the graph*. **PAMPS**- Padrões Moleculares Associados a Patógenos; **DAMPS**- Padrões Moleculares Associados a Danos; **TLR**- Toll Like Receptor; **NF κ B**- Fator nuclear de transcrição kappa B; **NLRP3**- *NOD-like receptor Protein 3*; **ASC**- *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain*; **P2X7**- receptor purinérgico 2 do tipo X7; **ATP**- Adenosina Trifosfato. Autoria própria.

Após liberação, a IL-1 β pode influenciar a função neural através do seu receptor IL-1R, que é expresso de forma proeminente nos neurônios do giro denteado localizados no hipocampo³³. O estímulo de IL-1R determina a ativação da proteína acessória do receptor IL-1 (IL-1RAcP), que serve como co-receptor necessário para a transdução de sinal dos complexos IL-1 β /IL-1R³⁴. Esse co-receptor também é necessário para a ativação de IL-1R por outras citocinas pertencentes a família IL-1³⁵. Deste modo, o complexo trimérico IL-1 β /IL-1R/IL-1RAcP gera fosforilação de moléculas no interior do neurônio e interfere em várias vias de sinalização, o que pode culminar em dano neuronal³⁶.

Em culturas primárias de neurônios hipocampais, a aplicação de IL-1 β (50 ng/mL) aumentou a expressão de IL-1R e de IL-1RAcP, situação que potencializou a responsividade dos neurônios à IL-1 β , com subsequente supressão da sinalização de fatores neurotróficos, como o BDNF³⁷. Neste sentido, um crescente corpo de evidências indica que a plasticidade sináptica, aprendizagem e memória são vulneráveis ao desbalanço na liberação de IL-1 β ^{38,39}. Estudos indicam que essa interleucina (3 ng/ml) pode reduzir a expressão de proteínas envolvidas na formação de sinapses, como PSD-95 (*Postsynaptic Density Protein-95*) e sinaptofisinas, em uma cultura primária de neurônios corticais de rato⁴⁰. Também foi observado no mesmo tipo celular que a aplicação de IL-1 β (10 ng/mL) pode prejudicar a sinalização desencadeada pela ligação do BDNF ao seu receptor Tirosina Quinase B (TrKB)⁴¹.

Tais efeitos supracitados podem ser responsáveis pela redução na formação de prolongamentos neuríticos após o tratamento com uma concentração neurotóxica de IL-1 β (50 ng/mL) em uma cultura organotípica de neurônios hipocampais⁴². A presença e conservação desses prolongamentos é vital para a manutenção do LTP (*Long-term Potentiation*), que consiste em um aumento duradouro na eficácia sináptica fundamental para o processo de aprendizagem e formação de memória⁴³. Ademais, verificou-se que uma alta concentração de IL-1 β (50 ng/mL) é capaz de bloquear a indução de LTP hipocampal em uma cultura primária de ratos e camundongos⁴⁴.

Levando em conta o prejuízo que a IL-1 β pode acarretar na função neuronal, alguns estudos demonstram a relação dessa citocina com diversas doenças neurológicas. Nesse sentido, há evidências de altos níveis de IL-1 β no cérebro de pacientes com DA^{45,46}.

Também já foi observado uma elevada expressão de IL-1 β em cérebros *post-mortem* e líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com Doença de Parkinson, o que culminou no prejuízo do desempenho de neurônios dopaminérgicos⁴⁷. Ademais, níveis significativamente elevados de IL-1 β foram detectados no soro de pacientes com Transtorno Bipolar durante episódios maníacos⁴⁸. Além disso, a redução do volume da substância cinzenta cortical observada em cérebros *post-mortem* de pacientes com esquizofrenia foi associada a uma maior expressão de mRNAs de citocinas pró inflamatórias, em especial a IL-1 β ⁴⁹.

Altas doses de citocinas, em especial a IL-1 β , geram descontrole na liberação e nos níveis de neurotransmissores no SNC, o que pode acarretar excitotoxicidade e hiperexcitação⁵⁰. O desbalanço na liberação de neurotransmissores está associado a inúmeras disfunções neurais⁵¹, visto que investigações relatam níveis aumentados de glutamato no LCR de pacientes esquizofrênicos, não tratados, durante seus primeiros episódios de psicose⁵². No mesmo sentido, o desbalanço nos níveis de GABA e Glutamato mostrou-se uma causa básica de convulsões e epilepsias, uma vez que a microdiálise foi capaz de revelar a ocorrência de um aumento neurotóxico na liberação desse neurotransmissor no hipocampo de pacientes epiléticos durante episódios de convulsão⁵³.

Nessa perspectiva, evidências indicam que o Sistema Endocanabinoide (SECB) oferece uma função neuroprotetora, capaz de impedir e/ou atrasar o dano neuronal ocasionado pela IL-1 β , visto que este sistema está ligado a modulação da plasticidade sináptica e a redução da excitotoxicidade⁵⁴.

1.3 Sistema Endocanabinoide

O SECB compreende os receptores canabinoides, os endocanabinoides, as enzimas envolvidas no seu metabolismo e o seu transportador de membrana, além de todo o aparato bioquímico responsável por sintetizar essas substâncias e finalizar suas ações⁵⁵. No SNC, a ativação dos receptores canabinoides leva a uma comunicação efetiva entre os neurônios, resultando na interferência em várias vias de sinalização e caracterizando o SECB como um sistema modulatório que atua na manutenção da homeostase sináptica⁵⁶.

A neuromodulação exercida pelo SECB depende da presença principalmente de dois endocanabinoides (ECBs): Anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Ambos são mensageiros lipídicos derivados de componentes de membranas celulares e sintetizados sob demanda, sem armazenamento em vesículas⁵⁷. A síntese de ECBs ocorre

nos neurônios pós-sinápticos como resposta a liberação de neurotransmissores provenientes de neurônios pré-sinápticos⁵⁸. O subsequente influxo de cálcio ocasionado por esses neurotransmissores leva a ativação de fosfolipases na região pós-sináptica, que convertem os fosfolípidos de membrana em ECBs⁵⁹. Nesse sentido, a NAPE-PLD (N-acilfosfatidiletanolamina Fosfolipase D) atua na produção de AEA e o DAGL (Diacilglicerol lipase) na síntese de 2-AG⁶⁰.

Após síntese e liberação, os ECBs ativam, por exemplo, receptores do tipo CB1 (CB1r) que estão localizados predominantemente nos neurônios pré-sinápticos⁶¹. Os CB1r estão entre os receptores acoplados a proteína G mais abundantes do SNC e a sua ativação resulta em inibição da Adenilato Ciclase e diminuição dos níveis de AMPc (Adenosina 3',5'-Monofosfato Cíclico)⁶². Conseqüentemente, a ativação de CB1r gera inibição dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo N e P/Q e estimulação de canais de K^+ , o que diminui o influxo de Ca^{2+} e aumenta o efluxo de K^+ nos terminais axônicos do neurônio pré-sináptico⁶³. Esse processo gera hiperpolarização neuronal e diminuição da liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, caracterizando a modulação que controla os níveis, por exemplo, de GABA e glutamato⁶⁴ (Figura 2).

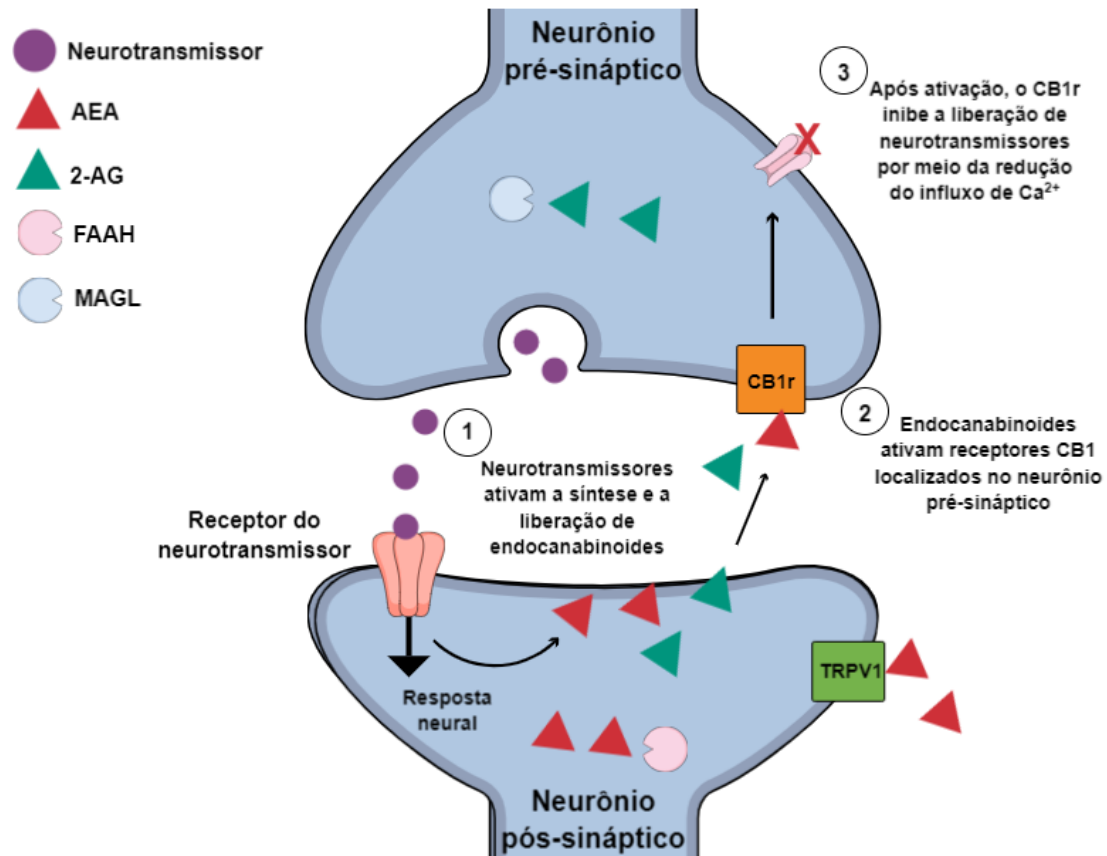


Figura 2. Sistema Endocanabinoide no SNC. Adaptado de Sallaberry, 2018. Feito no *Mind the graph*. **GABA-** ácido gama-aminobutírico; **CB1r-** receptor CB1; **TRPV1-** Receptor Vaniloide de Potencial Transitório tipo 1; **2-AG-** 2-araquidonoilglicerol; **AEA-** anandamida; **MAGL-** Lipase Monoacilglicerol; **FAAH-** Hidrolase Amida de Ácidos Graxos. Autoria própria.

A ativação de CB1r promove, em geral, a neurogênese, contribuindo assim para o manejo da plasticidade sináptica⁶⁵. A neuroplasticidade é descrita como a capacidade do SNC de reorganizar sua estrutura, função e conexões⁶⁶, e nesse quesito, o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) se destaca ao induzir a ramificação neuronal e a formação de dendritos por meio da ativação do Receptor Tirosina Quinase B (TrKB)⁶⁷. A deleção genética do CB1r mostrou promover uma diminuição na expressão do BDNF no hipocampo de camundongos⁶⁸, enquanto que a indução da expressão de BDNF contribuiu para o efeito protetor do CB1r contra a excitotoxicidade induzida por ácido caínico em fatias do hipocampo de animais⁶⁹. Ademais, experimentos com WIN55,212-2, agonista de CB1r/CB2r, mostraram que houve neuroproteção contra a excitotoxicidade glutamatérgica em fatias de cérebro de ratos privados de oxigênio e glicose⁷⁰.

Além do CB1r, outro importante receptor do SECB é receptor CB2 (CB2r), sendo este também acoplado a uma proteína G⁷¹. Os CB2r estão localizados principalmente no sistema imune periférico, apesar de também estarem expressos nas micróglias⁷². A presença de CB2r em micróglias está envolvida no manejo da secreção de citocinas pró-inflamatórias e no controle da capacidade fagocítica da célula, principalmente em um contexto neuroinflamatório⁷³.

No SNC, alguns ECBs também podem se acoplar a outros receptores além do CB1 e CB2, como por exemplo, ao Receptor Vaniloide de Potencial Transitório tipo 1 (TRPV1). Este receptor iônico é expresso principalmente, mas não exclusivamente, nos terminais nervosos pós-sinápticos e pode ser ativado por ligantes lipídicos endógenos, como a AEA⁷⁴. Após ativação deste receptor, ocorre aumento do influxo de Ca²⁺ nos neurônios pós-sinápticos, o que leva ao aumento da liberação de neurotransmissores, especialmente de glutamato, levando a crer que a ativação de CB1r e de TRPV1 exerçam efeitos opostos⁷⁵.

Evidências crescentes sugerem que o TRPV1 pode mediar uma variedade de vias de reatividade glial e liberação de citocinas envolvidas na transmissão sináptica e plasticidade⁷⁶, haja vista que o uso de um antagonista de TRPV1 reduziu a produção de IL-1 β e estimulou a neurogênese no hipocampo de ratos idosos⁷⁷.

Outros importantes componentes do SECB são as enzimas metabolizadoras de ECBs. Tanto AEA e 2-AG são substratos para as enzimas Hidrolase Amida de Ácidos

Graxos (FAAH) e Lipase Monoacilglicerol (MAGL), respectivamente⁷⁸. Estudos indicam que os mecanismos envolvidos na atividade de FAAH/MAGL regulam a plasticidade sináptica e neural, tendo em vista que o tratamento com inibidores dessas enzimas leva ao aumento dos níveis de BDNF e reduzem os níveis de citocinas pró-inflamatórias no cérebro de roedores⁷⁹. Evidências da literatura mostram que a inibição da FAAH é capaz de atenuar, por exemplo, comportamento tipo depressivo induzido em um modelo murino de dor neuropática, sendo que tais efeitos foram associados a melhoras nos parâmetros de plasticidade, como neurogênese hipocampal⁸⁰.

1.4 Relação entre o Sistema Endocanabinoide e a IL-1 β

Estudos que relacionam o SECB e a IL-1 β demonstram que a interação entre esses dois sistemas é bidirecional, visto que a ativação de receptores canabinoides, como o CB1r, suprime as respostas inflamatórias através da atenuação de mediadores pró-inflamatórios como a IL-1 β , uma vez que verificou-se aumento na expressão de IL-1Ra (antagonista endógeno do receptor de IL-1) em uma cultura de neurônios corticais e células gliais primárias de camundongos⁸¹. Outro estudo apresenta que o uso de um agonista de receptores canabinoides, o WIN55,212-2, inibe a ativação de genes pró-inflamatórios induzidos pela aplicação de IL-1 β (10 ng/mL) em uma cultura de astrócitos primários humanos⁸², sugerindo que a manipulação do SECB pode ser uma estratégia promissora para interromper vias inflamatórias no SNC.

Por outro lado, estudos demonstram que a IL-1 β (30 ng/mL) possui ação inibitória sobre os CB1r que controlam a liberação de glutamato no corpo estriado de camundongos⁸³. Ademais, foi observado que única injeção intracerebroventricular de IL-1 β (1,0 μ g/kg) causou ansiedade em camundongos e anulou a sensibilidade de CB1r que controlam as sinapses GABA no corpo estriado⁸⁴. Outrossim, pesquisas enfatizam que essa citocina (30 ng/mL) interfere em sinapses glutamatérgicas em fatias de cérebro de camundongos, ocasionando uma hiperexcitabilidade que é facilitada pelo TRPV1⁸⁵.

Considerando as evidências científicas encontradas em estudos envolvendo diferentes modelos animais de que a IL-1 β pode afetar a plasticidade neural e o SECB, existe uma necessidade de estudos voltados a entender os efeitos dessa citocina em modelos celulares humanos, particularmente em mecanismos de plasticidade, incluindo alterações do SECB.

1.5 SH-SY5Y como modelo *in vitro* para o estudo dos efeitos da Interleucina-1 β no Sistema Endocanabinoide

As evidências de que a IL-1 β pode afetar a plasticidade neural e o SECB em diferentes modelos animais levanta a questão de como essa citocina pode afetar modelos celulares humanos. No entanto, neurônios humanos para estudos relacionados à neuroinflamação não são de fácil acesso e, por isso, células imortalizadas são utilizadas como alternativa na pesquisa básica⁸⁶. Nesse sentido, a linhagem celular SH-SY5Y, imortalizada e proliferativa, é uma alternativa amplamente estabelecida para estudos em neurociência⁸⁷.

Em comparação com neurônios primários, o uso dessa linhagem oferece vantagens, como a capacidade de expansão em larga escala. Além disso, como são consideradas uma linhagem celular, não há preocupações éticas associadas⁸⁸. Ademais, uma vez que as células SH-SY5Y são derivadas de humanos, elas expressam várias proteínas específicas de humanos e isoformas de proteínas que não estariam presentes em culturas primárias de roedores⁸⁹. No estado proliferativo, tais células apresentam características de neurônios catecolaminérgicos, além de possuírem marcadores moleculares de neurônios imaturos, corpos celulares não polarizados e poucos prolongamentos neuríticos, geralmente curtos, apresentando também características tumorais⁹⁰. Dessa forma, apesar de muitas vezes serem utilizadas no estado proliferativo, uma cultura de células SH-SY5Y pode ser diferenciada para perder características tumorais^{91,92} e apresentar fenótipo neuronal maduro.

Existem vários métodos para induzir a diferenciação das células SH-SY5Y, sendo que um dos protocolos mais comuns e bem estabelecidos consiste no uso de ácido Retinoico (AR) adicionado ao meio de cultivo associado ao baixo teor de soro fetal bovino (SFB)⁹³. O AR atua inibindo a proliferação celular, sincronizando o ciclo celular na fase G0 e induz o fenótipo de neurônio colinérgico⁹⁴. No entanto, células diferenciadas apenas com AR podem desenvolver apenas parcialmente características de neurônios maduros^{95,85,90}. Sendo assim, a combinação de AR com fatores neurotróficos, como o BDNF, desempenha um papel crucial na diferenciação de células SH-SY5Y em neurônios maduros. As células diferenciadas com AR e BDNF exibem, de forma acentuada, características sinápticas e transporte funcional de vesículas axonais, além de expressarem acentuadamente proteínas específicas do sistema nervoso, como NeuN (*Neuronal Nuclei*), β III-tubulina e sinaptofisina^{90,95,96}.

