

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

JADER NONES

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE UM AGONISTA CANNABINÓIDE
EM CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS**

Rio de Janeiro
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

JADER NONES

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE UM AGONISTA CANNABINÓIDE
EM CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfológicas. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurogênese e Diferenciação Celular (LANDIC) do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ sob orientação do Professor Stevens Kastrup Rehen e em colaboração com a Professora Marília Zaluar Passos Guimarães, e contou com os auxílios concedidos pelo CNPq, Pew Latin American Program in Biomedical Sciences, TWAS e Ministério da Saúde.

Rio de Janeiro
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

NONES, Jader

Avaliação da ação de um agonista canabinóide em células-tronco embrionárias

Rio de Janeiro, 2008.

XVIII, 82 páginas.

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Ciências Biomédicas.

Orientador: Stevens Kastrup Rehen

1) Células-tronco embrionárias; 2) Receptor CB1; 3) Receptor CB2; 4) Agonistas canabinóides; 5) Proteção contra a morte celular

Jader Nones

“Avaliação da ação de um agonista canabinóide em células-tronco embrionárias”

Dissertação de mestrado

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, 18 de fevereiro de 2008

Aprovado por:

Professor _____
Stevens Kastrup Rehen

Professora _____
Silvana Allodi

Professor _____
José Garcia Ribeiro Abreu Júnior

Professora _____
Jennifer Lowe

Revisora e suplente externa: Flávia Regina Souza Lima
Pesquisadora do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ

Suplente Interna: Helena Lobo Borges
Professora Adjunta do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ

Orientador: Stevens Kastrup Rehen
Professor Adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfológicas. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurogênese e Diferenciação Celular (LANDIC), do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ, sob orientação do Professor Stevens Kastrup Rehen e em colaboração com a Professora Marília Zaluar Passos Guimarães, e contou com os auxílios concedidos pelo CNPq, Pew Latin American Program in Biomedical Sciences, TWAS e Ministério da Saúde.

VAI...

Para sonhar o que poucos ousaram sonhar.
Para realizar aquilo que já te disseram que não podia ser feito.
Para alcançar a estrela inalcançável.

Essa será a tua tarefa: alcançar essa estrela.
Sem quereses saber quão longe ela se encontra;
nem de quanta esperança necessitarás;
nem se poderás ser maior do que o teu medo.
Apenas nisso vale a pena gastares a tua vida.

Para carregar sobre os ombros o peso do mundo.
Para lutar pelo bem sem descanso e sem cansaço.
Para enxugar todas as lágrimas ou para lhes dar um sentido luminoso.
Levarás a tua juventude a lugares onde se pode morrer, porque precisam lá de ti.
Pisarás terrenos que muitos valentes não se atreveriam a pisar.
Partirás para longe, talvez sem saíres do mesmo lugar.

Para amar com pureza e castidade.
Para devolver à palavra "amigo" o seu sabor a vento e rocha.
Para ter muitos filhos nascidos também do teu corpo e - ou - muitos mais nascidos apenas do teu coração.
Para dar de novo todo o valor às palavras dos homens.
Para descobrir os caminhos que há no ventre da noite.
Para vencer o medo.

Não medirás as tuas forças.
O anjo do bem te levará consigo, sem permitir que os teus pés se magoem nas pedras.
Ele, que vigia o sono das crianças e coloca nos seus olhos uma luz pura que apetece beijar, é também guerreiro forte.
Verás a tua mão tocar rochedos grandes e fazer brotar deles água verdadeira.
Olharás para tudo com espanto.
Saberás que, sendo tu nada, és capaz de uma flor no esterco e de um archote no escuro.

Para sofrer aquilo que não sabias ser capaz de sofrer.
Para viver daquilo que mata.
Para saber as cores que existem por dentro do silêncio.
Continuarás quando os teus braços estiverem fatigados.
Olharás para as tuas cicatrizes sem tristeza.
Tu saberás que um homem pode seguir em frente apesar de tudo o que dói, e que só assim é homem.

Para gritar, mesmo calado, os verdadeiros nomes de tudo.
Para tratar como lixo as bugigangas que outros acariciam.
Para mostrar que se pode viver de luar quando se vai por um caminho que é principalmente de cor e espuma.
Levantarás do chão cada pedra das ruínas em que transformaram tudo isto.
Uma força que não é tua nos teus braços.
Beijá-las-ás e voltarás a pô-las nos seus lugares.

Para ir mais além.
Para passar cantando perto daqueles que viveram poucos anos e já envelheceram.
Para puxar por um braço, com carinho, esses que passam a tarde sentados em frente de uma cerveja.
Dirás até ao último momento: "ainda não é suficiente".
Disposto a ir às portas do abismo salvar uma flor que resvalava.
Disposto a dar tudo pelo que parece ser nada.
Disposto a ter contigo dores que são semente de alegrias talvez longe.

Para tocar o intocável.
Para haver em ti um sorriso que a morte não te possa arrancar.
Para encontrar a luz de cuja existência sempre suspeitaste.
Para alcançar a estrela inalcançável.

Paulo Geraldo

Aos meus pais, Venâncio e Marlene

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Venâncio e Marlene, que sempre se esforçaram ao máximo para que eu conseguisse alcançar meus objetivos, me dando total apoio durante todos os momentos de minha vida.

Às minhas irmãs Juliane e Janaína, por vocês sempre terem sido, além de irmãs, grandes amigas. Também por nunca terem me deixado sozinho nos momentos em que precisei de ajuda. Adoro vocês!

A alguém muito especial (Rafa), por ter me proporcionado intensos e marcantes momentos em minha vida.

Ao meu orientador, Professor Stevens Kastrup Rehen, por seus ensinamentos, pela sua paciência e amizade;

A Professora Marília Zaluar Passos Guimarães, pela grande contribuição no projeto desenvolvido.

Ao Professor Vivaldo Moura Neto, pelas grandes oportunidades de estágio e por sempre ter acreditado em mim.

A toda galera do Laboratório de Neurogênese e Diferenciação Celular: Aline, Bruna, Daniel, Fábio, Priscila, Rafaela e Tania.

A toda galera que frequenta ou frequentou o Laboratório de Neurogênese e Diferenciação Celular: Andressa, Débora, Juliana, Paulo, Saionara e, em especial, à Keu.

Ao Brian, pela ajuda com os ensaios de avaliação da proliferação celular.

Ao super técnico de laboratório, Ismael Gomes, pela sua dedicação e preocupação em desempenhar sua função da melhor forma possível.

Ao Severino, auxiliar técnico do laboratório, por ser tão determinado e estar sempre disposto a trabalhar.

A todos os professores, funcionários, colegas e amigos do Departamento de Anatomia (UFRJ).

Aos animais utilizados nos experimentos, por terem contribuído com a própria vida em prol de um bem maior.

Enfim, a todos aqueles que, em algum momento, contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Obrigado a todos! Eu não teria conseguido sozinho.

RESUMO

NONES, Jader. **Avaliação da ação de um agonista canabinóide em células-tronco embrionárias.** Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Canabinóides são substâncias presentes na planta *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha. Estas substâncias agem em receptores canabinóides do subtipo 1 (CB1) e 2 (CB2). Apesar dos canabinóides endógenos, conhecidos como endocanabinóides, estarem presentes desde estágios iniciais do desenvolvimento, os efeitos de sua ativação são desconhecidos em células-tronco embrionárias. O objetivo deste trabalho foi identificar a expressão de receptores canabinóides e avaliar os efeitos de um agonista canabinóide (WIN 55212-2) sobre essas células. Para tal, células-tronco embrionárias de camundongo (mES) foram cultivadas e, em seguida, transferidas para placas não aderentes até ocorrer a formação de estruturas esféricas denominadas corpos embrióides (EBs). Após tal procedimento, parte dos EBs foi pré-tratado com um indutor de diferenciação neuronal conhecido como ácido retinóico (AR) e outra parte não sofreu essa indução. Ambas as condições foram tratadas com WIN 55212-2, seguida das avaliações de morte celular, análise da proliferação e cariotipagem. Nossos resultados indicaram que os receptores CB1 e CB2 estão presentes em EBs e que o tratamento com WIN 55212-2 reduziu significativamente a morte celular durante o processo de diferenciação. Esse efeito foi totalmente revertido com a adição de um antagonista específico de CB1 em EBs pré-tratados com AR e parcialmente revertido em EBs que não sofreram essa indução. O tratamento com WIN-55212-2 não apresentou aumento de proliferação ou da instabilidade cromossômica, porém, apresentou aumento da migração celular. Nossos dados sugerem que endocanabinóides podem estar envolvidos em mecanismos associados no controle da sobrevivência de células-tronco embrionárias.