As células SH-SY5Y no estado proliferativo, não diferenciado, também expressam componentes do SECB, sendo que a expressão dos integrantes desse sistema já foi demonstrada a nível transcricional, translacional e funcional⁹⁷. Análises feitas por *Western Blotting*, qRT-PCR (*Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) e imunofluorescência demonstram a presença dos principais elementos do SECB nessas células, incluindo CB1r, TRPV1, NAPE-PLD, FAAH, DAGL e MAGL⁹⁷. Ademais, ensaios bioquímicos foram realizados para demonstrar a funcionalidade desses componentes, ratificando que as enzimas e receptores detectados eram todos funcionais⁹⁷.

Nessa perspectiva, o presente estudo utilizou neurônios diferenciados com AR e BDNF a partir da linhagem celular SH-SY5Y, para averiguar os efeitos da IL-1 β em componentes neuroplásticos e do SECB em um modelo *in vitro* humano.

Hipótese

2 HIPÓTESE

Levando em conta os diversos estudos que demonstram que a IL-1 β pode prejudicar o SECB em animais e, portanto, afetar o efeito protetor desse sistema, a hipótese deste trabalho é que a aplicação de IL-1 β poderia afetar negativamente a expressão do CB1r e facilitar a via do TRPV1 em células SH-SY5Y diferenciadas em um fenótipo neuronal maduro. Ao beneficiar o TRPV1, a IL-1 β irá afetar outros componentes do SECB, influenciando na neuroplasticidade e na morfologia neuronal.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de neurônios maduros obtidos após processo de diferenciação da linhagem celular de neuroblastoma SH-SY5Y e, então, avaliar os efeitos da IL-1 β em componentes do SECB e na neuroplasticidade dos neurônios diferenciados.

3.2 Objetivos específicos

- Diferenciar neurônios da linhagem SH-SY5Y em um fenótipo maduro utilizando ácido retinoico e BDNF;
- Avaliar a viabilidade celular dos neurônios diferenciados, após 24 horas da exposição à IL-1 β ;
- Avaliar a expressão de componentes do SECB (CB1r, FAAH, MAGL e TRPV1) nos neurônios diferenciados, após 24 horas de exposição à IL-1 β ;
- Avaliar mecanismos de plasticidade sináptica, por meio da quantificação de proteínas relacionadas à sinaptogênese (sinaptofisina e TrKB), nos neurônios diferenciados, após 24 horas da exposição à IL-1 β ;
- Verificar possíveis alterações na morfologia de prolongamentos neuríticos dos neurônios diferenciados, após 24 horas da exposição à IL-1 β .

Materiais e métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Drogas

Neste estudo utilizou-se a Interleucina-1 β recombinante humana (IL-1 β , NIBSC-UK, #86/680) solubilizada em água ultrapura; o lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* (*Sigma*, #L2630) solubilizado em tampão de fosfato de sódio (PBS- 0,1M; pH 7,4); o ácido retinoico (AR, *abcam*, #ab120728) solubilizado em etanol anidro; e o BDNF (*Brain Derived Neural Factor*, *Sigma*, #SRP3014) solubilizado em água ultrapura.

4.2 Cultura de neurônios da linhagem SH-SY5Y e diferenciação celular em fenótipo maduro

As células SH-SY5Y foram cultivadas em garrafas de cultura estéreis (75 cm², *Corning*) com o meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) *High Glucose* (*Sigma*, #12800-017), suplementado com 100 U/L de penicilina e 0,1 g/L de estreptomicina (*Gibco*, #15140-122) e 10 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB) inativado por temperatura (*Gibco*, #12657-029). Esta composição de meio será citada daqui em diante como “DMEM completo”. As células foram mantidas à 37°C, com 5% de CO₂, em incubadora (*Thermo Scientific Heracell Vios 160i*).

O meio DMEM completo foi trocado a cada 2 dias e após atingir 80% de confluência, as células foram incubadas com 3 mL de tripsina-EDTA (0,25%) com fenol red (*Gibco*, #T4549), por 3 minutos à 37°C. Em seguida, adicionaram-se 4 mL de DMEM completo, para neutralização a ação da tripsina e, após isto, foram centrifugadas por 4 minutos à 1.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 2 mL de DMEM completo. A suspensão celular obtida foi quantificada por contagem em câmara de *Neubauer*, utilizando-se *Trypan blue* (*Sigma*, #RNBJ6948), conforme descrito por estudos correlatados⁹⁸. Diluiu-se a suspensão em solução 0,4% de *Trypan blue* (m/v) na proporção 1:1 e contou-se as células viáveis, isto é, aquelas que não adquirem coloração azul, obtendo-se assim o volume da suspensão a ser plaqueado por poço em placas de 6, 24 ou 96 poços. Em seguida, a placa foi incubada por 24 horas para adesão das células.

Após plaqueamento e adesão, a cultura celular foi diferenciada (**figura 3**) para a aquisição de um fenótipo neuronal maduro conforme metodologia previamente descrita por estudos correlatados^{89,90,99}. Para tanto, utilizou-se meio DMEM *High Glucose* suplementado com 100 U/L de penicilina, 0,1 g/L de estreptomicina, 0,5% de SFB (v/v)

e 10 μM ácido retinoico (AR), sendo este meio aplicado no 1º e 3º dia do processo de diferenciação. No 5º e 7º dia do processo de diferenciação, retirou-se o meio e adicionou-se novo meio DMEM suplementado com 10 μM de ácido retinoico e 50 ng/mL de BDNF.

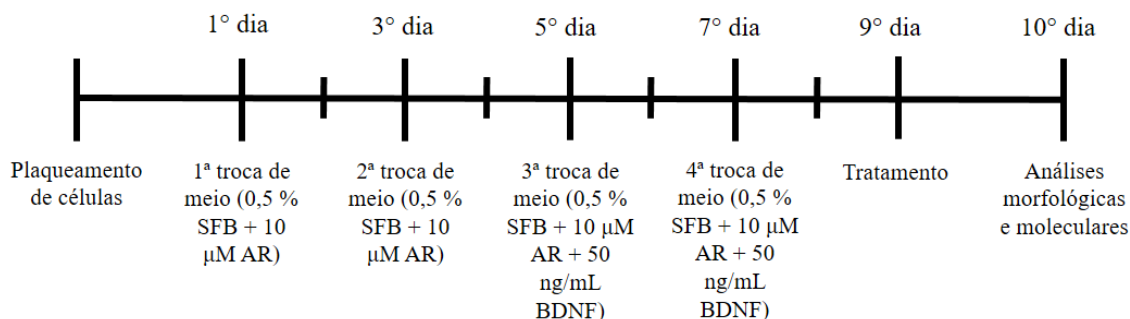


Figura 3. Delineamento experimental referente a diferenciação de neurônios da linhagem SH-SY5Y com AR e BDNF por 8 dias. **AR:** ácido retinoico; **BDNF:** fator neurotrófico derivado do cérebro.

4.3 Análise da diferenciação de células SH-SY5Y em neurônios maduros

Acompanhou-se a mudança fenotípica induzida pelo protocolo de diferenciação de células SH-SY5Y com AR e BDNF, comparando os níveis de expressão de proteínas marcadoras neuronais por *Western Blotting* (item 4.6). Além disso, foi verificado por meio de microscopia de campo claro (*Primo Vert, Zeiss*) se o protocolo de diferenciação poderia induzir mudança morfológica nas células. Também foi averiguado por meio de ensaio de viabilidade celular (item 4.5) se a aplicação de tal protocolo poderia induzir maior sensibilidade nas células SH-SY5Y e reduzir a resistência celular, que é característica do fenótipo cancerígeno.

4.4 Tratamentos

Após diferenciação, as células foram tratadas (na ausência de BDNF e AR), por 24 horas, com IL-1 β , junto ao meio de cultura, nas concentrações 0.01, 0.1, 1 e 10 ng/mL. As concentrações de IL-1 β utilizadas são consistentes com a literatura relevante^{100,101,102,103}. Para determinados experimentos, as células foram tratadas com LPS nas concentrações de 1, 10, 20, 40, 80, 160, 320 e 640 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas.

4.5 Ensaio de Viabilidade Celular

Para avaliar a viabilidade celular dos neurônios após os tratamentos previamente descritos foi empregado o método colorimétrico de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-Difenil

Brometo de Tetrazolium (MTT, *abcam* #ab146345). O princípio do ensaio é baseado na redução do MTT, um sal de tetrazólio amarelo, por meio da atividade metabólica celular. Essa redução origina cristais de formazan de cor roxa/azul e, portanto, quando há comprometimento na atividade metabólica das células, é observado uma redução na formação dessa coloração¹⁰⁴. Cerca de 5×10^3 células foram semeadas por poço, na placa de 96 poços (*Costar*, #3596), juntamente com 100 μ L de meio de cultura. Após diferenciação celular (item 4.2) e tratamento (item 4.4), cada poço da placa recebeu 10% de MTT (0,5 mg/mL) e a mesma foi incubada em estufa (5% de CO₂ e 37°C) por 4 horas. Por fim, o sobrenadante dos poços foi substituído por 100 μ L/poço de Dimetilsulfóxido (DMSO) para suspensão dos cristais de formazan e a absorbância das amostras foi medida através de um espectrofotômetro à 540 nm¹⁰⁵. Calculou-se a viabilidade relativa à condição controle (100%), em que as células SH-SY5Y foram expostas apenas a meio de cultura.

4.6 Western Blotting

O *Western Blotting* (WB) foi realizado para quantificação do nível proteico das amostras após os tratamentos. Para este ensaio, $1,4 \times 10^5$ células foram semeadas por poço na placa de 6 poços (*Nest*, #1028b), juntamente com 1 mL de meio por poço. As placas foram mantidas em estufa úmida à 37°C e 5% de CO₂. Após diferenciação celular (item 4.2) e tratamento (item 4.4), o meio de cultura foi completamente retirado e as células foram brevemente lavadas com PBS gelado. A seguir, foi realizado a lise celular com aplicação de tampão de lise, que continha tampão RIPA (*Sigma* #SLBT1336), 10 % de inibidor de protease (*Sigma* #P2714), 1% de inibidor de fosfatase (*Sigma* #P0044) e 2mM de ortovanadato de sódio, associado a extração com auxílio de *cell scraper*. As amostras obtidas foram centrifugadas à 16.000G por 20 minutos à 4°C, afim de se coletar o sobrenadante rico em proteínas. As proteínas citoplasmáticas presentes no sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford¹⁰⁶.

Posteriormente, as amostras foram diluídas em água milli-Q, e a elas adicionou-se solução tampão de amostra Laemmli (*Biorad* #1610747) e 2-mecaptoethanol (*Sigma* #M3148). Após 5 minutos de aquecimento à 95°C para desnaturação proteica, aplicaram-se 40 μ g de proteína total de cada amostra em gel de gradiente Tris-glicina de 4-15 % ou 12 % de poliacrilamida (*Biorad*) para separação das proteínas de acordo com o peso molecular. A eletroforese foi realizada em solução tampão de corrida (Tris

25mM, Glicina 192mM, SDS 0,1 %), acompanhando-se a corrida com o padrão de peso molecular (*Li-cor* #D10525-01).

Logo após, o conteúdo proteico dos géis foi transferido para membranas de nitrocelulose por meio de um sistema semi-seco de transferência *Trans-Blot (Turbo Transfer System- BioRad)* a 25V, 1.0A, 30 minutos, em tampão de transferência (Tris 25mM, Glicina 192mM, Metanol 20%). Após este processo, foi realizado o bloqueio de proteínas com solução de bloqueio (*LI-COR*, #220422) por 2 horas em temperatura ambiente e agitação suave constante. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos primários **anti-Actina** (1:1000, #SC58673, Santa Cruz), **anti-CB1r** (1:500, #ab75165, *Abcam*), **anti-βIII-Tubulina** (1:1000, #MAB1195, RDSsystem), **anti-FAAH** (1:500, #101600, *Cayman*), **anti-D1 receptor** (1:1000, #324390, *Calbiochem*), **anti-MAGL** (1:500, #24701, *Abcam*), **anti-NeuN** (1:500, #mab377, *Millipore*), **anti-NMDAR1** (1:1000, # ab134308, *Abcam*), **anti-sinaptofisina** (1:500, #364065, *Cell Signaling*), **anti-Tirosina hidroxilase** (1:500, #657012, *Calbiochem*), **anti-TRPV1** (1:500, #ab203103, *Abcam*), **anti-TrKB** (1:1000, #AF1494, *RD System*) e **anti-GAPDH** (1:1000, #SC-47724, Santa Cruz), *overnight* à 4°C e sob agitação constante. No dia seguinte, as membranas foram brevemente lavadas em solução de salina tris-tamponada com 0,05% de *Tween 20* (TBS-T) por 3 vezes de 5 minutos e incubadas com os respectivos anticorpos secundários fluorescentes (**anti-rabbit**, 1:5000, #926-68073, *Li-cor*; **anti-mouse**, 1:5000, #926-32212, *Li-Cor* e **anti-goat**, 1:5000, #926-68074, *Li-Cor*) por 1 hora em temperatura ambiente e agitação constante. Posteriormente, as membranas foram lavadas em TBS-T por 3 vezes de 5 minutos e reveladas em um fotodocumentador de fluorescência (*Odyssey DLx Imager, LI-COR*). A densidade de bandas não-saturadas e preservadas foram quantificadas utilizando o *software ImageStudio Lite*. Os valores obtidos foram equalizados pela proteína endógena Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)¹⁰⁷.

4.7 Análises de prolongamentos neuríticos

Após tratamento das células, a análise dos prolongamentos neuríticos foi realizada através de duas metodologias previamente descritas em estudos correlatados. Na primeira metodologia, $1,4 \times 10^5$ células foram semeadas por poço na placa de 6 poços, juntamente com 1mL de meio por poço. As placas foram mantidas em estufa úmida à 37°C e 5% de CO₂. Após diferenciação celular (item 4.2) e tratamento (item 4.4), as

culturas tratadas foram examinadas por microscopia de campo claro (*Fluorescence Imaging Station*), onde foi averiguado a extensão dos prolongamentos neuríticos. Foram analisados 24 neuritos por *n* experimental usando uma lente objetiva de 20x. Este experimento foi realizado em triplicata, totalizando 72 neuritos por grupo experimental. A medição dos neuritos dos neurônios foi feita de forma semiautomática com o *plugin NeuronJ* do FIJI (ImageJ, versão 1.04b)^{108,109}.

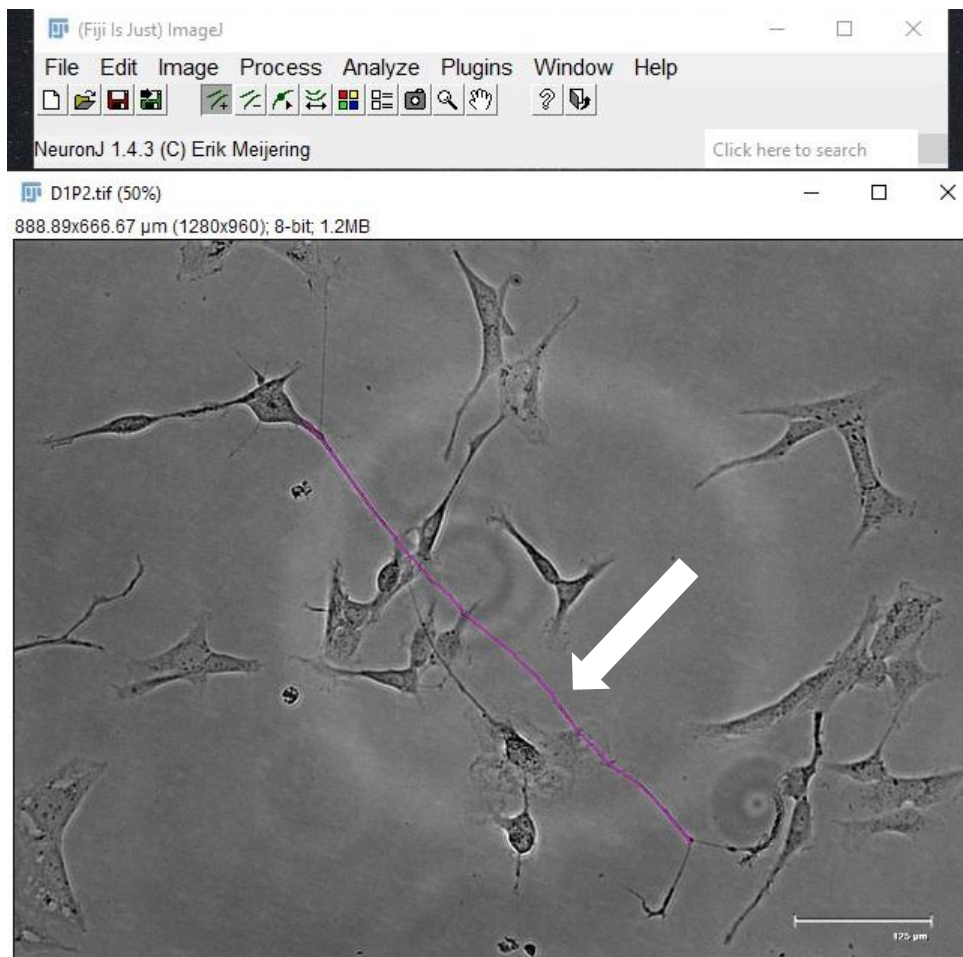


Figura 4. Medição dos neuritos dos neurônios por meio *plugin NeuronJ* do FIJI. **Seta branca:** neurito marcação pelo programa para medição do comprimento.

A segunda metodologia foi realizada por meio de imunofluorescência e, para tanto, $2,9 \times 10^4$ células foram cultivadas por poço, em placa de 24 poços (*Costar #3525*), juntamente com 300 μ L de meio de cultura por poço e mantidas em estufa úmida (37°C à 5% de CO₂). As células foram semeadas sobre lamínulas de vidro previamente tratadas com 0,1 mg/mL de poli-lisina D (*Sigma-Aldrich, #P6407*), durante 30 minutos. Após diferenciação celular (4.2) e tratamento (4.4), o meio foi retirado e as células foram brevemente lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído (PFA, 4%) por 10 minutos

e, novamente, lavadas em 3 banhos de PBS (5 minutos cada). Em seguida, as células foram permeabilizadas com Triton à 0,5% em solução de bloqueio por 15 minutos e lavadas em PBS (3 vezes de 5 minutos). Posteriormente, as lamínulas foram bloqueadas com solução de bloqueio (1% BSA + 0,1% *Tween* 20 em PBS), durante 30 minutos, em câmara úmida no escuro.

Após este processo, as células foram incubadas com o anticorpo primário anti- β -III Tubulina (1:1000, #2G10, *Invitrogen*), *overnight*, à 4°C no escuro e em câmara úmida. No dia seguinte, ocorreu lavagem das lamínulas com PBS e posterior adição de anticorpo secundário específico (anti-*mouse*, 1:2000, #1739919, *Life technologies*) e DAPI (Dicloridrato de 4',6-Diamidina-2'-fenilindol; 1:1000, #D9542, *Sigma-Aldrich*) diluídos em solução de bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente. Ao término dessa etapa, as lamínulas foram lavadas em PBS e posicionadas em lâminas (*Knittel Gläser*) com meio de montagem (*Prolong Diamond Antifade Mountant*, *Invitrogen*, #P36970).

As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência (*Leica DMI 6000B*) com uma objetiva de 40x e a avaliação dos prolongamentos neuríticos, assim como a quantificação de células, foi realizada pelo *software ImageJ* (versão 1.04b)¹¹⁰.

4.8 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism* (versão 9.0, 2020). Os dados coletados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Inicialmente foram realizados testes de normalidade e homogeneidade de variâncias. Os dados que passaram nesses testes foram analisados por meio de Teste T de *Student* ou ANOVA fatorial de uma via ou duas vias. O pós-testes Dunnett ou *Sidak* foram utilizados para revelar diferenças específicas em todos os testes. Os dados que não passaram nos testes de normalidade foram analisados por estatística não-paramétrica (*Kruskal-Wallis*). Além disso, os dados foram normalizados de acordo com o valor do veículo. O nível de significância estabelecido é de $p < 0,05$.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Experimento 1: o processo de diferenciação com AR e BDNF alterou a morfologia das células SH-SY5Y.

Por meio de microscopia de campo claro, foi possível verificar as mudanças morfológicas que ocorrem no decorrer da diferenciação celular de 8 dias com AR e BDNF (Figura 5). Inicialmente as células encontram-se em seu estado proliferativo, caracterizando um estágio imaturo do desenvolvimento neuronal (Figura 5a). Os tratamentos com AR promovem um aumento preliminar e alongamento das extensões neuríticas (Figura 5b-c). Após o primeiro tratamento com AR e BDNF, observa-se um processo de maturação mais avançado (Figura 5d), enquanto uma segunda adição desse tratamento promove uma morfologia mais alongada dos neurônios, grandes extensões neuríticas e complexas redes de ligação neuronal (Figura 5e).

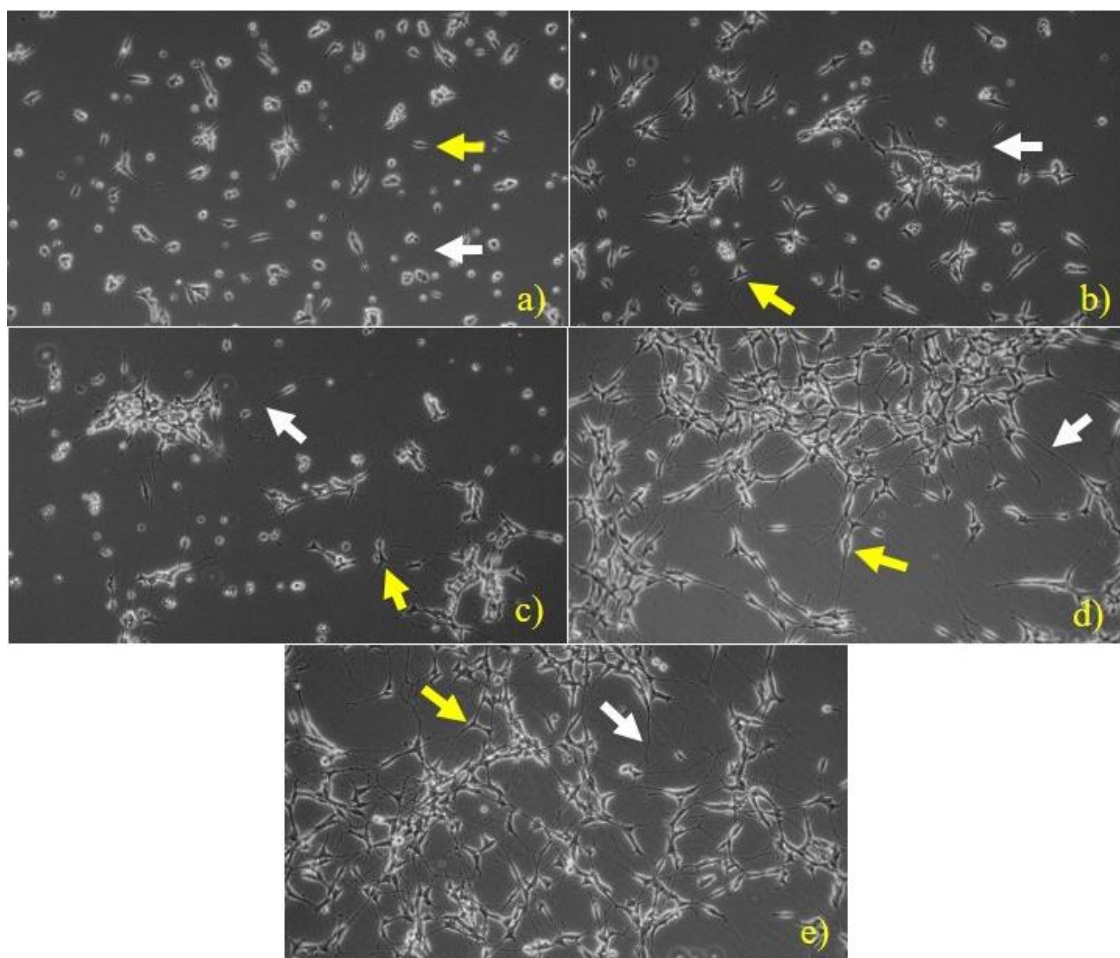


Figura 5. Imagens em campo claro de culturas de SH-SY5Y em diferentes estágios de diferenciação celular. Em **a** células no estado proliferativo. Em **b** e **c** células após o primeiro e segundo tratamento com AR (10 μ M), respectivamente. Em **d** e **e** células após o primeiro e segundo tratamento com AR + BDNF (50 ng/mL), respectivamente. Lente com aumento de 20x. **AR:** ácido retinoico; **BDNF:** fator neurotrófico derivado do cérebro. **Seta amarela:** corpo celular dos neurônios; **Seta branca:** prolongamento neurítico.

5.2 Experimento 2: o processo de diferenciação das células SH-SY5Y com AR e BDNF aumentou a expressão de β III-tubulina.

No intuito de avaliar de forma molecular se o processo de diferenciação induz o crescimento de prolongamentos neuríticos em células SH-SY5Y, foi realizado WB para verificar a expressão de β III-tubulina em células não-diferenciadas e diferenciadas por 8 dias com AR e BDNF. Após realização de Teste T não pareado, é possível observar que houve um aumento significativo na expressão de β III-tubulina ($t= 13.99$; $df= 4$; $p= 0.0002$) em células diferenciadas (Figura 6). Ainda, foi realizada a imunofluorescência das células e pode ser visualizada a intensa expressão de β III-tubulina em células diferenciadas (Figura 7). Foi utilizado DAPI para marcar o núcleo das células.

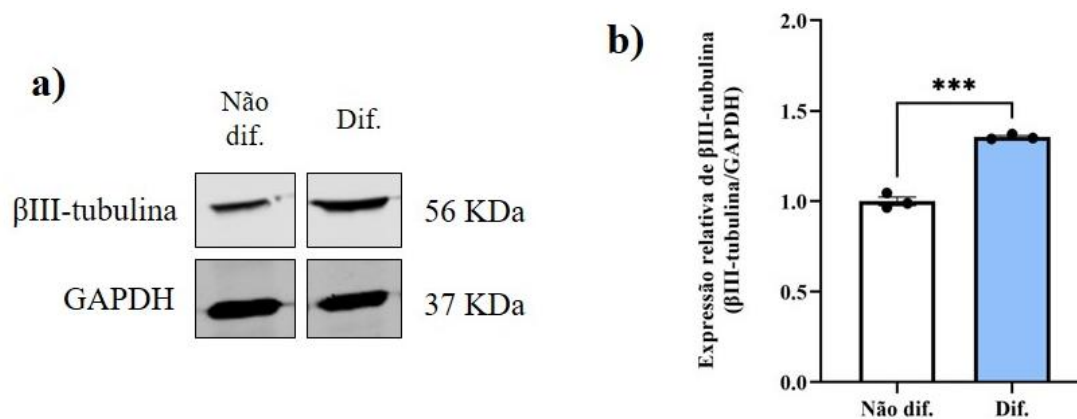


Figura 6. Expressão de β III-tubulina em células SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas com AR e BDNF por 8 dias. Em **a**, imagem representativa da imunorreatividade para a proteína avaliada por WB. Em **b**, representação quantitativa da expressão de β III-tubulina. A proteína foi normalizada pelo GAPDH. Os dados são representados pela média \pm EPM ($n = 3$ por grupo). Teste T de *Student* não pareado ($T= 13.99$, $df= 4$). *** $p < 0,0003$. **AR**: ácido retinoico; **BDNF**: fator neurotrófico derivado do cérebro; **Dif.**: células diferenciadas; **GAPDH**: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; **Não dif.**: células não diferenciadas; **WB**: *Western Blotting*.

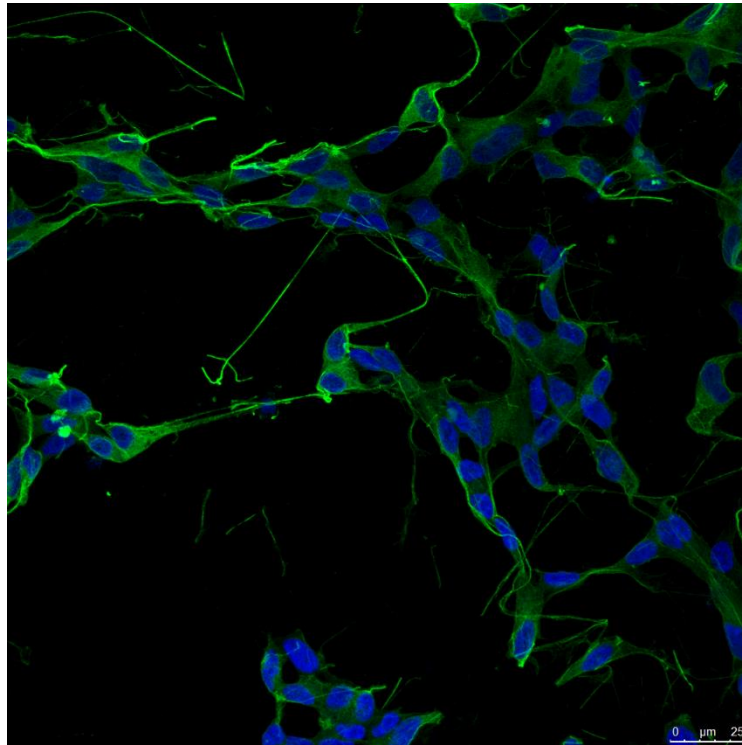


Figura 7. Células SH-SY5Y diferenciadas por 8 dias com AR e BDNF, imunomarcadas com DAPI e β III-tubulina. Aumento de 63 x em microscopia confocal. **DAPI:** Dicloridrato de 4',6-Diamidina-2'-fenilindo; **AR:** ácido retinoico; **BDNF:** fator neurotrófico derivado do cérebro.

5.3 Experimento 3: a redução da viabilidade celular induzida por LPS em células SH-SY5Y é acentuada após o processo de diferenciação celular.

Para investigar se o processo de diferenciação modificou a resistência celular de neurônios SH-SY5Y, foi realizado MTT em células expostas ao LPS. O LPS é amplamente utilizado para modelar inflamação aguda em células SH-SY5Y, resultando em alteração da viabilidade celular^{111,112}. Este experimento foi realizado nas seguintes condições: células não-diferenciadas ou diferenciadas por 8 dias com AR e BDNF. Neurônios não-diferenciados apresentaram queda de cerca de 26% na viabilidade celular apenas na concentração de 640 μ g/mL ($F_{8,99} = 2,132$; $p < 0,0001$; ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de *Dunnet*) de LPS (Figura 8).

Já as células diferenciadas por 8 dias demonstraram uma diminuição na viabilidade celular de cerca de 37% já na concentração de 320 μ g/mL de LPS, e uma queda de cerca de 80% na concentração de 640 μ g/mL de LPS ($F_{8,96} = 1,372$; $p < 0,0001$; ANOVA de uma via) (Figura 9). O teste *post hoc* de *Dunnett* indicou diferença significativa entre o grupo veículo e a concentração de 320 μ g/mL de LPS ($p = 0,0015$) e entre o grupo veículo e a concentração de 640 μ g/mL de LPS ($p < 0,0001$). Para verificar

se houve interação entre o tratamento com LPS e o processo de diferenciação utilizado neste experimento, foi realizado a ANOVA de duas vias. Este último teste revelou interação entre os fatores (tratamento com LPS x diferenciação com AR e BDNF; $F_{8,195}=10,15$; $p < 0,0001$) e efeitos principais significativos (tratamento com LPS: $F_{8,195}=29,90$, $p < 0,0001$; diferenciação com AR e BDNF: $F_{1,195}=4,289$, $p=0,0397$) (Figura 10).

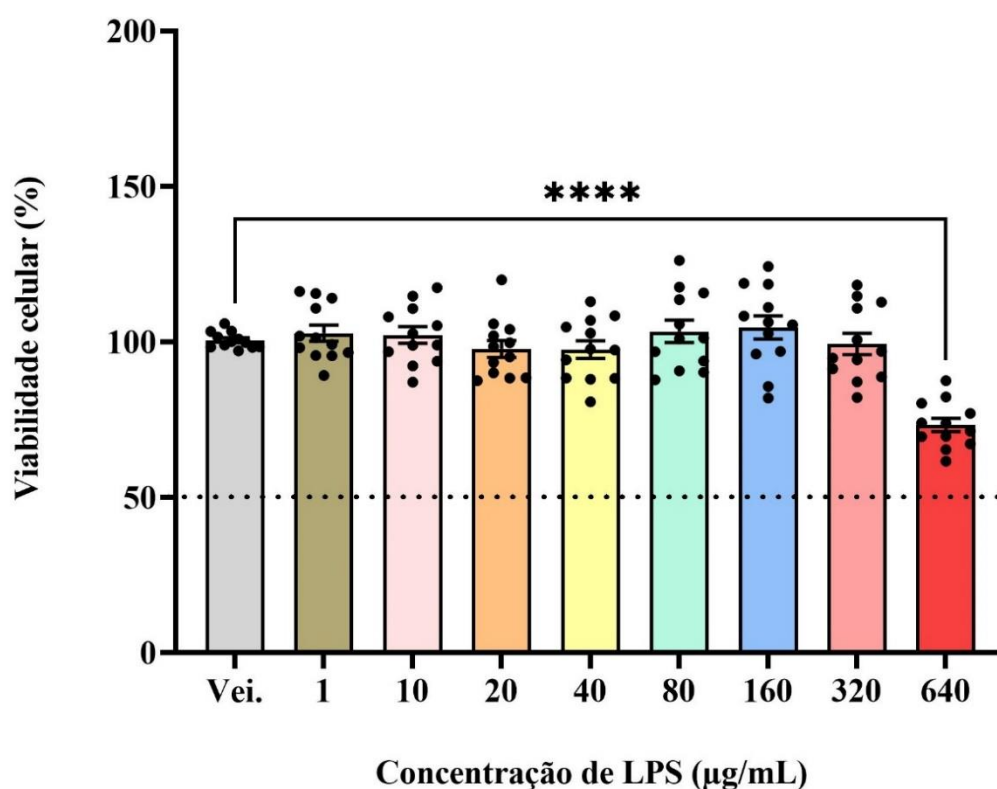


Figura 8. Ensaio de Viabilidade Celular por meio de MTT em células SH-SY5Y não-diferenciadas tratadas por 24 horas com LPS. Os dados são representados pela média \pm EPM ($n = 11-12$ por grupo). Teste ANOVA de uma via entre o veículo e todas as concentrações de LPS, seguido de teste *post hoc* de Dunnett. **** $p < 0,0001$: diferença entre vei. e 640 $\mu\text{g/mL}$. **AR:** ácido retinoico; **BDNF:** fator neurotrófico derivado do cérebro; **LPS:** Lipopolissacarídeo de *E. coli*; **MTT:** 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium; **Vei.:** Veículo.

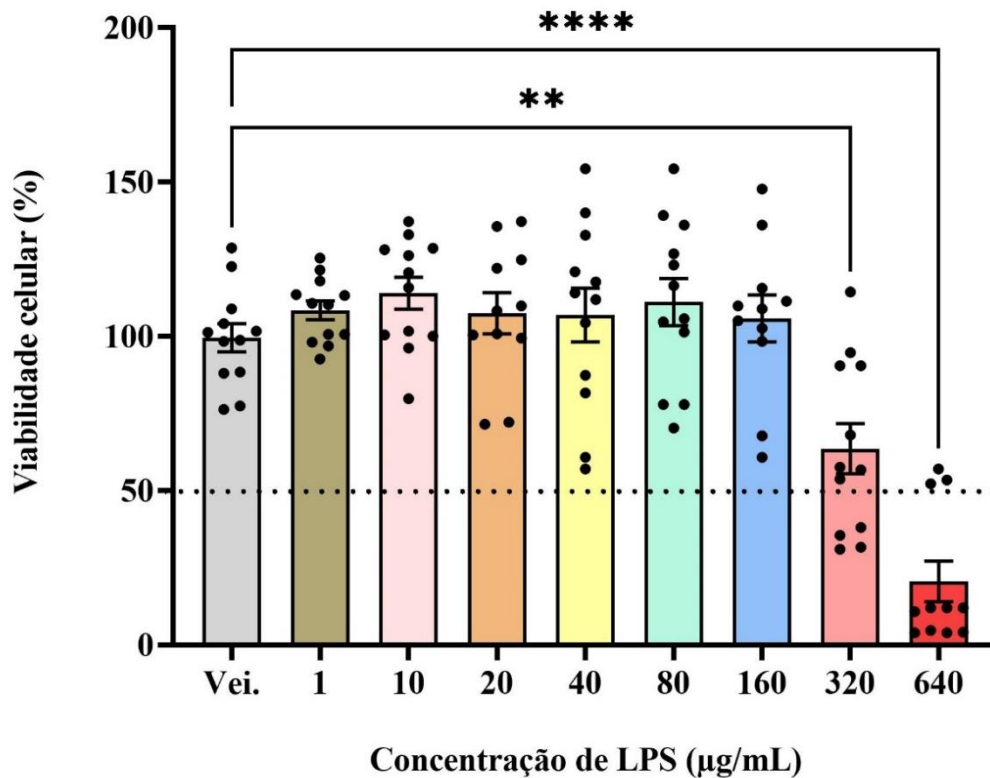


Figura 9. Ensaio de Viabilidade Celular por meio de MTT em células SH-SY5Y diferenciadas e tratadas por 24 horas com LPS. Os dados são representados pela média \pm EPM (n= 11-12 por grupo). Teste ANOVA de uma via entre o veículo e todas as concentrações de LPS, seguido de teste *post hoc* de Dunnett. ** p < 0,002: diferença entre vei. e 320 µg/mL; **** p < 0,0001: diferença entre vei. e 640 µg/mL. **AR:** ácido retinoico; **BDNF:** fator neurotrófico derivado do cérebro; **LPS:** Lipopolissacarídeo de *E. coli*; **MTT:** 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium; **Vei.:** Veículo.