ABSTRACT

NONES, Jader. Evaluation of the effects of a cannabinoid receptor agonist in embryonic stem cells. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Cannabinoids are substances present in *Cannabis sativa*, popularly known as marijuana. These substances activate cannabinoid receptor subtypes 1 (CB1) and 2 (CB2). Despite endocannabinoids are present since initial stages of development, the effects of cannabinoid receptors activation are unknown in embryonic stem cells. The aim of this study was to characterize the expression of cannabinoid receptors and to investigate the effects of its agonist WIN 55212-2 in mouse embryonic stem cells (mES). mES were cultured in the presence of mouse embryonic fibroblasts (MEF) and after the formation of colonies, cells were transferred to non-adherent plates for the formation of spherical structures called embryoid bodies (EB). General differentiation is observed during the formation of EBs while preferential neural differentiation can be obtained after retinoic acid (AR) treatment. In both conditions, WIN 55212-2 was added, followed by evaluation of cell death, proliferation and karyotyping in EB. The results indicate that CB1 and CB2 receptors are expressed in EBs and that WIN 55212-2 decreases significantly cell death during differentiation. The survival effects observed after WIN 55212-2 treatment were blocked with the specific CB1 antagonist AM251 in EB pre-treated with AR while it only partially reversed WIN 55212-2 effects in EB undergoing general differentiation. Pre-treatment with WIN 55212-2 does not alter proliferation or chromosomal stability but facilitates cell migration in plated EBs. These data suggest that CB1 and CB2 participate in mechanisms that control cell death in embryonic stem cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG - 2-glicerol araquidonil

AEA - Anandamida

AVC - Acidente vascular cerebral

CB1 - Receptor canabinóide do subtipo 1

CB2 - Receptor canabinóide do subtipo 2

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DNA - (*Deoxiribonucleic acid*) Ácido desoxirribonucléico

cDNA - DNA complementar

DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-lindol, corante de cromatina

DMEN-F12 - (*Dulbecco's modified eagle medium*) Meio de cultura suplementado com nutriente F12

EBs - (*Embryoid bodies*) Corpos embrióides

FGF - (*Fibroblast growth factor*) Fator de crescimento fibroblástico

Fosfo-H3 - Histona fosforilada

PI3K - Fosfatidilinositol-3-cinase

KSR - (*Knockout serum replacement*) Soro Knockout

LIF - (*Leukemia inhibitory factor*) Fator inibidor de leucemia

MCI - Massa celular interna

MEF - (*Murine embryonic fibroblasts*) Fibroblastos embrionários de camundongo

mES - (*Murine embryonic stem cells*) Células-tronco embrionárias de camundongo

PBS - (*Phosphate buffer saline*) Solução salina tamponada com fosfato

AR - Ácido retinóico

SFB - Soro fetal bovino

SNC - Sistema nervoso central

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RNA - (*Ribonucleic acid*) ácido ribonucléico

RT-PCR - (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) Reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa,

THC - Δ^9 -tetrahydrocannabinol

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

WIN - WIN 55212-2

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1: Células-tronco embrionárias.....	20
Figura 2: Esquema com histórico das células-tronco embrionárias.....	20
Figura 3: Caracterização da pluripotencialidade das mES.....	46
Figura 4: Expressão de receptores canabinóides.....	47
Figura 5: Agonista canabinóide reverte o efeito de diminuição do tamanho dos EBs.....	49
Figura 6: Canabinóide protege contra a morte celular EBs que sofreram indução específica de diferenciação.....	51
Figura 7: O agonista canabinóide WIN 55212-2 não aumenta a proliferação de EBs que sofreram indução específica de diferenciação.....	53
Figura 8: Ativação de receptores canabinóides protege contra a morte celular EBs que não sofreram indução específica de diferenciação.....	55
Figura 9: O agonista canabinóide WIN 55212-2 não aumenta a proliferação de EBs que não sofreram indução específica de diferenciação.....	57
Figura 10: O receptor CB1 está relacionado com o efeito de proteção celular.....	59
Figura 11: Estabilidade cromossômica.....	61
Figura 12: O agonista canabinóide WIN 55212-2 aumenta a migração celular.....	63
Tabela 1: Avaliação da ação do agonista canabinóide WIN-55212-2 em células-tronco embrionárias murinas.....	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Células-tronco embrionárias.....	18
1.1.1 Diferenciação de mES com ácido retinóico.....	21
1.1.2 Aneuploidia.....	22
1.1.3 Transplante de mES.....	24
1.4 Canabinóides.....	24
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. MATERIL E MÉTODOS.....	29
3.1 Animais e células-tronco embrionárias.....	29
3.2 Cultivo celular.....	30
3.2.1 Cultura de MEF.....	30
3.2.1.1 Modo de preparo da cultura.....	30
3.2.1.2 Congelamento e Descongelamento.....	31
3.2.1.3 Passagem.....	32
3.2.2 Cultura de mES.....	32

3.2.2.1	Plaqueamento.....	32
3.2.2.2	Passagem.....	33
3.2.2.3	Congelamento e descongelamento das mES	34
3.2.3)	Produção de meio condicionado contendo LIF.....	34
3.2.4	Cultivo e tratamento de EBs.....	35
3.2.5	Ensaio de migração.....	36
3.3	Extração de ácido ribonucléico (RNA).....	37
3.4	Síntese de DNA complementar (cDNA).....	37
3.5	Técnica de Reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa (RT-PCR).....	38
3.6	Análise do tamanho dos EBs.....	40
3.7	Deteção de morte celular em EBs.....	40
3.8	Análises por imunocitoquímica.....	41
3.9	Incorporação de timidina.....	42
3.10	Cariotipagem.....	42
3.11	Análise estatística.....	43
4	RESULTADOS.....	45
4.1	Caracterização da pluripotencialidade das mES.....	45
4.2	Expressão de receptores canabinóides.....	46
4.3	Agonista canabinóide e tamanho dos EBs.....	48
4.4	Canabinóides reduz a morte celular de EBs que sofreram indução de diferenciação neuronal.....	50
4.5	O agonista canabinóide WIN 55212-2 não aumenta a proliferação de EBs que sofreram indução de diferenciação neuronal.....	52

4.6 Ativação de receptores canabinóides também reduz a morte celular de EBs que não sofreram indução específica de diferenciação.....	54
4.7 O agonista canabinóide WIN 55212-2 não aumenta a proliferação celular de EBs que não sofreram indução específica de diferenciação.....	56
4.8 A ativação do receptor CB1 está relacionado com o efeito de proteção celular.....	58
4.9 Ativação dos receptores canabinóides e estabilidade cromossômica.....	60
4.10 O agonista canabinóide WIN 55212-2 aumenta a migração celular.....	62
4.11 Resumo dos resultados.....	64
5 DISCUSSÃO.....	65
7 CONCLUSÕES.....	70
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células-tronco embrionárias

Células-tronco são células que possuem a capacidade de se auto-renovar e de produzir mais de um tipo de descendente diferenciado (WATT, 2000). Essas células podem ser classificadas como totipotentes, pluripotentes ou multipotentes.

Quando acontece a junção do espermatozóide com o ovócito, forma-se uma célula denominada zigoto. O zigoto é o único representante de uma célula totipotente. Esta célula, se implantada no útero, é capaz de gerar um novo indivíduo.

Células pluripotentes são células que têm a capacidade de originar todos os tecidos do organismo adulto, no entanto, são incapazes de originar anexos embrionários e, por esse motivo, não geram um novo indivíduo pleno. São exemplos de células pluripotentes as células-tronco embrionárias e células pluripotentes derivadas de carcinoma embrionário. Recentemente, células derivadas da pele reprogramadas geneticamente também apresentaram características pluripotentes semelhantes às embrionárias (TAKAHASHI, 2007; YU, 2007). Células-tronco embrionárias são geralmente derivadas da massa celular interna (MCI) de um blastocisto em estágios iniciais de formação.

Quando cultivadas em suspensão, as células-tronco embrionárias formam estruturas esféricas denominadas de corpos embrióides (EBs), os quais, semelhante ao início do

desenvolvimento, originam células dos três folhetos embrionários: ectoderme, mesoderme e endoderme (ZHOU, 2005).

Por fim, há células-tronco que são multipotentes. Estas células dão origem a um número limitado de tecidos (GAGE, 2000). Elas são geralmente obtidas do organismo adulto ou de tecidos fetais e se localizam em tecidos já diferenciados como a medula óssea, sistema nervoso, pele, entre outros.

O interesse nas células-tronco embrionárias tem como marco o ano de 1970 quando foram caracterizadas primeiras células pluripotentes, denominadas células de carcinoma embrionário, obtidas a partir de teratocarcinomas formados pelo implante de embriões em testículo de camundongo adulto (SOLTER, 1970; STEVENS, 1970).

Estas células puderam ser expandidas continuamente quando em co-cultura com fibroblastos embrionários de camundongo (MEF) inativados, resultando em uma linhagem capaz de se diferenciar. Com o avanço das pesquisas, em 1981 foram isoladas as primeiras células-tronco embrionárias de camundongo (mES) (EVANS, 1981), obtidas a partir da MCI de blastocistos pré-implantação (Figura 1).

Vários estudos foram realizados a fim de se entender os mecanismos capazes de permitir a manutenção das células-tronco indiferenciadas e em constante auto-renovação. A primeira substância descoberta e que atualmente é o principal fator utilizado para manter as mES indiferenciadas foi o fator inibidor de leucemia (LIF), no final dos anos 80 (SMITH, 1987).

Em 1995 foram derivadas as primeiras células-tronco embrionárias de primatas e só em 1998 as primeiras células vindas de um blastocisto humano foram obtidas (THOMSON, 1998) (Figura 2).

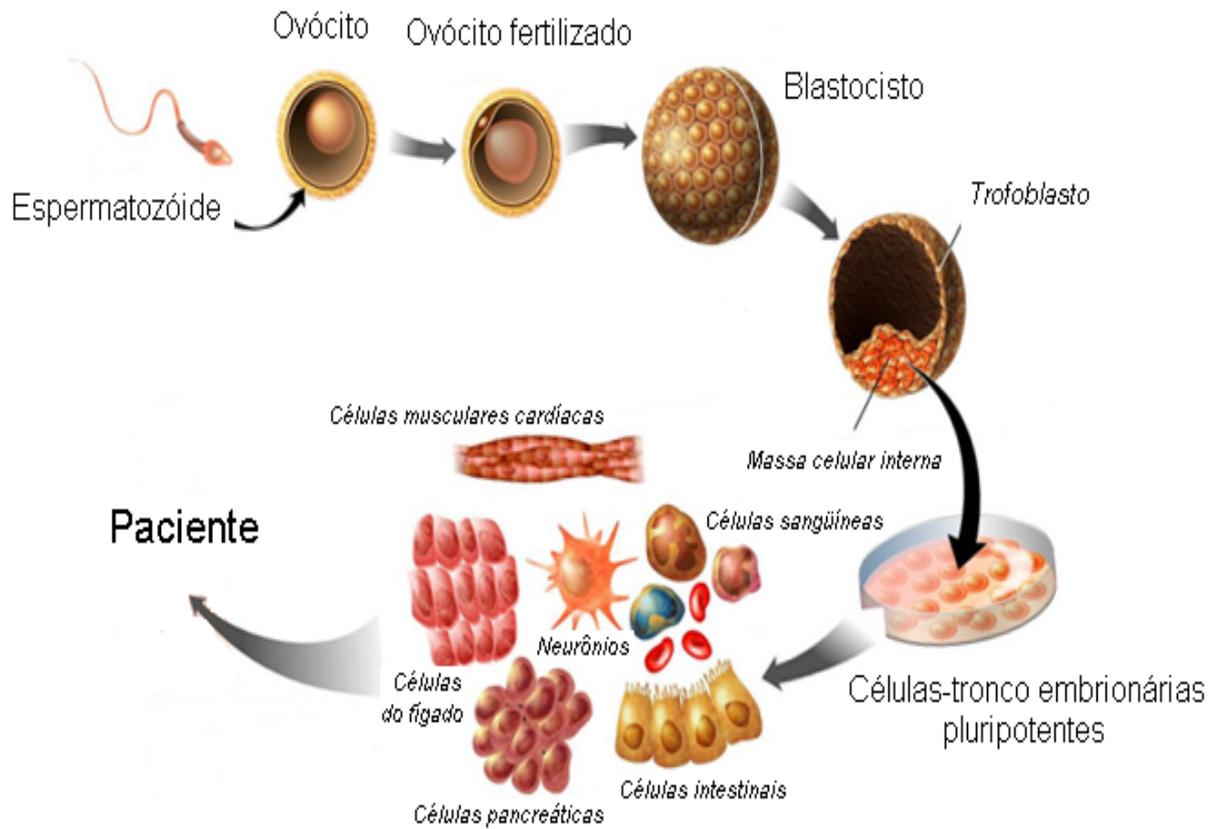


Figura 1: Células-tronco embrionárias. Demonstração da obtenção de células-tronco embrionárias a partir da massa celular interna (MCI) de blastocisto *in vitro*.

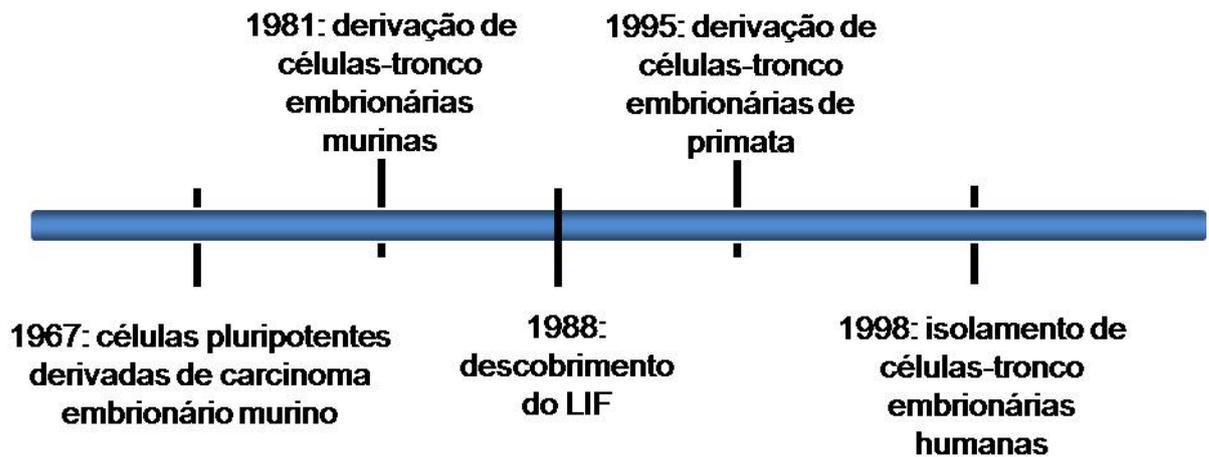


Figura 2: Esquema com histórico das células-tronco embrionárias (Adaptado de FRIEL, 2005).

Células-tronco embrionárias, conforme já destacado anteriormente, possuem capacidade de se diferenciar em todos os tipos de tecidos presentes no organismo. Essa capacidade de diferenciação cria sobre as mesmas grandes perspectivas quanto ao seu uso clínico, uma vez que poderão tornar possível o tratamento de doenças consideradas incuráveis até o momento, como doença de Parkinson, acidentes vasculares cerebrais, lesões medulares, entre outras (EVANS, 1981; COUTTS, 2007; GOYA, 2007; JOANNIDES, 2007).

Além da finalidade terapêutica, as células-tronco embrionárias têm grande importância em pesquisa básica (LILLEY, 2005) e constituem ferramentas para o estudo da biologia do desenvolvimento celular, identificação de fatores envolvidos na regulação dos processos do desenvolvimento e diferenciação em tipos celulares específicos ou tecidos, assim como para testar a eficácia de novas drogas *in vitro* (POUTON, 2005; AHUJA, 2007; THOMSON, 2007).

No entanto, para se alcançar o sucesso nessas aplicações, muitos problemas com relação aos protocolos de diferenciação, a manutenção da estabilidade cromossômica e ao transplante destas células em pacientes terão que ser superados.

1.1.1 Diferenciação de mES com ácido retinóico (AR)

O AR é um derivado da vitamina A que desempenha papéis essenciais em funções biológicas como visão, reprodução, crescimento, diferenciação do tecido epitelial e respostas imunológicas (SOPRANO, 2007). Funciona como regulador do desenvolvimento embrionário e adulto, atuando na proliferação e diferenciação celular. É crucial, por exemplo, para a manutenção do estado diferenciado de células epiteliais e para a diferenciação hematopoiética (OREN, 2003).

Esta substância funciona mediante a ligação com fatores de transcrição nucleares pertencentes à superfamília de receptores do hormônio da tireóide. Através de sua ligação com esses fatores de transcrição, o AR pode regular a expressão de genes envolvidos em diversos mecanismos celulares, inclusive diferenciação (MARK, 2006).