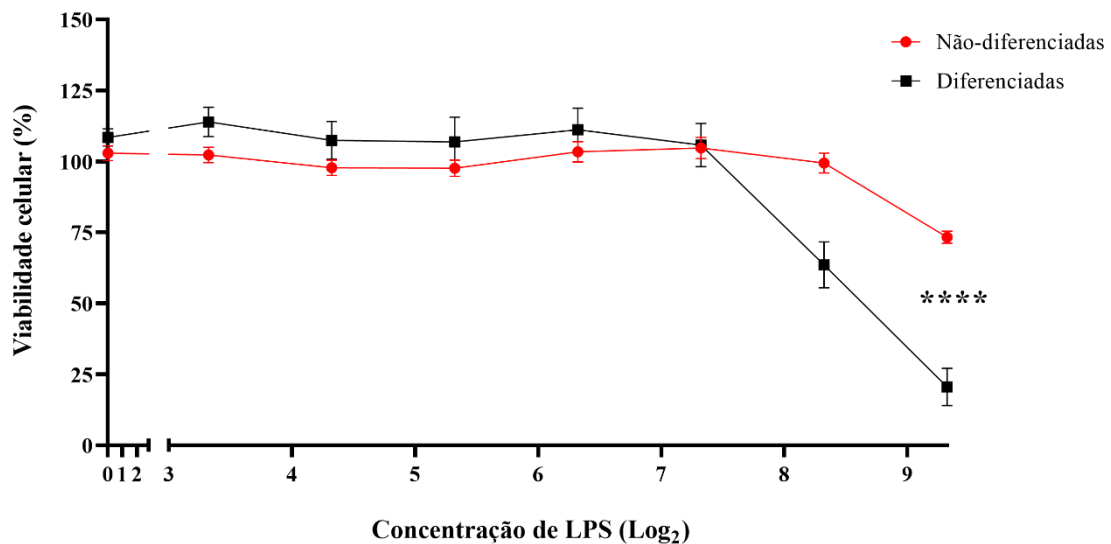


Figura 10. Ensaio de Viabilidade Celular por meio de MTT em células SH-SY5Y não-diferenciadas e em células diferenciadas, tratadas por 24 horas com LPS. Os dados são representados pela média \pm EPM (n= 11-12 por grupo). Teste ANOVA de duas vias, seguido de teste *post hoc* de Sidak. **** p < 0,0001: efeito de interação entre o tratamento com LPS e a diferenciação com AR e BDNF. Dados representados em log de base 2. **LPS:** Lipopolissacarídeo de *E. coli*.

5.4 Experimento 4: o processo de diferenciação das células SH-SY5Y com AR e BDNF aumentou a expressão de receptor D1, mas não alterou a expressão de Tirosina Hidroxilase e receptor do tipo 1 do N-metil D-aspartato.

Para investigar o fenótipo celular dos neurônios, foi verificada a expressão do receptor do tipo 1 do N-metil D-Aspartato (NMDAR1), da enzima Tirosina Hidroxilase (TH) e receptor D1 em células não-diferenciadas e diferenciadas por 8 dias com AR e BDNF por meio de WB. A expressão de receptores de NMDAR1 indica que a célula pode responder ao glutamato, o que pode levar a uma série de efeitos intracelulares, como a abertura de canais iônicos¹¹³. Já a expressão de TH indica que a célula pode estar envolvida na síntese de catecolaminas, como noradrenalina e dopamina¹¹⁴. A expressão de D1 em uma célula indica que a mesma pode responder a dopamina, que está envolvida na regulação de inúmeros papéis cruciais a nível celular, como o manejo da plasticidade sináptica¹¹⁵.

Como demonstrado na Figura 11a-b, é possível verificar que após realização de Teste T não pareado não houve diferença significativa na expressão de NMDAR1 ($t=2,004$; $df=4$; $p=0,1156$) e TH ($t=0,4976$; $df=4$; $p=0,6449$) entre os grupos. Na figura 11c, é possível visualizar que houve um aumento significativo na expressão de receptor D1 ($t=5,412$; $df=4$; $p=0,0056$) em células diferenciadas.

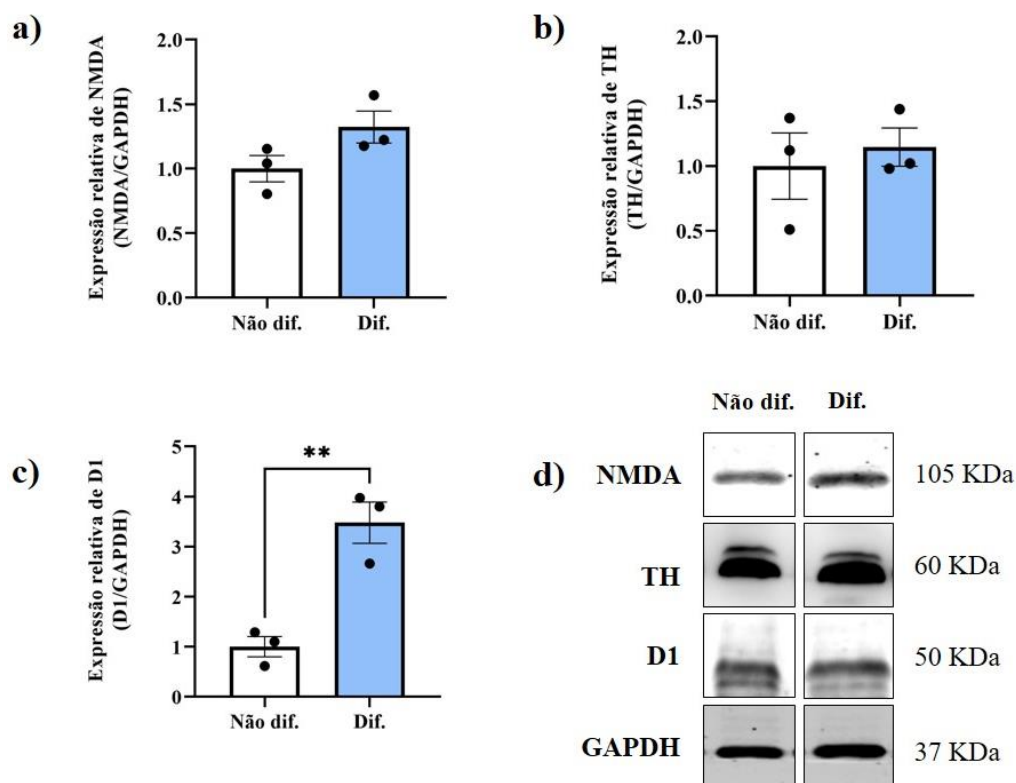


Figura 11. Expressão de NMDAR1, TH e D1 em células SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas com AR e BDNF por 8 dias. Em a, b e c, representação quantitativa da expressão de NMDAR1, TH e D1, respectivamente. Em d, imagem representativa da imunorreatividade para as proteínas avaliadas por WB. Todas as proteínas foram normalizadas pelo GAPDH. Os dados são representados pela média \pm EPM (n = 3 por grupo). Teste T de Student não pareado. ** p < 0,006: diferença na expressão de D1 entre células não diferenciadas e diferenciadas. AR: ácido retinoico; BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; Dif.: células diferenciadas; GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; Não dif.: células não diferenciadas; NMDA: N-metil D-Aspartato; TH: tirosina hidroxilase; WB: Western Blotting.

5.5 Experimento 5: o processo de diferenciação das células SH-SY5Y com AR e BDNF aumentou a expressão de Neuronal Nuclei.

Para investigar se o processo de diferenciação celular foi eficiente e, portanto, capaz de gerar um fenótipo neuronal maduro nas células SH-SY5Y, foi avaliada a expressão do marcador de neurônios maduros *Neuronal Nuclei* (NeuN) por meio de WB em células não-diferenciadas e células diferenciadas por 8 dias com AR e BDNF. Após realização de Teste T não pareado, uma expressão significativamente maior de NeuN (t= 3,123; df= 4; p= 0,0354) foi detectada em células SH-SY5Y diferenciadas por 8 dias (Figura 12).

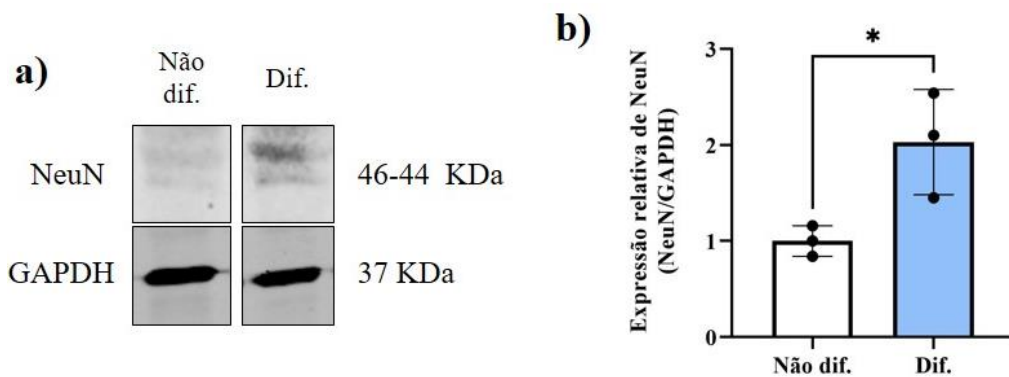


Figura 12. Expressão de NeuN em células SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas com AR e BDNF por 8 dias. Em **a** imagem representativa da imunoreatividade para as proteínas avaliadas por WB. Em **b**, representação quantitativa da expressão de NeuN. A proteína foi normalizada pelo GAPDH. Os dados são expressos pela média \pm EPM ($n=3$ por grupo). Teste T de *Student* não pareado ($t=3,123$; $df=4$). * $p < 0,05$. **AR**: ácido retinóico; **BDNF**: fator neurotrófico derivado do cérebro; **Dif.**: células diferenciadas; **Não dif.**: células não diferenciadas; **NeuN**: *Neuronal Nuclei*; **WB**: *Western Blotting*.

5.6 Experimento 6: tratamento com IL-1 β durante 24 horas não alterou viabilidade celular de células diferenciadas com AR e BDNF.

Foi realizado MTT para verificar se a IL-1 β afeta a viabilidade celular de neurônios diferenciados com AR e BDNF por 8 dias. Após realização de ANOVA de uma via, não foi detectada alteração ($F_{4,54} = 3,508$; $p = 0,1003$) na viabilidade celular em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 13).

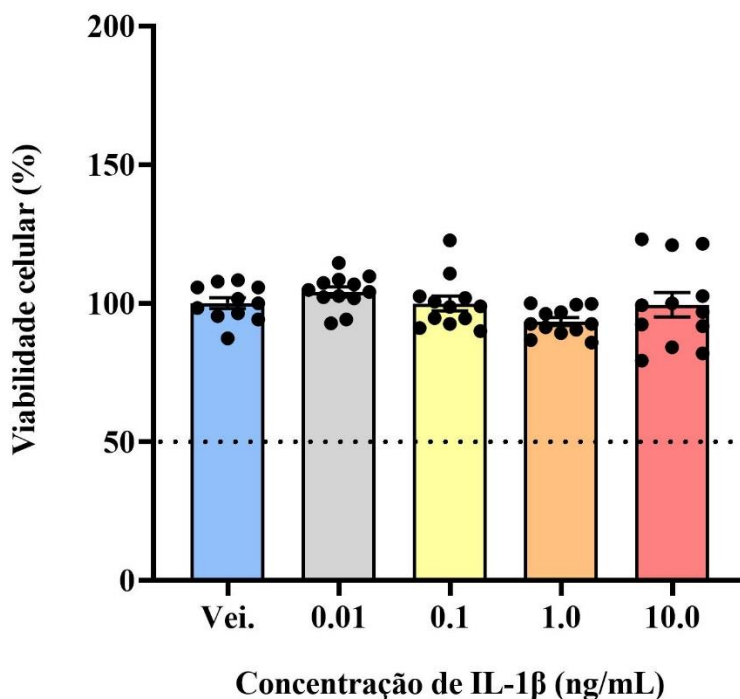


Figura 13. Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica MTT em células SH-SY5Y diferenciadas com AR e BDNF e tratadas por 24 horas com IL-1 β . Os dados são representados pela média \pm EPM ($n=3$ por

grupo). Teste ANOVA de uma via entre o veículo e todas as concentrações de IL-1 β , seguido de teste *post hoc* de Dunnett ($F_{4,54} = 3,508$; $p = 0,1003$). **AR**: ácido retinóico; **BDNF**: fator neurotrófico derivado do cérebro; **Ctrl.**: células controle; **IL-1 β** : Interleucina-1 β ; **MTT**: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium; **Vei.**: veículo.

5.7 Experimento 7: tratamento com IL-1 β durante 24 horas não alterou a expressão de TrKB total e levou a uma tendência de aumento na expressão de sinaptofisina em células diferenciadas com AR e BDNF.

Para verificar se a IL-1 β poderia alterar a expressão de sinaptofisina e TrKB em células diferenciadas com AR e BDNF por 8 dias, potencialmente afetando a plasticidade destas células, foi realizado o WB e quantificação das proteínas. Por meio do ANOVA de uma via, é possível observar que não houve alteração significativa na expressão de SYP ($F_{4,10} = 0,3493$; $p = 0,0972$) após tratamento com IL-1 β . Porém, o teste *post hoc* de Dunnett revelou que houve tendência a aumento da expressão de SYP após tratamento com as seguintes concentrações de IL-1 β : 0.01 ng/mL ($p = 0,0598$), 1 ng/mL ($p = 0,0902$) e 10 ng/mL ($p = 0,0772$) (Figura 14a). Não houve alteração de TrKB total ($F_{4,10} = 0,8782$, $p = 0,3530$, ANOVA de uma via) (Figura 14b).

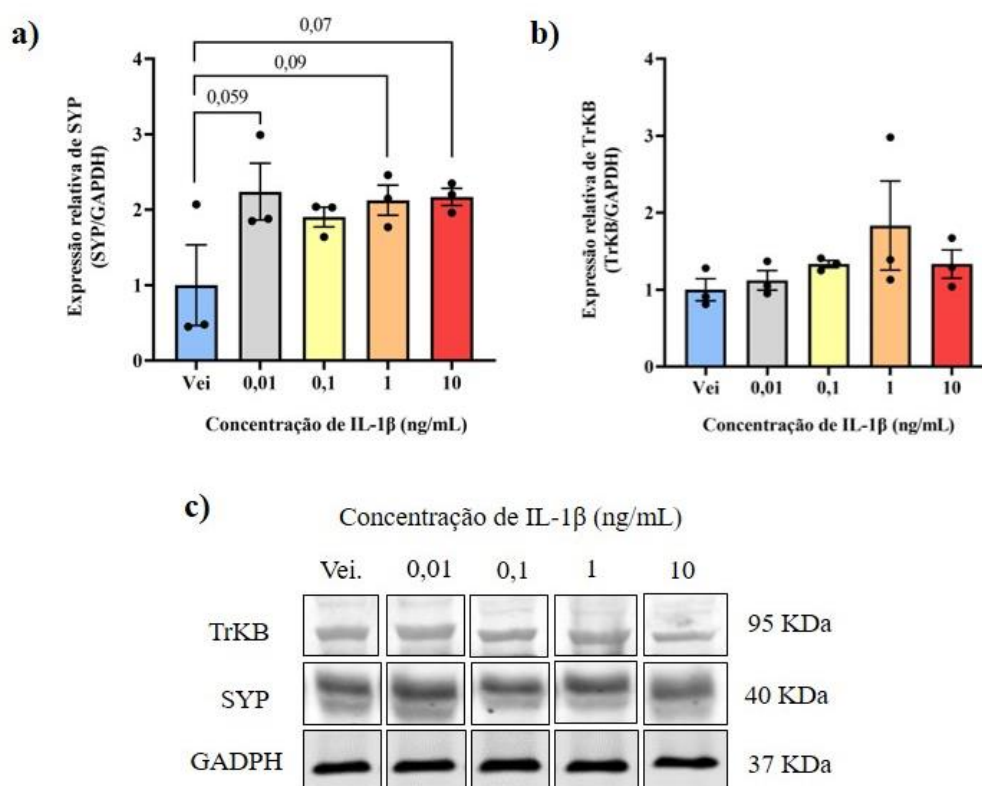


Figura 14. Expressão de SYP e TrKB em células SH-SY5Y diferenciadas por 8 dias e tratadas com IL-1 β . Em **a** e **b**, representação quantitativa da expressão de SYP, e TrKB, respectivamente. Em **c**, imagem representativa da imunorreatividade para as proteínas avaliadas por WB. Todas as proteínas foram normalizadas pelo GAPDH. Os dados são representados pela média \pm EPM ($n = 3$ por grupo). Teste

ANOVA de uma via realizado entre o veículo e todas as concentrações de IL-1 β , seguido de teste *post hoc* de *Dunnnett*. **IL-1 β** : Interleucina-1 β ; **GAPDH**: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; **SYP**: sinaptofisina; **TrKB**: receptor tirosina quinase B; **Vei**: veículo; **WB**: *Western Blotting*.

5.8 Experimento 8: tratamento com IL-1 β durante 24 horas não alterou a intensidade de fluorescência para a β III-tubulina e o número de células diferenciadas com AR e BDNF.