No desenvolvimento do SNC, o AR participa da neurogênese embrionária e adulta. No embrião, contribui para a padronização dorsoventral e anteroposterior da placa neuronal e tubo neural, auxiliando na determinação de grupos de neurônios sensoriais, interneurônios e neurônios motores (MADEN, 2007). Na fase adulta, o AR também se encontra envolvido na diferenciação neuronal no giro denteado (JACOBS, 2006) na manutenção do estado diferenciado de neurônios motores e na regeneração de nervos (MADEN, 2007).

In vitro, o AR pode induzir diferenciação em diversos tipos celulares, como fibroblastos, neurônios, células da glia, miócitos, osteoblastos e condrócitos, dependendo da linhagem celular utilizada como modelo, do tempo de exposição e da ação conjunta com outros agentes indutores (SOPRANO, 2007).

A aplicação do AR também é utilizada *in vitro* para a diferenciação neuronal de mES. Essa substância, no entanto, quando utilizada sobre essas células causa elevada mortalidade celular (OKAZAWA, 1996). Portanto, o surgimento de novos fatores, capazes de simultaneamente permitir a diferenciação celular e evitar a morte causada pelo AR são um dos objetivos fundamentais para ocorrerem avanços nas pesquisas relacionadas a mES .

1.1.2 Aneuploidia

A aneuploidia é definida como a perda (hipoploidia) e/ou ganho (hiperplóidia) de cromossomos produzindo múltiplas variações numéricas do complemento cromossomal haplóide (KINGSBURY, 2005).

A aneuploidia é detectada em virtualmente todos os cânceres, sendo considerada uma causa plausível para a transformação celular (RASNICK, 1999), além de ser a principal causa genética de abortos espontâneos (VORSANOVA, 2005). Nos cânceres, ocorre principalmente ganho de cromossomos, chamado de hiperploídia.

No SNC ela é associada a condições neuropatológicas como a Síndrome de Down, caracterizada pela trissomia do cromossomo 21 (ANTONARAKIS, 2004; ROUBERTOUX, 2006); e síndrome de Turner, caracterizada pela falta de um cromossomo X (ELSHEIKH, 2002).

Por outro lado a aneuploidia também pode ser observada em situações normais, mais especificamente, no cérebro de camundongos e humanos durante o desenvolvimento e idade adulta. Nestes casos, entretanto, é caracterizada pela perda de cromossomos (hipoploidia) e ausência de translocações (REHEN, 2001; KINGSBURY, 2005; REHEN, 2005).

No caso das células-tronco embrionárias a aneuploidia pode alterar as propriedades fisiológicas destas células (PERA, 2004). A hiperploídia e translocações estão associadas, por exemplo, a condições que inviabilizam uma eventual aplicação terapêutica (DRAPER, 2004), pois podem gerar formação de tumores (LENGAUER, 1997; LENGAUER, 1998; RAJAGOPALAN, 2004) perda de pluripotencialidade (LONGO, 1997) e possível predisposição ao Mal de Alzheimer (GELLER, 1999; REHEN, 2005). Por isso, novas metodologias de cultivo celular, capazes de controlar ou de evitar o aumento exagerado de instabilidade cromossômica poderão contribuir enormemente para a utilização adequada dessas células.

1.1.3 Transplante de mES

Para o estabelecimento de terapias celulares envolvendo o uso de células-tronco embrionárias será preciso, além de protocolos mais eficazes de diferenciação e de controle de aneuploidia, métodos adequados de purificação de células, evitando, deste modo, o implante de células indesejadas e/ou indiferenciadas (CHRISTOU, 2007). Também será preciso fazer com que as células implantadas tenham a capacidade de se integrar e contribuir para a melhora do tecido lesado. Por isso, torna-se indispensável à busca por metodologias capazes de, não só aumentar o número de células cultivadas, como também aumentar a sobrevivência das mesmas, tanto durante o cultivo celular, quanto após o implante (*in vivo*).

Baseado na necessidade de encontrar novas substâncias capazes de contribuir positivamente para o cultivo das células-tronco embrionárias procuramos investigar a ação de compostos canabinóides sobre estas células, já que, como veremos a seguir, essas substâncias apresentam enorme importância sobre a proliferação e morte celular em outros sistemas.

1.3 Canabinóides

Canabinóides são substâncias presentes na planta *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha.

O mais abundante canabinóide presente na maconha é o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC). No entanto, cerca de 70 substâncias químicas semelhantes ao THC já foram encontradas nessa planta.

Pesquisas sobre o THC levaram ao descobrimento do primeiro receptor canabinóide identificado no cérebro, o qual foi denominado de receptor canabinóide do subtipo 1 (CB1)

(MATSUDA, 1990). Posteriormente, um segundo receptor, denominado de receptor canabinóide do subtipo 2 (CB2) foi isolado de células do sistema imunológico (HOWLETT, 2002).

Os receptores CB1 são abundantes no cérebro. Entre as regiões que apresentam um número maior desses receptores estão: o cerebelo, o qual é responsável pela aprendizagem e resposta ao stress e o córtex cerebral, o qual é responsável por funções cognitivas (WATSON, 2000).

O receptor CB2 é conhecido por estar presente principalmente em células eritrocitárias, macrofágicas e linfocíticas (PIOMELLI, 2003).

Ambos são receptores acoplados a uma proteína G que, quando ativada, inibe a enzima adenilato ciclase, aumenta a atividade de canais de potássio e inibe canais de cálcio, modulando a liberação de outros neurotransmissores (PIOMELLI, 2003).

A identificação dos receptores CB1 e CB2 levou ao descobrimento de ligantes endógenos, conhecidos como endocanabinóides, presentes em vários tecidos do corpo, como cérebro e intestino. Anandamida (AEA) e 2-glicerol araquidonil (2-AG) são alguns dos endocanabinóides conhecidos.

Um importante papel fisiológico desempenhado pelos compostos canabinóides é a neuroproteção (MARSICANO, 2003). Os mecanismos neuroprotetores dos canabinóides observados em estudos com animais incluem inibição da produção excessiva de glutamato e propriedades antioxidantes, que reduzem o dano causado pelos radicais de oxigênio.

Mechoulam e colaboradores (2002) descreveram que a administração de canabinóides protege o organismo de diferentes injúrias cerebrais, como por exemplo, isquemia e trauma.

Esses compostos também têm papel importante na neuromodulação, controlando a liberação de neurotransmissores via receptores CB1 pré-sinápticos (PIOMELLI, 2003).

Aguado e colaboradores (2007) descreveram a existência de receptores CB1 em células-tronco neurais de ratos e que animais *knockout* para estes receptores apresentam astrogliogênese menor e neurogênese maior em relação aos normais.

O pico de expressão dos receptores CB1 no hipocampo de ratos coincide com o início da gliogênese *in vivo* (FERNANDEZ-RUIZ, 2000).

O mRNA para o receptor CB1 já foi encontrado em embriões em estágios iniciais de desenvolvimento (PARIA, 1995). Também já foi demonstrado que a parede do útero produz AEA (DAS, 1995) indicando haver uma grande importância desse endocanabinóide durante a implantação do embrião.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar o efeito da ativação do sistema canabinoide em células-tronco embrionárias de camundongo (mES).

2.2 Objetivos específicos

- 1) Verificar a presença de receptores CB1 e CB2 em EBs que sofreram, ou não, processo de indução neuronal;
- 2) Avaliar se a ativação dos receptores canabinóides é capaz de proporcionar alteração do tamanho, proliferação e exercer efeito protetor em EBs que sofreram indução específica de diferenciação (indução neuronal com AR);

- 3) Avaliar se compostos canabinóides são capazes de alterar o tamanho, proliferação e exercer efeito protetor em EBs que **não** sofreram indução específica de diferenciação;
- 4) Avaliar quais os receptores (CB1 ou CB2) estariam eventualmente envolvidos nesses processos;
- 5) Verificar se a ativação de receptores canabinóides interfere com a estabilidade cromossômica de EBs;
- 6) Verificar se o tratamento de EBs com canabinóides é capaz de intensificar a migração celular e o número de neurônios gerados após tratamento com AR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e células-tronco embrionárias

Para obtenção de culturas de MEF foram utilizados camundongos da cepa 57/Black 6, com idade embrionária de 13 ou 14 dias (E13 ou E14, sendo E1= dia da concepção). Estes animais foram criados no biotério da Bio Rio, na UFRJ, e todos os procedimentos adotados seguiram as normas de comportamento ético segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

O trabalho também utilizou a linhagem de mES USP1, a qual foi previamente isolada, caracterizada e gentilmente doada pelas Dras. Lygia V. Pereira e Irina Kerkis, da Universidade de São Paulo (USP) (SUKOYAN, 2002).

3.2 Cultivo celular

3.2.1 Cultura de MEF

3.2.1.1 Modo de preparo da cultura

Para o preparo da cultura de MEF foi realizado, primeiramente, o deslocamento cervical de um animal gestante (com 13 ou 14 dias de gestação). Após este procedimento o útero foi retirado por inteiro e colocado em uma placa de Petri de vidro contendo uma solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x), com a presença de glicose 2% (MERCK, cat. no. 108337.1000). Já em condições estéreis, nas cabines de fluxo laminar vertical, os embriões foram retirados do útero e de suas placentas e passados para outra placa de Petri contendo solução de PBS 1x/glicose. Nessa placa foram retiradas as vísceras e a cabeça do embrião e este foi passado para outra placa de petri contendo meio-MEF sem soro, onde foi realizada a dissociação do embrião.

O meio MEF era composto de Dulbecco's modificado, acrescido de nutriente F-12 (DMEM/F12; Gibco, cat. no. 12400-016), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco; cat. no. 12657-029), 2 mM de glutamina-L (Gibco; cat. no. 21051-024) e 40 µg/ml de sulfato de gentamicina (Schering-Plough).

Em seguida, esse meio com células dissociadas foi recolhido e colocado em um tubo falcon de 15 mL. Após este procedimento, foi adicionado 500 µL de tryple (Invitrogen, cat. no. 12604-021) para melhor dissociação e homogeneização da solução e, em seguida, adicionado 500 µL de meio-MEF contendo soro com o objetivo de inativar a enzima.

Após a inativação, a solução foi centrifugada por 5 minutos a 675 g, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas já no volume final de meio-MEF a ser plaqueado. As células foram incubadas a 37°C, com 5% CO₂. O meio foi trocado a cada 2 dias.

Após a confluência de pelo menos 80%, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas três vezes com PBS 1x/glicose. Em seguida, foi adicionado cerca de 1 mL de tryple (o suficiente para cobrir a superfície da placa/garrafa), e as células foram incubadas a 37°C com 5% CO₂, por no máximo 5 minutos. Após este período, a enzima foi neutralizada com meio-MEF e as células foram centrifugadas por 5 minutos a 675 g. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas já no volume final de meio-MEF a ser plaqueado. Em seguida, as células foram novamente incubadas a 37°C e com 5% CO₂. O meio foi trocado a cada 2 dias e quando a cultura atingia 80% de confluência novamente, era realizado o plaqueamento das mES ou o congelamento destas células para posterior utilização.

3.2.1.2 Congelamento e Descongelamento

Quando a cultura de MEF não era utilizada para o plaqueamento das mES, esta era congelada e armazenada até que houvesse necessidade de sua utilização. Para realizar o congelamento, as culturas com confluência de 80% foram lavadas três vezes com PBS 1x/glicose e descoladas do fundo das garrafas ou placas com o uso da tryple. Em seguida, foram incubadas a 37°C com 5% CO₂ por até 5 minutos. Depois de neutralizar a enzima com meio-MEF, as células foram centrifugadas (5 minutos a 675 g) e ressuspensas em 1 mL de meio de congelamento (90% SFB e 10% DMSO). As células foram então colocadas em criotubos, congeladas e estocadas em nitrogênio líquido até o descongelamento.

Quando havia necessidade do uso de MEF os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e colocados a 37°C até o descongelamento da solução. As células foram retiradas do criotubo e colocadas em um tubo falcon de 15 mL. Em seguida, foi adicionado meio MEF, realizado a centrifugação e descarte do sobrenadante. As células foram então ressuspensas em meio MEF, homogeneizadas e plaqueadas. A incubação foi realizada a 37°C com 5% CO₂ até atingirem a confluência.

3.2.1.3 Passagem

Para melhor aproveitamento das MEF foi realizado, antes ou depois do congelamento, a passagem das mesmas. Este procedimento foi realizado quando as garrafas ou placas estavam confluentes. O objetivo da passagem foi de proporcionar mais espaço para as células e, por consequência, permitir que as mesmas pudessem continuar se multiplicando. O procedimento de passagem consistia na retirada do meio de cultura e na adição de tryple. Esta enzima foi utilizada até a segunda passagem das MEF. Após esta passagem, foi realizado o desprendimento destas células do fundo das placas e/ou garrafas com tripsina (Sigma; cat. no. T4799). Com as células em suspensão, a tryple ou a tripsina foi inativada com meio MEF. Em seguida foi realizada a centrifugação a 675 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas e colocadas em novas garrafas ou placas. O meio de cultura foi adicionado até completar 4 mL nas garrafas de 25cm² ou 2,5 mL em placa de 6 poços. As células foram então incubadas a 37°C com 5% CO₂. Quando placas foram utilizadas, estas foram pré-tratadas com gelatina 2% (Sigma; cat. no. G1890-500G) com o intuito de evitar com que as MEFs, quando inativadas, se desprendessem do fundo dos poços e, por consequência, prejudicassem o desenvolvimento das mES. Com o aumento no número de passagens as células acabavam perdendo suas características originais e, por isso, foram realizadas, no máximo, até seis passagens.

3.2.2 Cultura de mES

3.2.2.1 Plaqueamento

Para que as mES fossem cultivadas de maneira a permanecerem indiferenciadas utilizava-se a cultura de MEF como tapete. As MEF, quando atingiam 80% de confluência,

foram tratadas com mitomicina C (Sigma, cat. no. M-0503) de modo a provocar a interrupção da mitose e, por consequência, evitar a competição por espaço com as mES.

Para tal procedimento, inicialmente retirava-se o meio da cultura e adicionava-se 1 mL de solução de mitomicina C, a qual foi mantida na incubadora a 37°C, com 5% CO₂, durante 3 horas. Passado esse período, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x/glicose e, em seguida, 2,5mL do meio MEF foram adicionados à cultura. No dia seguinte o meio MEF foi substituído por meio mES e as mES foram plaqueadas.

O meio mES consistia de meio DMEM/F-12, suplementado com 15% de soro *knockout* (KSR) (Gibco, cat. no. 10828-028), 1% de solução de aminoácidos não essenciais (Gibco, cat. no. 11140-050), 2 mM de glutamina-L, 0,1 mM de β-mercaptoetanol (Gibco; cat. no. 21985-023), 40 µg/ml de sulfato de gentamicina e 200 µL de meio condicionado de LIF.

3.2.2.2 Passagem

O momento correto de realizar a passagem das colônias de mES foi determinado através da avaliação morfológica das mesmas, com auxílio de um microscópio óptico. Este momento ocorria normalmente três dias após o descongelamento, uma vez que as células, nesse período ainda mantinham suas características de pluripotencialidade, ou seja: as colônias apresentavam-se brilhantes, seu contorno era bem visível e definido e não se observava células individuais em meio às mesmas. Quando essas características eram alteradas, podendo ser observadas partes escuras e sem delineamento ao redor das colônias, significava que as mES estavam se diferenciando. Foi em uma fase anterior a diferenciação dessas células, quando elas ainda apresentavam as características de pluripotencialidade, que a passagem das mesmas foi realizada. O procedimento de passagem foi basicamente o mesmo adotado para a passagem das MEF. A diferença é que para a inativação da tripsina foi utilizado SFB ao invés de meio MEF. Outra diferença é que as mES, ao serem

ressuspendidas, foram colocadas em garrafas ou placas previamente preparadas com MEF inativadas, conforme descrito anteriormente.

3.2.2.3 Congelamento e descongelamento das mES

Os procedimentos de congelamento e descongelamento de mES também foram iguais aos empregados às MEF, com o diferencial de que as mES foram descongeladas no tapete de MEF previamente inativado com mitomicina C e o meio empregado no descongelamento foi meio mES ao invés de meio MEF.

3.2.3) Produção de meio condicionado contendo LIF

Células de ovário de hamster chinês (CHO) geneticamente modificadas para produzirem LIF (MING-TANG, 2006) foram descongeladas em meio MEF e mantidas em cultura até atingirem confluência de 80%. Quando atingiam essa confluência, essas células foram tripsinizadas e colocadas em outra garrafa (25 cm²) contendo 4 mL de meio MEF. Ao atingirem novamente confluência de 80% e quando estavam já na segunda passagem após o descongelamento, o meio condicionado proveniente destas (meio condicionado de LIF) foi retirado, filtrado (filtro de 0,22 µm) e armazenado no freezer a -70°C até haver necessidade de sua utilização. Foi utilizado cerca de 200 µL de meio condicionado de LIF, para cada 100 mL de meio mES.