Para verificar se o tratamento com a IL-1 β poderia alterar a morfologia neuronal, foi realizado imunofluorescência para marcação de β III-tubulina e DAPI em células SH-SY5Y diferenciadas com AR e BDNF por 8 dias e tratadas por 24 horas com IL-1 β (figura 15). Não foi encontrada diferença significativa na intensidade de fluorescência para a β III-tubulina ($F_{4,10} = 0,4776$, $p = 0,919$, ANOVA de uma via) (Figura 16), bem como alteração no número de células após o tratamento com as diferentes concentrações de IL-1 β ($F_{4,10} = 0,7415$, $p = 0,8303$, ANOVA de uma via) (Figura 17).

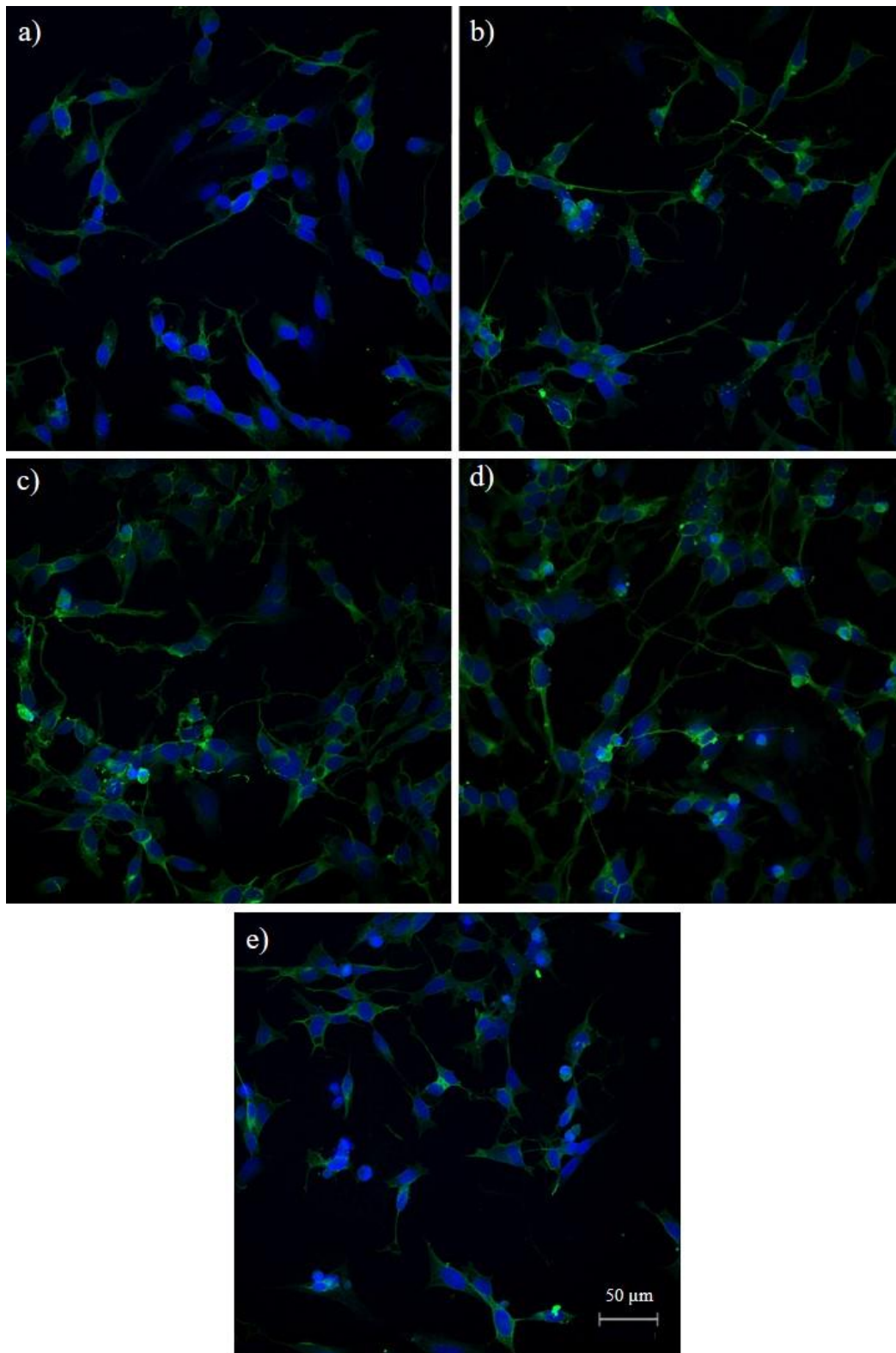


Figura 15: Células SH-SY5Y diferenciadas por 8 dias com AR e BDNF e tratadas por 24 horas com IL-1 β , imunomarcadas com DAPI e β III-tubulina. Em **a**, células tratadas apenas com o veículo. Em **b**, células tratadas com 0,01 ng/mL de IL-1 β . Em **c**, células tratadas com 0,1 ng/mL de IL-1 β . Em **d**, células tratadas com 1 ng/mL de IL-1 β . Em **e**, células tratadas com 10 ng/mL de IL-1 β . Aumento de 40 x em microscopia confocal. **IL-1 β** : Interleucina-1 β ; **DAPI**: Dicloridrato de 4',6-Diamidina-2'-fenilindo; **AR**: ácido retinoico; **BDNF**: fator neurotrófico derivado do cérebro.

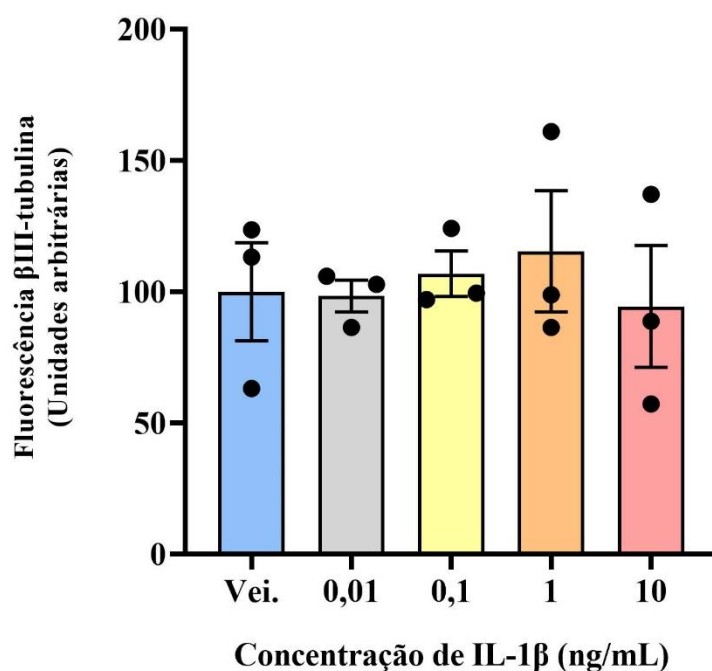


Figura 16. Representação gráfica da intensidade de fluorescência para β III-tubulina de células SH-SY5Y diferenciadas por 8 dias com AR e BDNF e tratadas por 24 horas com IL-1 β . Os dados são representados pela média \pm EPM (n= 3 por grupo). Teste ANOVA de uma via entre o veículo e todas as concentrações de IL-1 β , seguido de teste *post hoc* de Dunnett. **IL-1 β** : Interleucina-1 β ; **DAPI**: Dicloridrato de 4',6-Diamidina-2'-fenilindol; **Vei**: veículo.

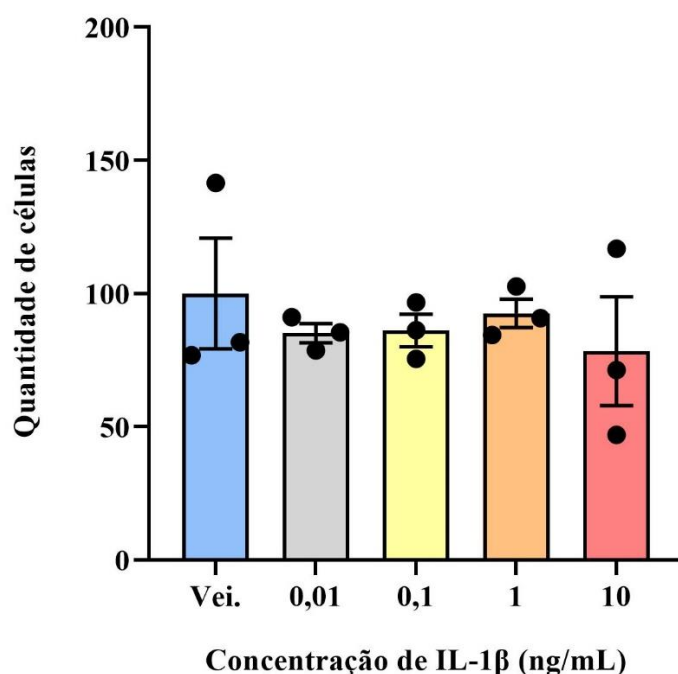


Figura 17. Representação gráfica da quantificação de células após tratamento com diferentes dosagens de IL-1 β . Os dados são representados pela média \pm EPM (n= 3 por grupo). Teste ANOVA de uma via entre o veículo e todas as concentrações de IL-1 β , seguido de teste *post hoc* de Dunnett. **IL-1 β** : Interleucina-1 β ; **DAPI**: Dicloridrato de 4',6-Diamidina-2'-fenilindol; **Vei**: veículo.

5.9 Experimento 9: tratamento com IL-1 β durante 24 horas reduziu o comprimento dos prolongamentos neuríticos primários de células diferenciadas com AR e BDNF.

Para verificar se o tratamento com a IL-1 β poderia alterar a morfologia neuronal, foi analisado o comprimento dos prologamentos neuríticos por meio de microscopia de campo claro após o tratamento com as diferentes concentrações de IL-1 β (Figura 18). Houve uma redução significativa ($H_4= 13.13$, $p= 0,0106$, teste de *Kruskal-Wallis*) no comprimento dos neuritos primários após a de IL-1 β no meio de cultura da células. O teste post hoc de Dunn demonstrou que houve uma diferença significativa entre o grupo veículo e a concentração de 10 ng/mL de IL-1 β ($p= 0,0158$) (Figura 19).

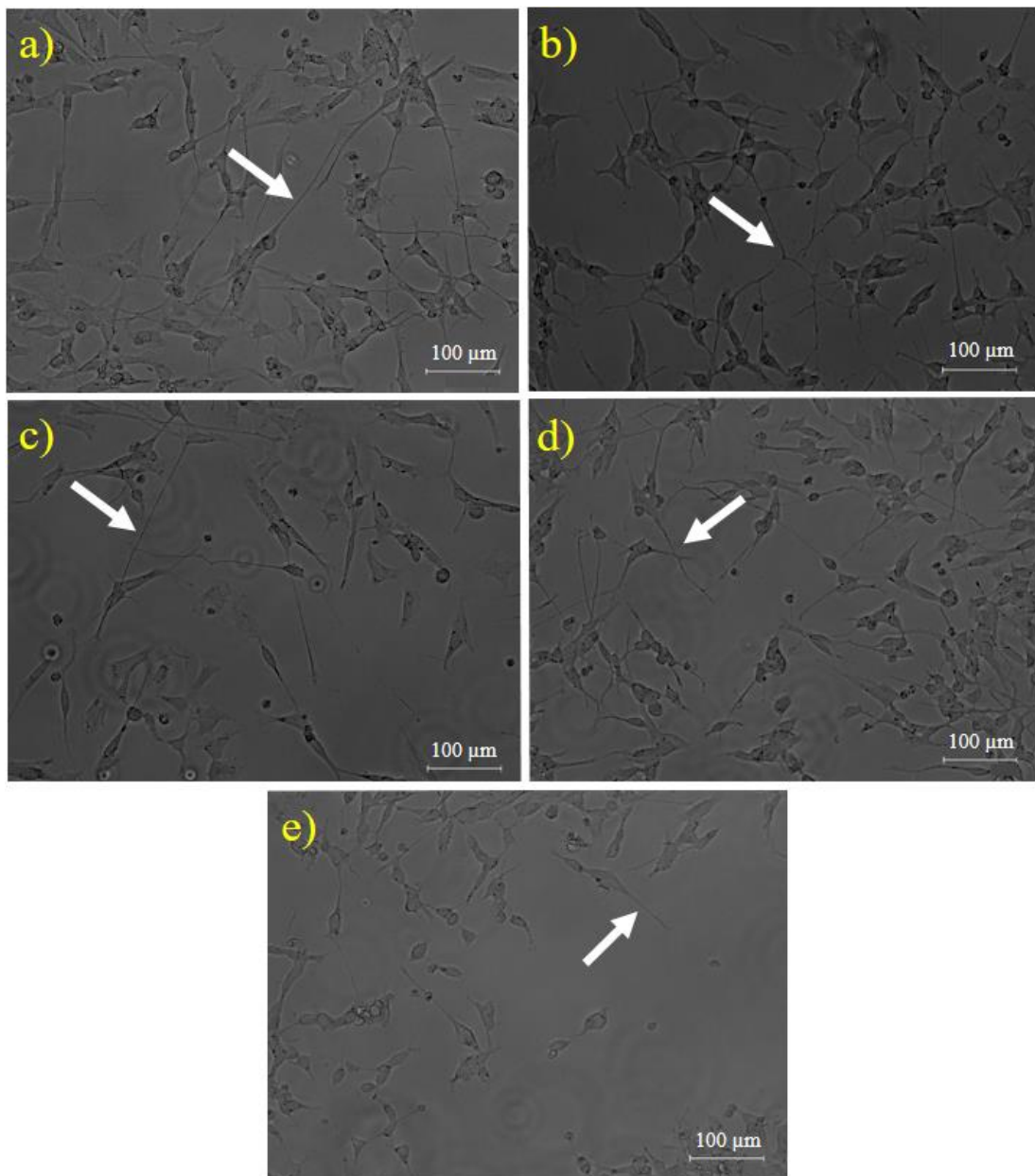


Figura 18. Imagens em campo claro de células SH-SY5Y diferenciadas por 8 dias e tratadas por 24 horas com IL-1 β . Em **a**, células tratadas apenas com o veículo. Em **b**, células tratadas com 0,01 ng/mL de IL-1 β . Em **c**, células tratadas com 0,1 ng/mL de IL-1 β . Em **d**, células tratadas com 0,1 ng/mL de IL-1 β . Em **e**, células tratadas com 10 ng/mL de IL-1 β . Lente com aumento de 20x em microscopia de campo claro. **IL-1 β** : Interleucina-1 β . **Setas brancas**: prolongamentos neuríticos.

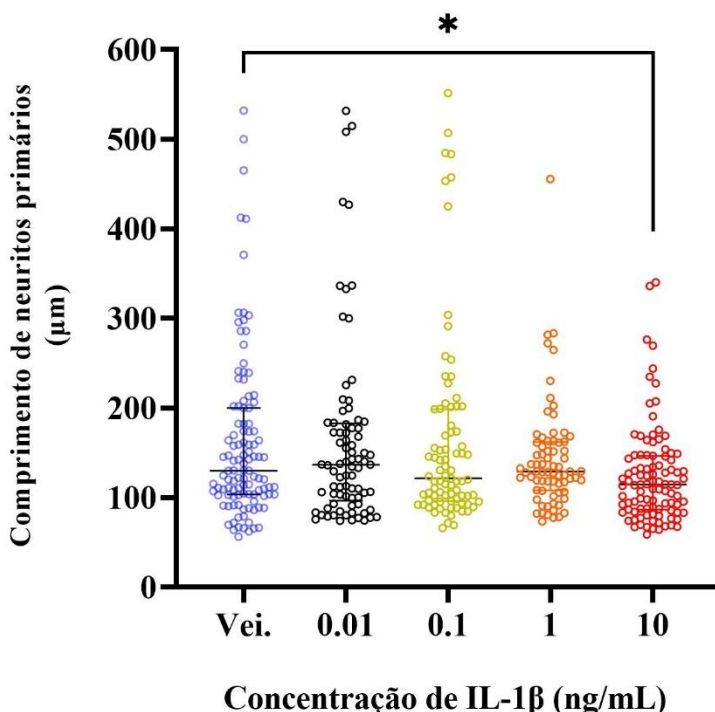


Figura 19. Comprimento dos neuritos primários de células SH-SY5Y diferenciadas por 8 dias e tratadas por 24 horas com IL-1 β . Os dados são representados pela média \pm EPM (n= 72 neuritos por grupo). Teste *Kruskal-Wallis* entre o veículo e todas as concentrações de IL-1 β , seguido de teste *post hoc* de *Dunn*. * $p < 0,05$: diferença entre o veículo e a concentração de 10 ng/mL de IL-1 β . **IL-1 β** : Interleucina-1 β ; **Veí.:** veículo.

5.10 Experimento 10: tratamento com IL-1 β durante 24 horas reduziu a expressão de actina de células diferenciadas com AR e BDNF.

No intuito de avaliar de forma molecular se as diferentes concentrações de IL-1 β poderiam interferir na expressão de proteínas do citoesqueleto de neurônios, foi avaliado por meio de WB a expressão de Actina após aplicação de diferentes concentrações de IL-1 β . Na imagem 20b, é possível averiguar que houve uma redução significativa na expressão de Actina após aplicação de 0,1 e 10 ng/mL de IL-1 β .

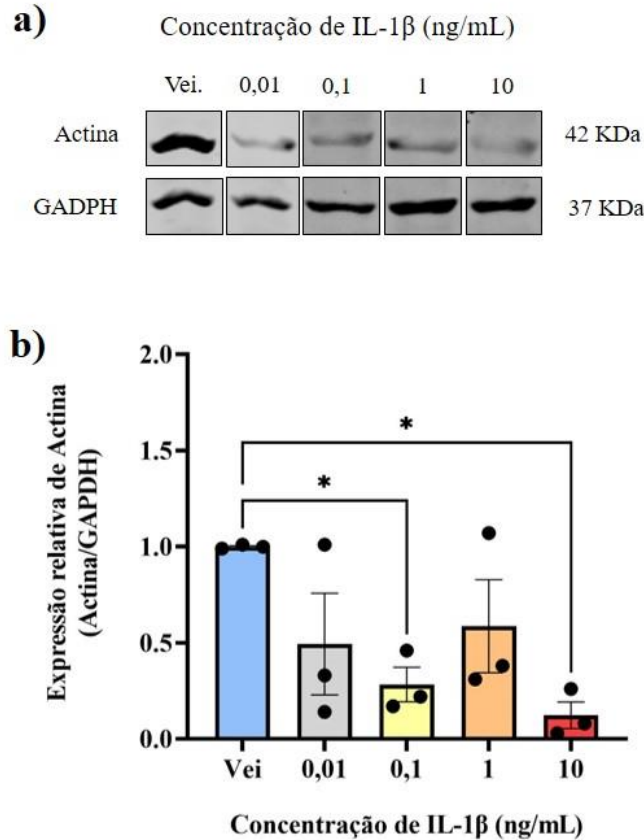


Figura 20. Expressão de Actina em células SH-SY5Y diferenciadas com AR e BDNF por 8 dias e tratadas com IL-1 β . Em **a** imagem representativa da imunorreatividade para a proteína avaliada por WB. Em **b**, representação quantitativa da expressão de Actina. A proteína foi normalizada pelo GAPDH. Os dados são expressos pela média \pm EPM (n= 3 por grupo). Teste ANOVA de uma via entre o veículo e todas as concentrações de IL-1 β , seguido de teste *post hoc* de *Dunnett*. * p < 0,05: diferença entre o veículo e as concentrações de 0,01 e 10 ng/mL de IL-1 β . **IL-1 β** : Interleucina-1 β ; **Vei**: veículo; **WB**: *Western Blotting*.

5.11 Experimento 11: tratamento com IL-1 β durante 24 horas alterou a expressão de componentes do Sistema Endocanabinoide em células diferenciadas com AR e BDNF.

Para verificar se o tratamento por 24 horas com IL-1 β poderia alterar a expressão de componente do SECB em células diferenciadas com AR e BDNF por 8 dias, foi realizado o WB para avaliar expressão de CB1r, TRPV1, FAAH e MAGL. Um aumento significativo na expressão de CB1r foi detectado após o tratamento com IL-1 β ($F_{4,10} = 0,5710$, $p = 0,0061$, ANOVA de uma via). O *post hoc* de *Dunnett* revelou que houve alteração significativa na expressão de CB1r após aplicação das seguintes concentrações de IL-1 β : 1 ng/mL ($p = 0,0064$) e 10 ng/mL ($p = 0,0206$). Apenas uma tendência na expressão de CB1r foi observada após aplicação de 0,1 ng/mL de IL-1 β ($p = 0,0747$) (Figura 21a).

Além disso, houve uma redução significativa na expressão de TRPV1 após tratamento com IL-1 β ($F_{4,10} = 0,5575$; $p = 0,0630$; ANOVA de uma via). O teste *post hoc* de Dunnett demonstrou que houve alteração significativa na expressão de TRPV1 após aplicação de 0,1 ng/mL de IL-1 β ($p = 0,0384$) (Figura 21b).

Ademais, foi observado redução significativa na expressão de MAGL após tratamento com IL-1 β ($F_{4,10} = 0,3354$, $p = 0,0173$, ANOVA de uma via). Essa alteração foi observada nas seguintes concentrações de IL-1 β : 0.01 ng/mL ($p = 0,0051$), 0.1 ng/mL ($p = 0,0390$) e 1 ng/mL ($p = 0,049$) (Figura 21c). Uma atenuação significativa na expressão de FAAH ocorreu após aplicação de IL-1 β ($F_{4,10} = 0,7773$; $p = 0,0003$; ANOVA de uma via) nas concentrações de 0.1 ($p = 0,0054$), 1 ($p = 0,0058$) e 10 ng/mL ($p = 0,0009$) (Figura 21d).

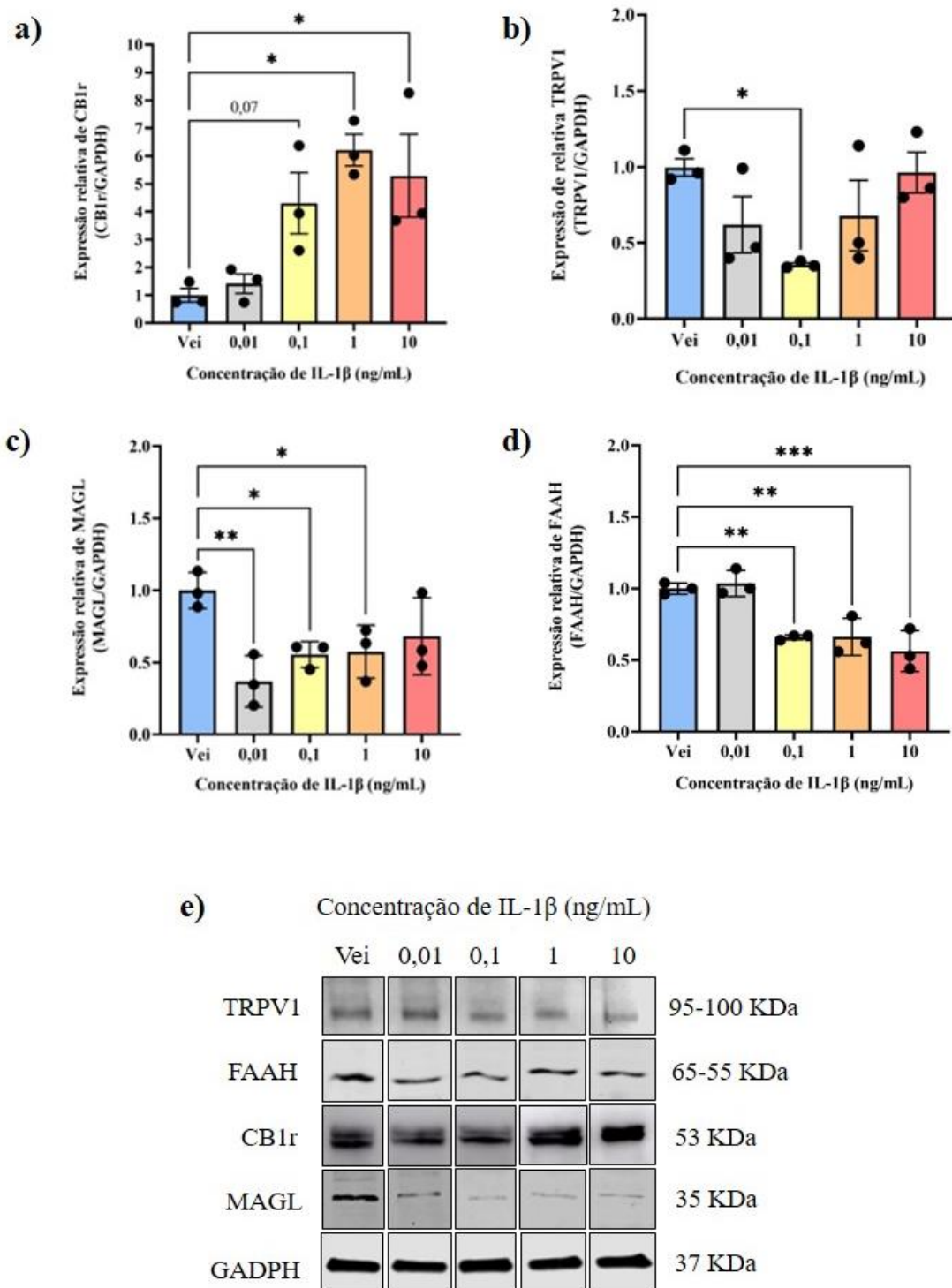


Figura 21. Expressão de CB1r, TRPV1, FAAH e MAGL em células SH-SY5Y diferenciadas por 8 dias e tratadas com IL-1β. Em **a**, **b**, **c** e **d**, representação quantitativa da expressão de CB1r, TRPV1, MAGL e FAAH, respectivamente. Em **e**, imagem representativa da imunorreatividade para as proteínas avaliadas por WB. Todas as proteínas foram normalizadas pelo GAPDH. Os dados são representados pela média ± EPM (n= 3 por grupo). Teste ANOVA de uma via entre o veículo e todas as concentrações de IL-1β, seguido de teste *post hoc* de Dunnett. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. **CB1r**: receptor CB1; **FAAH**: Hidrolase Amida de Ácidos Graxos; **GAPDH**: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; **IL-1β**: Interleucina-1β; **MAGL**: Monoacilglicerol Lipase; **TRPV1**: Receptor Vaniloide de Potencial Transitório tipo 1; **Vei.**: veículo; **WB**: *Western Blotting*.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Diante dos resultados obtidos até o momento, observamos que o protocolo de diferenciação utilizado neste estudo foi capaz de modificar a morfologia das células SH-SY5Y, transformando-as em neurônios maduros. As células não-diferenciadas apresentaram características compatíveis a um estágio imaturo do desenvolvimento neuronal, manifestando corpos celulares não-polarizados e poucos prolongamentos neuríticos, geralmente curtos, conforme já descrito na literatura¹¹⁶. Logo após a primeira aplicação de AR, notou-se aumento das extensões neuríticas e o alongamento inicial do corpo celular dos neurônios. Já é descrito na literatura que a aplicação de AR é capaz de ocasionar o crescimento de neuritos e de levar a um alongamento celular¹¹⁷, além de contribuir para expressão de TrKB, o receptor de BDNF¹¹⁸.

Após a última adição de AR e BDNF no meio de cultura foi possível observar um aspecto mais alongado dos neurônios, grandes extensões neuríticas e complexas redes de ligação neuronal, bem como previamente indicado por estudos correlatos^{95,96}. Entre as neurotrofinas, o BDNF desempenha um papel importante no desenvolvimento e extensão das neuritos, além da formação e estabilização de conexões sinápticas¹¹⁹. Sendo assim, a combinação AR-BDNF é capaz de induzir aumentos significativos na expressão de genes sinápticos em comparação com a aplicação unicamente de AR¹²⁰. Nessa perspectiva, a utilização de AR e BDNF promove conexões sinápticas elaboradas, visto o aumento na expressão de proteínas pré e pós-sinápticas¹²¹.

Durante o processo de diferenciação, a transformação de células precursoras em neurônios envolve remodelamento e redistribuição de proteínas do citoesqueleto, especialmente de β III-tubulina, uma proteína que auxilia na estabilidade da matriz intracelular e no transporte molecular¹²². Por este ângulo, o aumento significativo na expressão de β III-tubulina em células diferenciadas indica, de forma quantitativa, que o processo de diferenciação intensificou a expressão de proteínas do citoesqueleto e, conseqüentemente, favoreceu o aumento na formação de neuritos.

Um outro importante aspecto a ser analisado no processo de diferenciação celular é a sensibilidade celular após a diferenciação. A sensibilidade neuronal se faz importante em estudos de neurotoxicidade e neuroinflamação, visto que culturas da linhagem SH-SY5Y no estado proliferativo apresentam resistência devido a sua característica tumoral¹²³. Para avaliar se a diferenciação leva a uma maior sensibilidade dos neurônios

maduros obtidos foi utilizado o LPS, uma vez que diversos trabalhos empregam este composto como estímulo aversivo às células SH-SY5Y^{124,125,126}. Pode-se observar que os neurônios não-diferenciados apresentaram atenuação de cerca de 26% da viabilidade celular apenas na maior concentração de LPS (640 µg/mL) utilizada.

Já as células diferenciadas por 8 dias apresentaram uma intensa diminuição na viabilidade celular, de 37%, na concentração de LPS (320 µg/mL) e redução quase total (80%) com a maior concentração de LPS (640 µg/mL). Portanto, neurônios diferenciados por 8 dias apresentaram uma maior vulnerabilidade frente ao LPS, de modo que tais resultados estão em consonância com outros estudos da literatura. Por exemplo, foi demonstrado que células SH-SY5Y tornaram-se mais sensíveis à toxicidade da *6-hydroxydopamine* após passarem pelo processo de diferenciação com AR por 7 dias¹²⁷. Ainda, células SH-SY5Y diferenciadas com AR e BDNF por 8 dias são mais sensíveis à toxicidade induzida por agregados de β-amiloide que células SH-SY5Y não diferenciadas⁸⁶.

No que se refere ao fenótipo celular das culturas utilizadas, não foi detectada diferença significativa na expressão de Tirosina Hidroxilase (TH) entre células não-diferenciadas e diferenciadas por 8 dias. A TH é a enzima responsável por catalisar a conversão do aminoácido L-tirosina em L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). A L-DOPA é o precursor da dopamina, que, por sua vez, é um precursor de noradrenalina e adrenalina¹²⁸. Nesse sentido, TH é um importante marcador do fenótipo catecolaminérgico e está presente nas células SH-SY5Y mesmo no estado proliferativo¹²⁹.

Verificamos, entretanto, um aumento na expressão do receptor D1. O receptor D1 faz parte da família de receptores da dopamina, sendo distribuído em diferentes quantidades nas diferentes regiões do anatômica do SNC¹³⁰. Este resultado está de acordo com a literatura, visto que o protocolo que combina AR e BDNF promove um fenótipo dopaminérgico nas células SH-SY5Y, acarretando um aumento na expressão de receptores de dopamina^{130,131}. Porém, para identificar se o processo de diferenciação utilizado no presente estudo pode levar a um fenótipo dopaminérgico em células SH-SY5Y, seria interessante a marcação de outros receptores dopaminérgicos, como o D2 e D3, assim como a verificação da expressão do transportador de dopamina (DAT).

Avaliamos, ainda, a expressão do receptor NMDAR1. Não houve alteração na expressão deste receptor entre células não-diferenciadas e diferenciadas por 8 dias. O NMDA é um receptor ionotrópico ativado pelo glutamato e considerado o principal receptor do sistema glutamatérgico, uma vez que ele tem papel de destaque na mediação de importantes funções dessa neurotransmissão, tais como: cognição, memória, plasticidade neural e neurotoxicidade¹³². Porém, apenas analisar o receptor NMDA é insuficiente para concluir que uma célula possui um fenótipo glutamatérgico, sendo necessário, portanto, avaliar a expressão de proteínas envolvidas na síntese ou excreção do glutamato, como o vGlut¹³³.

Neste estudo, também foi possível observar que a diferenciação celular com AR e BDNF por um período de 8 dias promoveu uma expressão significativa de NeuN nas células. A proteína NeuN está localizada nos núcleos e no citoplasma perinuclear da maioria dos neurônios do SNC, porém é predominantemente expressa em células maduras, pós mitóticas e permanentemente diferenciadas¹³⁴. Nessa perspectiva, este resultado está em consonância com a literatura, visto que já foi observado em estudos anteriores um aumento significativo na expressão de NeuN em células SH-SY5Y diferenciadas apenas com ácido retinoico¹³⁵. Levando em conta que o NeuN é um marcador de fenótipo neuronal maduro confiável, esses resultados indicam que a diferenciação com AR e BDNF por 8 dias acarretou um fenótipo maduro.

Levando em conta que o protocolo de diferenciação por 8 dias com AR e BDNF foi capaz de modificar a morfologia e expressão de moléculas nas células, originando um fenótipo do tipo neuronal maduro, este modelo foi considerado o ideal para dar prosseguimento com os experimentos. A partir dos dados obtidos, foi possível verificar que a viabilidade celular de neurônios diferenciados não foi alterada após exposição a IL-1 β .

É importante ressaltar que a técnica empregada para verificar se houve alteração na viabilidade celular após aplicação de IL-1 β foi o MTT. Nesse sentido, foi avaliado majoritariamente o desempenho mitocondrial das células após aplicação da interleucina⁹⁹. Por este ângulo, seria interessante realizar outros métodos para avaliar se a IL-1 β pode afetar os neurônios SH-SY5Y diferenciados, como por exemplo o ensaio de liberação da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH). O LDH catalisa a conversão de lactato a piruvato na glucólise, sendo uma forma de se avaliar a integridade de membrana plasmática em função da quantidade de LDH presente no meio de cultura¹³⁶. Também é

válido ressaltar que o CB1r desempenha um papel essencial na regulação da atividade mitocondrial, controlando diretamente a respiração celular e a produção de energia¹³⁷. Nesse sentido, o aumento na expressão de CB1r observado nesse trabalho pode estar atrelado a manutenção da atividade mitocondrial mesmo após aplicação de IL-1 β nas culturas.

No que diz respeito ao níveis de SYP, foi possível verificar que houve um perfil de aumento na expressão dessa proteína após aplicação de diferentes concentrações de IL-1 β (0.01, 1 e 10 ng/mL) no meio de cultura das células. A sinaptofisina é uma proteína de vesícula pré-sináptica que regula a endocitose das vesículas nos neurônios¹³⁸. Nesse sentido, avaliar a expressão de sinaptofisina é um importante parâmetro para averiguar alterações na sinaptogênese. Levando em conta que também foi verificado um aumento na expressão de CB1r após 24 horas de exposição a IL-1 β (1 e 10 ng/mL), é válido ressaltar que estudos anteriores demonstram que existe uma correlação entre a atividade do CB1r e a SYP, visto que a utilização de um agonista do CB1r promoveu o aumento da expressão de sinaptofisina no cerebelo e hipocampo do cérebro de ratos¹³⁹, sugerindo a ação pró-plasticidade desses receptores.

Além disso, pesquisas também verificaram a presença de receptores CB1 em axônios finos e em cones de crescimento axonal, sendo que a maioria desses locais estava associada a terminais sinápticos¹⁴⁰. Nessa perspectiva, nesses locais o CB1r promove o controle da liberação de neurotransmissores, ressaltando novamente essa íntima relação entre vesículas sinápticas e a expressão de CB1r. Nesse sentido, para compreender melhor os efeitos da IL-1 β na sinaptogênese, faz-se necessário avaliar a expressão de outras proteínas ligadas a esse mecanismo neuroplásticos, como PDS-95, PDS-93, basson e sinapsinas, o que ainda será feito.

A aplicação de diferentes concentrações de IL-1 β não alterou os níveis de expressão de TrkB total. É válido ressaltar que o processo de diferenciação adotado neste trabalho pode ter influenciado na manutenção dos níveis dessa proteína, visto que já foi relatado que o tratamento de células de neuroblastoma com AR induz a expressão de TrkB. Além disso, outros estudos demonstraram que a adição de BDNF às células SH-SY5Y tratadas com AR estimulou a fosforilação da tirosina de TrkB e a diferenciação neuronal¹⁴¹. O TrkB fosforilado possui um papel relevante na sinaptogênese voltada para a aprendizagem e para a formação de memória no hipocampo¹⁴². Dessa forma, experimentos adicionais estão sendo realizados para avaliar os níveis de fosforilação de

TrkB, pois os níveis de TrkB total inalterados não excluem a participação deste receptor na resposta desencadeada pela aplicação de IL-1 β no meio de cultura.