3.2.4 Cultivo e tratamento de EBs

Para separar as mES da monocamada de MEF e, por consequência, dar início ao processo de formação de EBs, 1×10^6 células foram cultivadas em meio mES, acrescido de meio condicionado de LIF, em uma placa de cultura aderente de 6 poços, previamente tratada com 2% de gelatina. Esse cultivo foi realizado durante 2 dias.

Após 2 dias as colônias de mES foram tripsinizadas durante 5 minutos a 37°C , a tripsina foi inativada e as células centrifugadas a 675 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio EBs.

O meio EBs foi composto de DMEM/F12, 10% de SFB, 1% de aminoácidos não essenciais, 2 mM de glutamina L, 0,1 mM de β -mercaptoetanol e 40 mg/ml de sulfato de gentamicina.

As células, após serem ressuspensas, foram colocadas em placas de cultura não aderente (100 mm^2), completadas com 10 mL de meio EB, seguida da adição de 100 μL de meio condicionado de LIF.

Agregados esféricos em suspensão (EBs) foram formados após 2 dias. Parte dos EBs formados receberam o tratamento com AR 2 μM em meio sem LIF, durante 4 dias, para induzir diferenciação neuronal, seguido do tratamento com agonista canabinoide WIN 55212-2 (WIN) (Axxora, cat. no. ALX-270-243-M005). Outra parte dos EBs foi tratado com WIN 55212-2 sem a realização da indução neuronal, na presença de 100 μL de meio condicionado de LIF. Ambos os grupos foram expostos a concentrações que variaram de 0,1 a 100 nM de WIN 55212-2 durante 2 dias de tratamento. Para verificar se os efeitos observados foram via receptor CB1 ou CB2, um antagonista específico do receptor CB1, AM251 (Tocris, cat. no. 1117) na concentração de 300 nM, foi utilizado.

As amostras, após a realização dos tratamentos, foram fixadas em 4% de paraformaldeído durante 30 minutos, expostas a concentrações crescentes de sacarose (10, 20

e 30%) (NUCLEAR, cat. no. CAS 57-50-1) e, em seguida, foram embebidas em OCT (Tissue-Tek, 4583), para posterior obtenção de cortes, em criostato, de 10 μm de espessura.

Os EBs que, após tratamento, não foram destinados às técnicas de detecção de fragmentação do ácido desoxirribonucléico (DNA) ou de imunocitoquímica, foram processados de acordo com as demais técnicas empregadas.

3.2.5 Ensaio de migração

Para realizar a avaliação da diferenciação celular, os EBs que sofreram indução neuronal, seguido do tratamento com WIN 55212-2, foram colocados em placas aderentes para que as células migrassem.

Para este ensaio, placas aderentes foram previamente preparadas com lamínulas, seguido do tratamento com poli-ornitina 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma, cat. no. P3655) durante 4 horas. Transcorrido esse tempo, os poços foram lavados 3 vezes com água milli-Q autoclavada e, em seguida, foi realizado a incubação de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fibronectina (Invitrogen, cat. no. 33010-018) e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de laminina (Invitrogen, cat. no. 23017-015). A placa foi mantida na estufa *overnight*.

Os EBs previamente tratados com AR, seguido do tratamento com 10 nM de WIN 55212-2, foram transferidos para um tubo falcon de 15mL e, após decantarem, seu meio foi removido e estes foram ressuspensos em meio neurobasal.

O meio neurobasal consistia de DMEM/F12, fator de crescimento fibroblástico básico 20 ng/mL (FGF) (R&D, cat. no. 233FB025), N2 1x (Gibco, cat. no.17502-048), 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sulfato de gentamicina e 0,1 mM β -mercaptoetanol.

A solução de diluição de fibronectina/laminina foi removida e os EBs foram colocados sobre as lamínulas previamente tratadas com essas proteínas. Cerca de 25 EBs ressuspensos

em meio neurobasal foram colocados em cada poço. Após 2 dias, quando os EBs já haviam aderido e as células provenientes destes EBs já haviam migrado, foi realizado a fixação do material com paraformaldeído 4% e, em seguida, realizado a técnica de imunofluorescência.

3.3 Extração de ácido ribonucléico (RNA)

O RNA total das culturas foi extraído utilizando o protocolo do Trizol[®] Reagent (Invitrogen, cat. no. 1596-018), conforme descrito pelo fabricante. Para cada 10 cm² de área de placa ou 100 mg de tecido foi utilizado 1 mL de Trizol[®]. Após 5 minutos à temperatura ambiente, foi adicionado 200 µL de clorofórmio. Após a homogeneização, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 12500 g a 4°C. A fase aquosa, contendo o RNA, foi recolhida, separada e a ela foi adicionado 500 µL de álcool isopropílico. Em seguida, a amostra foi incubada por, no mínimo, 30 minutos a -70°C (ou até 3 dias a -70°C). Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 12500 g à 4°C e o precipitado lavado com etanol 70%. Após secar por aproximadamente 30 minutos à 12500 g, o RNAm foi ressuspensão em 15 µL de água livre de RNase. Em seguida foi realizada a dosagem do RNA contido na amostra através de espectrofotometria, em comprimento de onda de 260 nm.

3.4 Síntese de DNA complementar (cDNA)

RNA total foi utilizado para a confecção de cDNA (kit PROMEGA cat. no. A3800). Com esse objetivo, 1 µg de RNA, extraído e quantificado de acordo com os procedimentos citados anteriormente, foi incubado com 0,5 µg de oligonucleotídeo e completado com água livre de RNase, de maneira a se obter, ao final, um volume final de 5 µL. Esta solução foi então submetida a uma temperatura de 70°C por 5 minutos e, em seguida, rapidamente resfriada para 4°C, durante o mesmo período de tempo. Após a realização deste procedimento, foram adicionados a esta solução 4 µL de tampão 5x (concentração final 1x), 2,4 µL de MgCl₂ 25 mM (concentração final de 3 mM), 1µL da mistura de dNTP 10 mM (concentração final de 0,5 mM), 1µL de inibidor de ribonuclease (concentração final de 1 u/µL), 1µL da enzima transcriptase reversa e água livre de RNase até completar um volume final de 15 µL. Estando a solução preparada, esta foi colocada em um aparelho termociclador (Thermal Cycler; Eppendorf ®), o qual estava programado para submeter a amostra a temperatura de 25°C durante 5 minutos, seguida de uma temperatura de 42°C durante 1 hora e 70° C durante 15 minutos. Após o término da reação, a amostra contendo o cDNA foi utilizada para a realização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.5 Técnica de Reação de Polimerização em Cadeia Após Transcrição Reversa (RT-PCR)

As amostras de cDNA foram amplificadas pela técnica de PCR. Para tal, foram utilizados os seguintes primers: OCT4 5'-AGA GCA GTG ACG GGA ACA GAG-3'(senso), 5'-

CCA ACG AGA AGA GTA TGA GGC-3'(anti-senso); SOX2 5'-GAG AGC AAG TAC TGG CAA GAC CG-3 (senso), 5'-TAT ACA TGG ATT CTC GCC AGC C-3' (anti-senso); NANOG 5'-GTG CAT ATA CTC TCT CCT TCC C-3' (senso), 5'-AGC TAC CCT CAA ACT CCT GGT-3'; GAPDH 5'-ATC ACC ATT TCC AGG AGC G-3' (senso), 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3'(anti-senso); CB1 5'-CGT GGG CAG CCT GTT CCT CA-3'(senso) e 5'-CAT GCG GGC TTG GTC TGG-3'(anti-senso); CB2 5'-CCG GAA AAG AGG ATG GCA ATG AAT- 3'(senso), 5'-CTG CTG AGC GCC CTG GAG AAC-3'(anti-senso). Além dos primers de iniciação, 0,5 µL de senso e 0,5 µL de antisenso (concentração final 1 µM), foram adicionados também 4 µL de tampão 5x (concentração final 1x), 1,2 µL de MgCl₂ 25 mM (concentração final de 2mM), 0,4 µL da mistura de dNTP 10 mM (concentração final de 0,2 mM), 2 µL da amostra de cDNA, 0,2 µL da enzima Taq polimerase e água livre de RNase até completar um volume final de 20 µL. Estando a solução preparada, esta era colocada em um aparelho termociclador, o qual estava programado para submeter a amostra a temperatura de 94° C por 45 segundos, 55°C (OCT4, SOX2, NANOG) ou 60°C (GAPDH, CB1 e CB2) por 30 segundos, 72°C por 1 minutos e 30 segundos, durante 30 ciclos. Para tal procedimento foi utilizado o termociclador Thermal Cycler (Eppendorf ®). Como controle negativo, foi realizado um PCR de uma amostra de RNA não incubada previamente com a transcriptase reversa. Os produtos de DNA do PCR foram analisados eletroforeticamente em gel de agarose 2% e visualizados por coloração com brometo de etídio 0,5 µg/ml. O tamanho das bandas esperadas para OCT4, NANOG, SOX2, GAPDH, CB1 e CB2 eram, respectivamente, 177, 213, 335, 571, 402 e 478 pares de bases.