No que concerne aos aspectos morfológicos avaliados por imunofluorescência, as diferentes concentrações de IL-1 β não modificaram a expressão de β III-tubulina e a quantidade de células. Avaliar a expressão da mesma é essencial para entender se a IL-1 β pode afetar a ramificação e arquitetura dendrítica, já que a β III-tubulina é uma proteína que forma os microtúbulos do citoesqueleto de neurônios¹⁴³. Porém, se faz interessante verificar por meio de *Western Blotting* se a expressão de β III-tubulina foi alterada pela IL-1 β , visto que essa técnica pode ser mais sensível para averiguar os níveis dessa proteína. Surpreendentemente, foi verificado por meio de microscopia de campo claro que houve uma redução no comprimento dos neuritos primários após aplicação de 10 ng/mL de IL-1 β . No intuito de entender qual proteína do citoesqueleto estava sendo possivelmente afetada pela ação da IL-1 β , foi verificado por meio de WB os níveis de actina. Houve redução significativa na expressão de actina após aplicação de 0,1 e 10 ng/mL de IL-1 β no meio de cultura das células. Este resultado está de acordo com a literatura, visto que outros estudos demonstraram que a IL-1 β pode afetar a expressão de Arc, uma proteína que auxilia na formação de F-actina¹⁴⁴. Nesse sentido, levando em conta que expressão de actina foi alterada após exposição de IL-1 β nos neurônios, faz-se interessante a realização de uma imunofluorescência para verificar, por imagem, se a intensidade de fluorescência desta proteína é alterada.

No que se refere a expressão de proteínas relacionadas ao SECB, a exposição à IL-1 β nas concentrações de 1 e 10 ng/mL foi capaz de aumentar significativamente a expressão de CB1r. Esse aumento pode estar atrelado a um papel neuroprotetor, dado a importância desse receptor para a promoção da neuroplasticidade. À vista disso, experimentos demonstram que a exposição ao estresse aumentou a expressão do mRNA e d proteína CB1r no córtex pré-frontal de camundongos, indicando que a presença e ativação deste receptor está atrelada a cenários neuropatológicos para restaurar a homeostase¹⁴⁵. Por outro lado, experimentos com animais *knock out* indicaram que a falta de CB1r produz desregulação do eixo hipotálamo/hipófise/adrenal (HPA) e exacerba as respostas excitotóxicas/neuroinflamatórias induzidas pelo estresse¹⁴⁵.

É importante ressaltar que o processo de diferenciação utilizado neste trabalho envolve o uso de BDNF, que já foi ligado com a potencialização dos efeitos neuroprotetores de CB1r. O eixo de sinalização que envolve BDNF e rCB1 é descrito

como relevante para a promoção da sobrevivência de neurônios do corpo estriado em um modelo murino de doença de *Huntington*¹⁴⁶. Além disso, estudos demonstraram que o BDNF pode aumentar a expressão do receptor CB1 em uma cultura primária de neurônios do cerebelo por meio de uma via que envolve a fosforilação de Akt¹⁴⁷. Nessa perspectiva, se faz importante entender o papel do CB1r em uma possível resposta neuroprotetora contra a IL-1 β . Para tanto, a aplicação de um antagonista/agonista inverso de CB1r, como o AM251, concomitante ao uso das diferentes dosagens de IL-1 β pode revelar se a participação deste receptor é significativa para a manutenção da homeostase celular frente a estímulos aversivos. Além disso, a mensuração dos níveis de BDNF, assim como outras proteínas envolvidas na cascata BDNF-CB1, após tratamento com IL-1 β também se faz interessante para averiguar o papel desse eixo em um contexto neuroinflamatório.

Ademais, é válido ressaltar que o tratamento com a IL-1 β pode estar estimulando uma possível internalização do receptor CB1^{148,149,150}. O processo de internalização levaria a uma subsequente compensação na superfície da membrana, acarretando maior expressão do CB1r após o tratamento com concentrações averiguadas (1 e 10 ng/mL). Nessa perspectiva, novos experimentos serão realizados para averiguar a localização do CB1r nas células, além de que serão averiguados os níveis de CB1r fosforilados.

Curiosamente, o TRPV1, que exerce efeitos opostos ao CB1r, apresentou redução na expressão após aplicação de 0,1 ng/mL de IL-1 β . A atenuação da atividade de TRPV1 já foi associada a benefícios relacionados a neuroplasticidade, visto que estudos relatam a participação desse receptor na ativação do inflamassoma NLRP3 em micróglia¹⁵¹. Em neurônios corticais primários, estudos relatam que a inibição farmacológica do TRPV1 preveniu a morte celular ocasionada pela citotoxicidade da capsaicina¹⁵². A neurotoxicidade mediada pelo TRPV1 está atrelada a sua capacidade de gerar maior influxo de cálcio nas células, visto que o bloqueio da entrada de cálcio em neurônios corticais primários preveniu a morte celular ocasionada pela ativação de TRPV1¹⁵³. Ademais, já foi descrito na literatura que a ativação de CB1r poderia levar a redução da atividade de TRPV1, o que pode ser correlacionado com os resultados observados na figura 20b, onde é possível um perfil de aumento na expressão de CB1r após tratamento com 0.1 ng/mL de IL-1 β .

Também foi verificado que a aplicação de IL-1 β nas concentrações de 0.01, 0.1 e 1 ng/mL levaram a uma redução na expressão de MAGL. A redução dos níveis de MAGL também pode estar relacionado com um processo de neuroproteção, visto que a redução

da atividade dessa enzima leva ao aumento na liberação 2-AG. O 2-AG é um importante lipídeo que atua nos receptores canabinoides para regular o crescimento orientação axonal, além de regular mecanismos neuroplásticos, a neurogênese adulta e atuar na proteção de neurônios contra excitotoxicidade¹⁵⁴. Também é importante ressaltar que o processo de diferenciação utilizado neste estudo pode ter contribuído para a redução dos níveis de MAGL em um contexto aversivo, dado que já foi relatado que na literatura que a utilização de BDNF em uma cultura primária de neurônios do cerebelo diminui a expressão dos transcritos MAGL¹⁵⁴.

Ademais, também foi detectado uma redução na expressão de FAAH nas concentrações de 0,1, 1 e 10 ng/mL de IL-1 β . A limitação da atividade da FAAH também já foi atrelada a um possível mecanismo neuroprotetor, visto que o uso de um inibidor sistêmico da FAAH aumentou os níveis de anandamida no córtex pré-frontal e no hipocampo de ratos, o que foi associado a uma atenuação na expressão de citocinas¹⁵⁵. Em consonância, estudos *in vitro* demonstraram que o aumento na expressão de AEA por meio da inibição de FAAH levou a redução na expressão de TLR4, o que ocasionou redução na liberação de TNF- α , IL-1 β , prostaglandinas e óxido nítrico em uma cultura primária de micróglia¹⁵⁶. Além disso, a utilização de um inibidor da enzima FAAH, o URB597, gerou um efeito antidepressivo, promovendo a proliferação de progenitores neurais e a expressão de BDNF em camundongos submetidos a um modelo de estresse¹⁵⁷.

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as concentrações de IL-1 β utilizadas foram capazes de alterar a expressão de componentes do SECB e de componentes morfológicos das células neuronais. Porém, os achados adquiridos em neurônios humanos não estão em consonância com os resultados observados em trabalhos que correlacionam SECB e IL-1 β em animais, visto que nestes estudos ocorreu a redução da atividade de CB1r e facilitação da via do receptor TRPV1^{83,84,85}. Entretanto, é importante ressaltar que o modelo utilizado no presente estudo envolve apenas um tipo celular, diferente do modelo utilizado nas demais análises com animais. Nesse sentido, a resposta observada em estudos correlatados pode ser decorrência da presença e ativação de outros tipos de células, como micróglia e astrócitos. Além disso, as concentrações de IL-1 β utilizadas em modelos animais por meio de injeções intracerebroventriculares (30 ng/mL)^{83,84,85} são superiores às concentrações utilizadas no presente estudo. Ademais, estudos em modelos celulares que observaram dano ocasionado pela IL-1 β (50 ng/mL)^{42,44} também utilizaram

concentrações superiores às concentrações utilizadas neste trabalho. Nesse sentido, faz-se necessário avaliar os efeitos da IL-1 β em concentrações maiores da mesma.

Ademais, visando melhor entender os efeitos da IL-1 β observados nesse trabalho, faz-se necessário novos experimentos para averiguar os níveis de endocanabinoides após aplicação da citocina no meio de cultura dos neurônios.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo demonstram que neurônios diferenciados por 8 dias com ácido Retinoico e BDNF apresentaram características de um fenótipo neuronal maduro, ratificando que o processo de diferenciação utilizado neste estudo foi eficiente. Os resultados também demonstram que as diferentes concentrações de IL-1 β utilizadas modificaram a expressão de componentes do SECB e, ainda, levou a um perfil de aumento na expressão de SYP. Por outro lado, as diferentes concentrações de IL-1 β ocasionaram redução no comprimento dos prolongamentos neuríticos e diminuíram a expressão de actina, demonstrando que a aplicação da citocina afetou componentes morfológicos dos neurônios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

1. Lyman, M. G. et al. Neuroinflammation: The role and consequences. *Neuroscience Research*, v. 79, p.1–12, 2014.
2. Bersano, A. et al. Neuroinflammation and Brain Disease. *BMC neurology*, v. 23, n. 227, 2023.
3. Troubat, R. et al. Neuroinflammation and depression: A review. *European Journal of Neuroscience*, v. 53, n. 1, p. 151-171, 2020.
4. Nayak, D. et al. Microglia development and function. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 32, p. 367–402, 2014.
5. Ueno, M. et al. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development, *Nat. Neurosci.*, v. 16, n. 5, p. 543–551, 2013.
6. Subhramanyam, C. S. et al. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 94, p. 112-120, 2019.
7. Vainchtein, I.D. Astrócitos e micróglia: na doença e na saúde. *Tendências Neurosci* v. 43, n. 3, p.144–154, 2020.
8. Amanollahi, M. et al. O diálogo entre neuroinflamação e neurogênese adulta: mecanismos envolvidos e alterações nas doenças neurológicas. *Mol Neurobiol*, v. 60, p. 923–959, 2023.
9. Silva, M. A. A. Avaliação da neurotoxicidade do Bisfenol A em cultura primária hipocampo. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
10. Khan, A. W. et al. Autoimmune Neuroinflammatory Diseases: Role of Interleukins. *International journal of molecular sciences*, v. 24, n. 9, p. 7960, 2023.
11. Thakur, S. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Current Progress in Molecular Signaling and Therapeutics. *Inflammation*, v. 46, n. 1, p.1–17, 2023.
12. Sinyor, B. et al. Alzheimer's disease, infammation, and the role of antioxidants. *Journal of Alzheimer's Disease Reports* v. 4, p. 175–183, 2020.

13. Patel, N. S. et al. Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation*, v. 2, n. 9, 2005.
14. Mendonça, I. P. et al. A metformina e a fluoxetina melhoram o comportamento depressivo em um modelo murino da doença de Parkinson através da modulação da neuroinflamação, neurogênese e neuroplasticidade. *Imunofarmacologia Internacional*, v. 102, p. 108415, 2022.
15. Murphy, C. E. et al. Neuroinflammation in schizophrenia: the role of nuclear factor kappa B. *Translational psychiatry*, v. 11, n. 1, p. 528, 2021.
16. J. Rosenblat, D. C. et al. Inflamed moods: a review of the interactions between inflammation and mood disorders, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. v. 53, p. 23–34, 2014.
17. Haapakoski, R. et al. Cumulative meta-analysis of interleukins 6 and 1beta, tumour necrosis factor alpha and c-reactive protein in patients with major depressive disorder. *Brain Behav. Immun.* v. 49, p. 206–215, 2015.
18. Stankiewicz, A. M. et al. The effect of acute and chronic social stress on the hippocampal transcriptome in mice. *PLoS ONE*. v.10 n. 11, p. 1-25, 2015.
19. Henry, C. J. et al. A minociclina atenua a neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS), comportamento doentio e anedonia. *J Neuroinflamação*, v. 5, p. 15-522, 2008.
20. Goshen, I.; Yirmiya, R. The role of pro-inflammatory cytokines in memory processes and neural plasticity. *Psychoneuroimmunology*, v. 4, n. 4, p. 337-378, 2007.
21. Sanz, P. et al. Neuroinflammation and progressive myoclonus epilepsies: From basic science to therapeutic opportunities. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 22, 2020.
22. Chan, A. H. et al. Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. *Journal of Experimental Medicine*, v. 217, n. 1, p. 197-232, 2019.
23. Liu, X. & Quan, N. Microglia and CNS Interleukin-1: Beyond Immunological Concepts. *Frontiers in neurology*, n. 9, v. 8, 2018
24. Dinarello, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, v. 117, n. 14, p. 3720–3732, 2011.

25. Mori, F. et al. Interleukin-1 β promotes long-term potentiation in patients with multiple sclerosis. *Neuromolecular Med.* v. 16, p. 38-51, 2014.
26. Nemeth, D. P. Modulation of Neural Networks by Interleukin-1. *Brain Plasticity*, v. 7, n.1, p. 17-32, 2020.
27. Park, S. Y. et al. Interleukin-1 beta promotes neuronal differentiation through the Wnt5a/RhoA/JNK pathway in cortical neural precursor cells. *Molecular brain*, v. 11, n. 1, p. 1- 12, 2018.
28. Ma, L. et al. Interleukin-1 beta guides the migration of cortical neurons. *J Neuroinflammation*, v. 11, n. 114, 2014.
29. Place, D. E., & Kanneganti, T.D. Recent advances in inflammasome biology. *Current Opinion in Immunology*, v. 50, p. 32–3, 2018.
30. Grebe, A. et al. NLRP3 Inflammasome and the IL-1 Pathway in Atherosclerosis. *Circulation Research*, v. 122, p. 1722-1740, 2018.
31. Bhattacharya, A. et al. Emerging role of the P2X7-NLRP3-IL1 β pathway in mood disorders. *Psychoneuroendocrinology*, v. 98, p. 95–100, 2018.
32. Piccioli, P., & Rubartelli, A. The secretion of IL-1 β and options for release. *Seminars in Immunology*, v. 25, n. 6, p. 425–429, 2013.
33. Di Sabato, D. J. et al. Interleukin-1 receptor on hippocampal neurons drives social withdrawal and cognitive deficits after chronic social stress. *Molecular psychiatry*, v. 26, n. 9, p. 4770–4782, 2021.
34. Dinarello, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquiredimmunity. *Immunological reviews*, v. 281, n. 1, p. 8-27, 2018.
35. Weber, A. et al. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Science Signaling*, v. 3, n. 105, 2010.
36. Thomas, C. et al. Structure of the activating IL-1 receptor signaling complex. *Nat Struct Mol Biol*, v. 19, n. 4, p. 455–457, 2012.

37. Prieto, A. et al. Synapse-specific IL-1 receptor subunit reconfiguration augments vulnerability to IL-1 β in the aged hippocampus. *Proceedings of the national academy of sciences*, v. 112, n. 36, 2015.
38. Patterson, S. L. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1 β , BDNF and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, v. 96, p. 11–18, 2015.
39. Barrientos, R. M. et al. Intracisternal interleukin-1 receptor antagonist prevents postoperative cognitive decline and neuroinflammatory response in aged rats. *J Neurosci*, v. 32, n. 42, p. 14641–14648, 2012.
40. Mishra, A. et al. Synapse Loss Induced by Interleukin-1 β Requires Pre- and Post-synaptic Mechanisms. *J Neuroimmune Pharmacol*, v. 7, p. 571–578, 2012.
41. Carlos, A.J. et al. IL-1 β impairs retrograde flow of BDNF signaling by attenuating endosome trafficking. *J Neuroinflammation*, v. 14, n. 29, 2017.
42. Tong, L. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor-Dependent Synaptic Plasticity Is Suppressed by Interleukin-1 β via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *The Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 49, p. 17714–17724, 2012.
43. Hayashi, Y. Molecular mechanism of hippocampal long-term potentiation – Towards multiscale understanding of learning and memory, *Neuroscience Research*, v. 175, p. 3-15, 2022.
44. Prieto, G.A. et al. TNF α and IL-1 β but not IL-18 Suppresses Hippocampal Long-Term Potentiation Directly at the Synapse. *Neurochem Res* v. 44, p. 49–60, 2019.
45. Takada, L. T. Imunidade inata e inflamação na patogênese da doença de Alzheimer. *Arq. Neuro. Psiquiatr.*, v. 75, n. 9, p. 607-608, 2017.
46. Wang, W. Y. et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of Translational Medicine*, v. 3, p. 1–17, 2015.

47. Mogi, M., et al. Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, v. 211, n. 1, p. 13–16, 1996.
48. Ortiz-Dominguez, A. et al. Variações imunológicas no transtorno bipolar: diferenças físicas. *Transtorno Bipolar*, n. 9, v. 6, p. 596–602, 2007.
49. Zhang, Y. et al. Cortical grey matter volume reduction in people with schizophrenia is associated with neuro-inflammation. *Translational psychiatry*, v. 6, n. 12, p. e982-e982, 2016.
50. Benedetti, F. et al. Neuroinflammation in Bipolar Depression. *Frontiers in Psychiatry*, v.11, n.71, 2020.
51. Lee, M. Neurotransmitters and microglial-mediated neuroinflammation. *Current Protein and Peptide Science*, v. 14, n. 1, p. 21-32, 2013.
52. Fuente-Sandoval, C. et al. Higher levels of glutamate in the associative-striatum of subjects with prodromal symptoms of schizophrenia and patients with first-episode psychosis. *Neuropsychopharmacology*, v. 36, n. 9, p. 1781-91, 2011.
53. Sarlo, G. L. et al. Brain concentrations of glutamate and GABA in human epilepsy: A review. *Seizure*, v. 91, p. 213-227, 2021.
54. Sallaberry, C. A. et al. The endocannabinoid system, our universal regulator. *Journal of Young Investigators*. v. 34, n. 6, 2018.
55. Fonseca, B.M. et al. Endogenous cannabinoids revisited: a biochemistry perspective. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, v. 102, p. 13-30, 2013.
56. Pacher, P. et al. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease successes and failures. *FEBS J*, v. 280, n. 9, p. 1918-43, 2013.
57. Saito, V. et al. Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão? *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 32, p. 7- 14, 2010.

58. Oddi, S. et al. Endocannabinoid system and adult neurogenesis: a focused review. *Current opinion in pharmacology*, v. 50, p. 25–32, 2020.
59. Di Marzo, V. et al. Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 16, p. 30–42, 2015.
60. Garani, R. et al. Sistema endocanabinoide em transtornos psicóticos e de humor, uma revisão de estudos em humanos. *Progresso em Neuro-Psicofarmacologia e Psiquiatria Biológica*, v. 110096, 2021.
61. Nihra, V. The role of ECS in regulation of neuronal aging, neuroinflammation, neurodegeneration and cognitive decline. *EC Endocrinology and Metabolic Research*, v. 4, n. 6, 261–273, 2019.
62. Lu, H. C., & Mackie, K. Review of the Endocannabinoid System. *Biological psychiatry. Cognitive neuroscience and neuroimaging*, v. 6, n. 6, p. 607–615, 2021.
63. Pertwee, R. G. et al. Cannabinoid receptors and their ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacological Reviews*, v. 62, n. 4, p. 588–631, 2010. 56-
64. Silvestri, C. et al. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metabolism*, v. 17, n. 4, p. 475–490, 2013.
65. Sallaberry, C. A. et al. The endocannabinoid system, our universal regulator. *Journal of Young Investigators*. v. 34, n. 6, 2018.
66. Cramer, S. C. et al. Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain*, v. 134, n. 6, p. 1591-609, 2011.
67. Gómez-Palacio-Schjetnan, A. & Escobar, M. L. Neurotrophins and Synaptic Plasticity. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, v. 15, p. 117–136, 2013.
68. Aso, E. et al. BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. *Journal of Neurochemistry*, v. 105, p. 565-572, 2008.

69. Khaspekov, L. G. et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor- dependent protection against excitotoxicity. *European Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 7, p. 1691–1698, 2004.
70. Fernández-López, D. et al. Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatric research*, v. 60, n. 2, p. 169-173, 2006.
71. Xie, Xiang-Qun; Chen, Jian-Zhong; Billings, Eric M. 3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*, v. 53, n. 2, p. 307-319, 2003.
72. Onaivi, E. S. et al. Methods to study the behavioral effects and expression of CB2 cannabinoid receptor and its gene transcripts in the chronic mild stress model of depression. *Methods in molecular medicine*. V. 123, p. 291-8, 2006.
73. Komorowska-Müller, J. A.; Schmöle, A-C. CB2 receptor in microglia: the guardian of self-control. *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 1, p. 19, 2020.
74. Yang, H. et al. Epidermal growth factor receptor transactivation by the cannabinoid receptor (CB1) and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) induces differential responses in corneal epithelial cells. *Exp Eye*, v. 91, n. 462-471, 2010.
75. Andersen, H. K., & Walsh, K. B. Molecular signaling of synthetic cannabinoids: Comparison of CB1 receptor and TRPV1 channel activation. *European journal of pharmacology*, v. 907, p. 174301, 2021.
76. Ho, K. W. et al. TRPV1: a stress response protein in the central nervous system. *American journal of neurodegenerative disease*, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2012.
77. Marchalant, Y. et al. Cannabinoids attenuate the effects of aging upon neuroinflammation and neurogenesis. *Neurobiology of Disease*, v. 34, n. 2, p. 300–307, 2009.
78. Piyanova, A. et al. Age-related changes in the endocannabinoid system in the mouse hippocampus. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 150, p. 5564, 2015.

79. Ren, S. Y. et al. Potential application of endocannabinoid system agents in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases-focusing on FAAH/MAGL inhibitors. *Acta Pharmacol Sin.*, v. 41, n. 10, p. 1263-1271, 2020.
80. Jiang, H. M. D. et al. A prevenção da amida hidrolase de ácidos graxos melhora comportamentos semelhantes aos depressivos, independentemente de seus efeitos antinociceptivos periféricos em um modelo de dor neuropática em ratos. *Anestesia e Analgesia*, v. 129, n. 2, p 587-597, 2019.
81. Molina-Holgado, F., et al. Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J. Neurosci.* v. 23, p. 6470–6474, 2003.
82. Fields, J. A. et al. The Cannabinoid Receptor Agonist, WIN-55212-2, Suppresses the Activation of Proinflammatory Genes Induced by Interleukin 1 Beta in Human Astrocytes. *Cannabis and cannabinoid research*, v. 7, n. 1, p. 78–92, 2022.
83. Chiara, V. D. et al Interleukin-1 β alters the sensitivity of cannabinoid CB1 receptors controlling glutamate transmission in the striatum. *Neuroscience*, v. 250, p. 232–239, 2013.
84. Rossi, S. et al. Interleukin-1 β causes anxiety by interacting with the endocannabinoid system. *J. Neurosci.* v. 32, p. 13896–13905, 2012.
85. Rossi, S. et al. Interleukin-1 β causes synaptic hyperexcitability in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.*, v. 71, p. 76-83, 2012.
86. Pinheiro, N. R. Toxicidade de agregados do peptídeo beta-amiloide sobre a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Tese (Doutorado em Bioquímica), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.
87. Lopez-Suarez, L. et al. The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants. *NeuroToxicology*, v. 92, n. February, p. 131–155, 2022.

88. Cuende, J. et al. Retinoic acid downregulates Rae1 leading to APC (Cdh1) activation and neuroblastoma SH-SY5Y differentiation. *Oncogene*, v. 27, n. 23, p. 3339–3344, 2008.
89. Encinas, M. et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*, v. 75, n. 3, p. 991–1003, 2000.
90. Lopes, F. M. et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain research*, v. 1337, p. 85–94, 14 jun. 2010.
91. Shipley, M. M.; Mangold, C. A.; Szpara, M. L. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Journal of Visualized Experiments*, n. 108, p. 53193, 2016.
92. Şahin, M. et al. Transformation of SH-SY5Y cell line into neuron-like cells: Investigation of electrophysiological and biomechanical changes. *Neuroscience Letters*, v. 745, 2021.
93. Korecka, J. A. et al. Phenotypic Characterization of Retinoic Acid Differentiated SH-SY5Y Cells by Transcriptional Profiling. *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, 2013.
94. Kovalevich, J.; Langford, D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. In: *Neuronal Cell Culture - Methods and Protocols*. 1. ed. New York: Humana Press, v. 1078 p. 9–21, 2013.
95. Agholme, L. et al. An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 20, n. 4, p. 1069–1082, 2010.
96. Krishtal, J. et al. Toxicity of Amyloid- β Peptides Varies Depending on DifferentiationRoute of SH-SY5Y Cells. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 71, n. 3, p. 879–887, 2019.

97. Pasquariello, N. et al. Characterization of the endocannabinoid system in human neuronal cells and proteomic analysis of anandamide-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, v. 284, n. 43, p. 29413–29426, 2009.
98. Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, v. 21, n. 1, p. A.3B.1-A.3B.2, 1997.
99. Holback, S., et al. Increased processing of APLP2 and APP with concomitant formation of APP intracellular domains in BDNF and retinoic acid-differentiated human neuroblastoma cells. *Journal of neurochemistry*, v. 95, n. 4, p. 1059-1068, 2005.
100. Viviani, B. et al. Interleukin-1 Enhances NMDA Receptor-Mediated Intracellular Calcium Increase through Activation of the Src Family of Kinases. *Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 25, p. 8692-8700, 2003.
101. Friedman, W. J. Cytokines Regulate Expression of the Type 1 Interleukin-1 Receptor in Rat Hippocampal Neurons and Glia. *Exp Neurol*, v. 168, n. 1, p.23-31, 2001.
102. Dhar, A. et al. Novel role of TGF-beta in differential astrocyte-TIMP-1 regulation: implications for HIV-1-dementia and neuroinflammation. *J Neurosci Res*. v. 83, n. 57, p. 1271–1280. 57, 2006.
103. Gardner J, Borgmann K, Deshpande MS, et al. Potential mechanisms for astrocyte-TIMP-1 downregulation in chronic inflammatory diseases. *J Neurosci Res*. v. 83, p. 1281–1292, 2006.
104. Yeong, J. O.; Jungil, H. Application of the MTT-based colorimetric method for evaluating bacterial growth using different solvent systems. *LWT*, v. 153, p. 112565, 2022.
105. Grella, E. et al. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochemica* v. n.120, p. 303–311, 2018.
106. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, p. 248–54, 1976.

107. Vila-Verde, C. Efeitos do canabidiol e do 7-Nitroindazole na resposta de medo condicionado contextual após exposição de ratos a um estresse intenso: envolvimento dos sistemas nitrérgico, serotoninérgico e canabinoide. Tese (Doutorado em Farmacologia), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.
108. Ebtesam, M. Effect of Interleukin-1Beta (IL-1 β) on the Cortical Neurons Survival and Neurites Outgrowth. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v. 7, p. 28-37, 2016.
109. Popko, J. et al. Automated analysis of NeuronJ tracing data Cytom. Part A 75^a, p, 371-376, 2009.
110. Nakagomi, S. et al. A Golgi fragmentation pathway in neurodegeneration. *Neurobiology of disease*, v. 29, n. 2, p. 221-231, 2008.
111. Radagdam, S. et al. Evaluation of dihydrotestosterone and dihydroprogesterone levels and gene expression of genes involved in neurosteroidogenesis in the SH-SY5Y Alzheimer disease cell model. *Frontiers in Neuroscience*, v. 17, p. 1163806, 2023.
112. Wiatrak, B. et al. Effect of amyloid- β on the redox system activity in SH-SY5Y cells preincubated with lipopolysaccharide or co-cultured with microglia cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 149, p. 112880, 2022.
113. Paoletti, P. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *European Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 8, p. 1351-1365, 2011.
114. Diniz, J. P. et al. Ação dos neurotransmissores envolvidos na depressão. *Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde*, v. 24, n. 4, p. 437-443, 2020.
115. Silva, A. F. S. et al. Influência da dopamina e seus receptores na geração da obesidade: revisão sistemática. *Revista Neurociências*, v. 22, n. 3, p. 373-380, 2014.
116. Lopes, F. M. et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain research*, v. 1337, p. 85–94, 2010.

117. Balasubramanian, P. S. O Alargamento do Núcleo se Correlaciona com o Alargamento Celular Induzido por Neuritas Durante a Diferenciação das Células Neurais Sh-Sy5Y. *Revista Internacional de Morfologia*, v. 2, p. 548-553, 2021.
118. Huang, E. J.; Reichardt, L. F. Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, v. 72, p. 609–642, 2003.
119. S.V. Ovsepian, V.B. O’Leary, L. Zaborszky. Cholinergic mechanisms in the cerebral cortex: beyond synaptic transmission, *Neuroscientist*, v. 22, n. 3, p. 238–251, 2016.
120. Goldie, B. J., Barnett, M. M., & Cairns, M. J. BDNF and the maturation of posttranscriptional regulatory networks in human SH-SY5Y neuroblast differentiation. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 8, n. 325, 2014.
121. Hromadkova, Lenka. et al. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) promove a polarização molecular e a diferenciação de células imaturas de neuroblastoma em neurônios definitivos. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 9, pág. 118737, 2020.
122. Latremoliere, Alban. et al. Neuronal-specific TUBB3 is not required for normal neuronal function but is essential for timely axon regeneration. *Cell reports*, v. 24, n. 7, p. 1865-1879, 2018.
123. Forster, J. I. et al. Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability. *Journal of biomolecular screening*, v. 21, n. 5, p. 496–509, 2016.
124. Saisawang, C. et al. Characterization of endotoxin free protein production of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) for the study of Parkinson model in SH-SY5Y differentiated cells. *Protein Expr Purif.*, v. 203, n. 106212, 2023.
125. Nessa, B. N. et al. Toll-like receptor 3 mediated hyperphosphorylation of tau in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 60, p. 527–533, 2006.

126. Yang L. et al. Neuroprotection by dihydrotestosterone in LPS-induced neuroinflammation. *Neurobiol Dis.* v. 140, n. 104814, 2020.
127. Martins L. F. M. et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Research*, v. 1337, p. 85-94, 2010.
128. Tekin, I., Roskoski, R., Carkaci-Salli, N. *et al.* Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase. *J Neural Transm*, v. 121, p. 1451–1481, 2014.
129. Khwanraj, K. et al. Expressão diferencial da proteína tirosina hidroxilase e genes relacionados à apoptose em células de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciadas e indiferenciadas tratadas com MPP+. *Pesquisa internacional em neurologia*, v. 734703, 2015.
130. Niaz, Aram, et al. Diferenciação dopaminérgica robusta e resposta neuroinflamatória aumentada induzida por LPS em células SH-SY5Y humanas privadas de soro: implicação para a doença de Parkinson. *Jornal de Neurociência Molecular*, v. 71, n. 3, p. 565-582, 2021.
131. Ducray, A. D. et al. Caracterização quantitativa de marcadores fenotípicos após diferenciação de células SH-SY5Y. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Anteriormente Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, v. 8, p. 618-629, 2020.
132. Paoletti, C. P. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews. Neuroscience.* v. 14, n. 6, p. 383–400, 2013.
133. Ménard, C. et al. Os níveis do transportador vesicular pré-sináptico de glutamato e dos receptores pós-sinápticos correlacionam-se com o status da memória espacial em modelos de ratos idosos. *Neurobiologia do Envelhecimento*, v. 36, n. 3, p. 1471–1482, 2015.
134. Gusel'nikova, V. V; Korzhevskiy, D. E. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta naturae*, v. 7, n. 2, p. 42–7, 2015.

135. Simões, R. F. et al. Refinamento de um protocolo de diferenciação utilizando células de neuroblastoma SH-SY5Y para uso em pesquisas em neurotoxicologia. *Toxicologia Alimentar e Química*, v. 149, p. 111967, 2021.
136. Han, X. et al. Validação de um ensaio de LDH para avaliação da toxicidade de nanopartículas. *Toxicologia*, v. 287, n. 1-3, p. 99-104, 2011.
137. Bénard, G. et al. Mitochondrial CB1 receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nature neuroscience*, v. 15, n. 4, p. 558-564, 2012.
138. Kwon, S.E. Chapman, E. R. A sinaptofisina regula a cinética da endocitose das vesículas sinápticas nos neurônios centrais. *Neurônio*, v. 70, p. 847–854. 2011.
139. Tagliaferro, P. et al. Neuronal cytoskeleton and synaptic densities are altered after a chronic treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *Brain Research*, v. 1085, n. 1, p. 163–176, 2006.
140. Irving, A. et al. Expressão funcional de receptores canabinóides CB1 de superfície celular em terminais inibitórios pré-sinápticos em neurônios de hipocampo de ratos cultivados. *Neurociência*, v. 98, n. 2, p. 253–262, 2000.
141. Ruiz-Leon, Y.; Pascual, A. Induction of tyrosine kinase receptor b by retinoic acid allows brain-derived neurotrophic factor-induced amyloid precursor protein gene expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuroscience*, v. 120, n. 4, p. 1019-1026, 2003.
142. Pahng, Amanda R.; Colombo, Paul J. Phosphorylation of tyrosine receptor kinase B in the dorsal striatum and dorsal hippocampus is associated with response learning in a water plus maze. *Behavioral Neuroscience*, v. 131, n. 1, p. 33, 2017.
143. Braun, H., S. et al. β III Tubulin-Expressing Neurons Reveal Enhanced Neurogenesis in Hippocampal and Cortical Structures after a Contusion Trauma in Rats. *Journal of Neurotrauma*, v. 19, n. 8, p. 975–983, 2002.
144. Tong, L. *et al.* Brain-Derived Neurotrophic Factor-Dependent Synaptic Plasticity Is Suppressed by Interleukin-1 β via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *The Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 49, p. 17714–17724, 2012.

145. Zoppi, S. et al. Papel regulador do receptor canabinóide 1 na excitotoxicidade e neuroinflamação induzida por estresse. *Neuropsicofarmacologia*, v. 36, n. 4, pág. 805-818, 2011.
146. Blázquez, C., Chiarlone, A., Bellocchio, L. *et al.* O receptor canabinóide CB₁ sinaliza a neuroproteção do estriado através de uma via PI3K/Akt/mTORC1/BDNF. *Different cell death*, v. 22, p. 1618–1629, 2015.
128. Maison, P. et al. BDNF regulates neuronal sensitivity to endocannabinoids. *Neuroscience letters*, v. 467, n. 2, p. 90-94, 2009.
147. Zhang, Y., Hou, B., Liang, P. et al. O canal TRPV1 medeia a neuroinflamação dependente do inflamassoma NLRP3 na microglia. *Morte Celular Dis*, v. 12, n. 1159 2021.
148. Leterrier, C. et al. Constitutive endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor. *The Journal of biological chemistry*, v. 279, n. 34, p. 36013–36021, 2004.
149. Sagredo, O. Efectos farmacológicos y fisiológicos del consumo de cannabis. *Trastornos adictivos*, v. 13, n. 3, p. 94-96, 2011.
150. Araújo, M. et al. Mecanismo de ação dos canabinoides: visão geral. *BrJP*, v. 6, n.2 p. 9-13, 2023.
151. Zhang, Y., Hou, B., Liang, P. et al. O canal TRPV1 medeia a neuroinflamação dependente do inflamassoma NLRP3 na microglia. *Morte Celular Dis*, v. 12, n. 1159 2021.
152. Shirakawa, H. *et al.* TRPV1 stimulation triggers apoptotic cell death of rat cortical neurons. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 377, n. 4, p. 1211-1215, 2008.
153. Song, J. et al. TRPV1 Activation in Primary Cortical Neurons Induces Calcium-Dependent Programmed Cell Death. *Experimental neurobiology*, v. 22, n. 1, p. 51–57, 2013.
154. Maison, Patrick et al. BDNF regulates neuronal sensitivity to endocannabinoids. *Neuroscience letters*, v. 467, n. 2, p. 90-94, 2009.

155. Henry, R. J. et al. Pharmacological inhibition of FAAH modulates TLR-induced neuroinflammation, but not sickness behaviour: an effect partially mediated by central TRPV1. *Brain, behavior, and immunity*, v. 62, p. 318-331, 2017.

156. Chui-Se, T. et al. Inhibition of microglial fatty acid amide hydrolase modulates LPS stimulated release of inflammatory mediators. *FEBS Letters*. V. 581, n. 16, p. 2899-2904, 2007.

157. Tejada-Martínez, A. R. Inibição Crônica de FAAH Reduz Comportamento Depressivo e Melhora Dentado Proliferação do Giro após Exposição Crônica ao Estresse Imprevisível. *Neurologia Comportamental*, v. 2021, n. 6651492, 2021.