3.6 Análise do tamanho dos EBs

Os cortes dos EBs foram lavados 3x com PBS 1x e, em seguida, tiveram seus núcleos marcados com 1 µg/mL de 4',6'-diamino-2-fenil-lindol (DAPI) (Cambrex, cat. no, PA-3013), seguida de 3 novas lavagens com PBS 1x. Para realizar a medição das áreas destes EBs foram obtidas imagens com microscópio de fluorescência Zeiss. Após este procedimento, as áreas foram manualmente delimitadas e, com auxílio do programa Axioplan, quantificadas. As análises ocorreram em pelo menos três experimentos distintos, sendo realizada as medições das áreas de pelo menos 30 EBs por grupo experimental.

3.7 Detecção de morte celular em EBs

A técnica de detecção de fragmentação de DNA (TUNEL) (PROMEGA, cat. no. G3250) foi utilizada para verificar se a ativação dos receptores canabinóides tinha capacidade de proporcionar efeito de proteção contra a morte celular. Para tal, cortes de EBs foram tratados com 20 µg/mL de proteinase K durante 8 minutos a temperatura ambiente e lavados com PBS pH 7.4. Posteriormente foi realizada a adição de tampão de equilíbrio durante 10 minutos e, em seguida, as amostras foram incubadas com a enzima e o tampão de reação durante 1 hora, a 37°C. Os cortes foram então incubados com solução de parada de reação (tampão stop) durante 15 minutos e lavados com PBS. A marcação nuclear foi realizada com 1 µg/mL de 4',6'-diamino-2-fenil-lindol (DAPI) (Cambrex, cat. no, PA-3013), seguida de 3 novas lavagens com PBS 1x. Para evitar perda de fluorescência as amostras foram armazenadas em N-propil-galato (Sigma, cat. no. P3130). Aproximadamente 25 EBs, de cada

experimento, foram analisadas através do uso do microscópio de fluorescência Nikon TE300. Células TUNEL positivas foram quantificadas em relação ao total de núcleos marcadas com DAPI.

3.8 Análises por imunocitoquímica

As colônias de mES, os cortes de EBs e os EBs plaqueados foram primeiramente lavados 2 vezes com PBS, tratados com 0,3% Triton (Isolar, cat. no. 271) durante 5 minutos e, em seguida, incubados com BSA 5% (Sigma, cat. no. A7906) durante 1 hora. O anticorpo monoclonal anti-OCT4 (Santa Cruz, cat. no. 5279), na diluição de 1:100, foi usado em colônias de mES para confirmar a pluripotencialidade destas células. Para verificar o efeito de agonistas canabinóides sobre a proliferação celular foram utilizados cortes histológicos de EBs. Os cortes foram incubados *overnight* a temperatura ambiente com anticorpo policlonal anti-fosfo-H3 (Upstate cell signaling solutions, cat. no. 07-424), na diluição de 1:500. Para verificar o processo de diferenciação celular no ensaio de migração foram utilizados os anticorpos anti- β tubulina III (Sigma, cat. no. T5076) e anti-nestina (BD Pharm, cat. no. 611658), nas diluições de 1:100 e 1:200, respectivamente. Depois de realizado a incubação com os anticorpos primários, o material foi lavado 3 vezes com PBS 1x e, em seguida, foi realizado a incubação com os anticorpos secundários: anti-mouse IgG (Molecular Probe, cat. no. A11003) para OCT4, Nestina e β -tubulina III ou anti-rabbit IgG (Molecular Probe, cat. no. A11010) para fosfo-H3, ambos utilizados na diluição de 1:400 e incubados durante 2 horas. Após a incubação com os anticorpos secundários, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS, seguida de marcação nuclear com DAPI e 3 novas lavagens com PBS 1x. Para evitar perda de fluorescência as amostras foram armazenadas em N-propil-galato.

Aproximadamente 25 EBS, de cada experimento, foram analisadas através do uso do microscópio de fluorescência Nikon TE300. Células fosfo-H3 positivas foram quantificadas em relação ao total de núcleos marcadas com DAPI.

3.9 Incorporação de timidina [³H]

EBS expostos a 10 ou 100 nM de WIN 55212-2, durante 48 horas, foram incubados com timidina tritiada [³H] (1 µCi/mL-Amersham, Arlington Heights, IL) nas últimas 6 horas de tratamento. Os EBS, após a incorporação com timidina, foram lavados com PBS 1x (pH 7,4) e homogeneizados em 500 µL de NaOH 0.4 M. Aliquotas desse homogeneizado foram precipitadas com 10% de TCA e, em seguida, filtradas. Os filtros foram lavados com 10% de TCA, seguido de lavagem com etanol e, subseqüentemente, secos a uma temperatura de 100°C. Em seguida, foi realizada a leitura de incorporação no centilador Packard, modelo 1600TR. A quantificação de proteínas em cada amostra foi realizada através do método de Lowry (LOWRY, 1951).

3.10 Cariotipagem

EBS expostos à concentração de 10 nM de WIN 55212-2 durante 48 horas, foram incubados com colcemida 0,1 µg/ml (Karyo Max, Gibco. cat no. 15212-012) nas últimas 6 horas de tratamento a fim de acumular células em metáfase. Depois de tripsinizadas, o meio foi inativado com 1/3 de volume de SFB e as células passaram por um processo de

dissociação mecânica através de consecutivas pipetagens (P1000 e P200). Para garantir que as células estivessem bem individualizadas, a suspensão celular foi filtrada em uma membrana de nylon de 40 µm (BD Biosciences, cat. no. 352340).

Posteriormente, as células foram tratadas com uma solução hipotônica de KCl 75mM a 37°C durante 15 min. Em seguida elas foram fixadas em metanol/ácido acético 3:1 (v:v) e armazenadas a 4°C *overnight*.

No dia seguinte, as células foram lavadas 3 vezes com solução de fixação, o sobrenadante foi dispensado e o *pellet* ressuspensionado em pequeno volume da solução fixadora. 15 a 30 µl da suspensão celular foi distribuída na superfície de lâminas. Após a gradual evaporação do fixador, as lâminas foram expostas a vapor de água por 30 segundos. A densidade e qualidade das células em metáfase foram então verificadas em microscópio de contraste de fase.

Para contagem dos cromossomos, foi realizada a marcação dos mesmos com DAPI. As imagens foram obtidas com o uso do microscópio de fluorescência Zeiss. Aproximadamente 25 células em metáfase, de cada experimento, foram analisadas. Seus cromossomos foram quantificados e comparados em relação ao grupo controle.

3.11 Análise estatística

Para os experimentos de incorporação de timidina tritiada, cariotipagem e ensaio de migração foi utilizado o Teste t, uma vez que este é considerado o mais indicado para comparações entre dois grupos experimentais (MOTULSKY, 1995). As demais análises foram realizadas através da aplicação do teste de variância (One-way ANOVA), pois o mesmo permite menor erro estatístico, em relação a múltiplos testes t, quando existem mais

que dois grupos experimentais. Como o método ANOVA possibilita apenas dizer se existe diferença estatística, porém não identifica quais os grupos que diferiram, foi utilizado um pós-teste. Nos experimentos com o uso do antagonista (AM251) foi aplicado o pós-teste Tukey, o qual compara todos os grupos entre si. Essa análise é considerada mais conservadora em relação aos demais métodos que possuem o mesmo objetivo (MOTULSKY, 1995). Nos demais experimentos foram realizadas comparações entre todos os grupos com o grupo controle e, nesse caso, o pós-teste utilizado foi de Dunnett (MOTULSKY, 1995). Os níveis de confiança foram estabelecidos em 95%, ou seja, $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da pluripotencialidade das mES

Nosso primeiro objetivo foi avaliar se as células-tronco embrionárias mantidas em cultura em nosso laboratório mantinham suas características de pluripotencialidade.

Para tal, foi realizado o cultivo e a expansão das mES sobre monocamada de MEF e, em seguida, foi realizada a extração do RNA proveniente dessas células. A amplificação do material foi realizada através da utilização da enzima transcriptase reversa e de primers específicos para fatores de transcrição, como OCT4, SOX2 e NANOG, clássicos marcadores de células indiferenciadas (NICHOLS, 1998; AVILION, 2003; CHAMBERS, 2003; MITSUI, 2003). GAPDH foi utilizado como controle da reação interna.

Além do RT-PCR, também foi realizado, nas colônias de mES, a técnica de imunocitoquímica para a proteína OCT4.

Conforme esperado, ambas as técnicas, RT-PCR e imunocitoquímica, mostraram a presença dos fatores de transcrição característicos e da proteína OCT4, respectivamente, na linhagem de mES cultivada no laboratório (Figura 3).

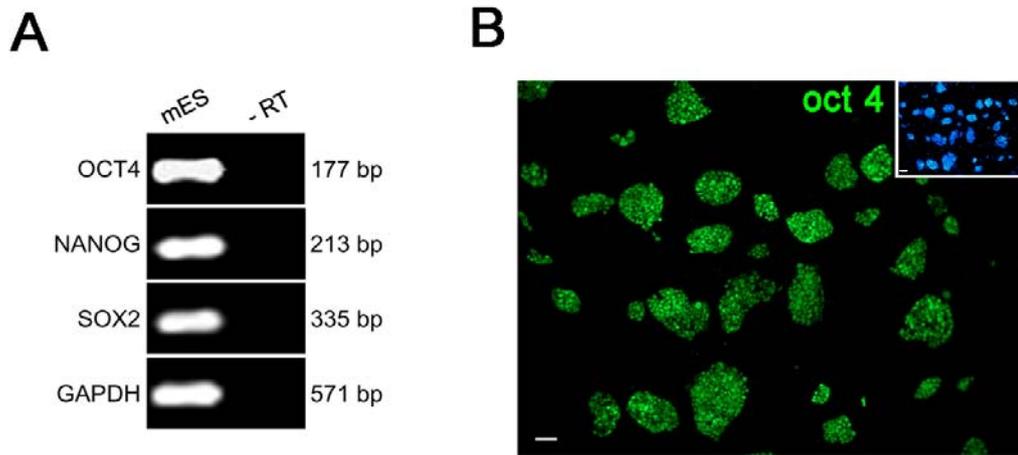


Figura 3: Caracterização da pluripotencialidade das mES. A) *Identificação de mRNA específico em células indiferenciadas:* RNA total foi extraído de culturas de mES. A amplificação do material foi realizada através da utilização da enzima transcriptase reversa e de primers específicos para fatores de transcrição, como OCT4, SOX2 e NANOG, clássicos marcadores de mES. GAPDH foi utilizado como controle da reação interna. A coluna -RT indica o controle negativo da reação. Produtos amplificados foram separados pelo tamanho, por eletroforese, através de um gel de agarose 2 % e visualizados por marcação de brometo de etídio. B) *Identificação da proteína OCT4:* mES foram cultivadas sobre MEF por dois dias. Em seguida, estas células foram fixadas e marcadas através do uso do anticorpo anti-OCT4, confirmando presença dessa específica proteína em colônias de mES. No canto superior direito, MEF e colônias de mES marcadas com DAPI. Barra de calibração corresponde a 50 μ m.

4.2 Expressão de receptores canabinóides

Para avaliar se mES expressavam receptores canabinóides CB1 e CB2, foi realizado cultivo e a expansão destas células sobre monocamada de MEF. Após este procedimento, as colônias foram cultivadas 2 dias sobre uma camada de gelatina e, posteriormente, cultivadas por mais 2 dias em placa não aderente até ocorrer a formação de EBs. Em seguida foi realizada a extração de RNA para a técnica de RT-PCR. Procuramos também avaliar se a expressão dos receptores CB1 e CB2 ocorria e/ou era mantida quando EBs sofriam um específico processo de diferenciação neuronal (tratamento com 2 μ M AR, durante 4 dias).

Nossos resultados demonstraram que EBs expressavam tanto receptores CB1, quanto CB2. Quando realizada a indução neuronal com AR a expressão de CB1 foi mantida, porém, interessante, CB2 deixou de ser detectado pela técnica. Cérebro total de camundongo foi usado como controle positivo, uma vez que já foi descrito na literatura que neurônios presentes no mesmo apresentam receptores CB1 e células da microglia apresentam principalmente receptores CB2 (PIOMELLI, 2003). A realização do PCR, sem a enzima transcriptase reversa, foi utilizada como controle negativo. (Figura 4).

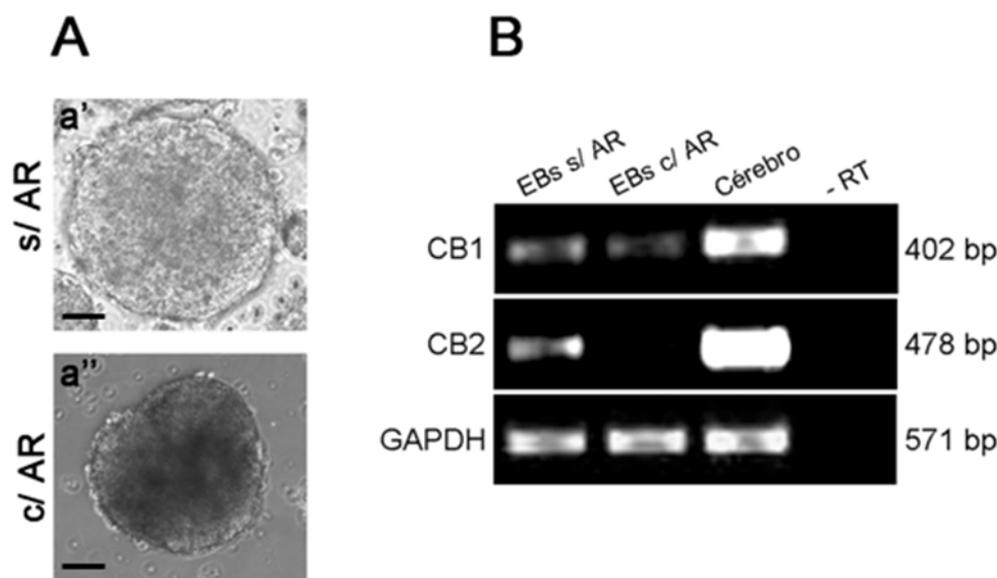


Figura 4: Expressão de receptores canabinóides: A) *Formação de EBs:* para gerar a formação dessas estruturas, mES plaqueadas sobre MEF durante dois dias foram plaqueadas durante mais dois dias em uma placa de bactéria não aderente, com meio EBs adicionado de meio condicionado de LIF (a'). Para induzir diferenciação neuronal os EBs foram tratados com AR 2 μ M durante 4 dias (a'') Barra de calibração de 50 μ m. B) *Identificação de mRNA para os receptores canabinóides em EBs:* a amplificação do material foi realizada através da utilização da enzima transcriptase reversa usando-se primers específicos de receptores CB1 e CB2. GAPDH foi usado como controle interno da reação. Produtos amplificados foram separados por eletroforese através do uso de gel com 2% de agarose e visualizados por marcação de brometo de etídio. Receptores CB1 e CB2 foram expressos em EBs sem tratamento com AR (primeira coluna). Porém, após a diferenciação neuronal, apenas CB1 continuou sendo expresso (segunda coluna). mRNA de cérebro total foi utilizado como controle positivo da reação. A coluna -RT demonstra o controle negativo da reação.

4.3 Agonista canabinóide e tamanho dos EBs

Para testar a hipótese de que a ativação de canabinóides talvez pudesse estar relacionada com a proliferação e/ou a proteção de EBs, foi avaliado o tamanho dos mesmos através da medição de suas áreas. Para tal procedimento, fotos de cortes de EBs corados com DAPI foram analisados com auxílio do programa Axioplan.

Três grupos experimentais foram avaliados, sendo o primeiro (controle) formado apenas por EBs cultivados em meio EBs, adicionado de meio condicionado de LIF e tratados com 0,02% de etanol (o mesmo usado na diluição do WIN 55212-2). O segundo grupo foi formado por EBs que sofreram indução de diferenciação neural com 2 μ M de AR por 4 dias, seguindo do tratamento com 0,02% de etanol durante 2 dias (veículo usado na diluição do WIN 5522-2) e o terceiro, que recebeu tratamento com 2 μ M AR durante 4 dias, seguido de tratamento com 10 nM de WIN 55212-2 durante 2 dias.

Nossos dados revelaram que, quando realizado tratamento com AR, ocorria uma diminuição no tamanho dos EBs. No entanto, quando este tratamento foi seguido da exposição de um agonista canabinóide durante 2 dias, ocorria uma reversão desse efeito (Figura 5).

Estes dados iniciais fortaleceram a hipótese de que a ativação de receptores canabinóides pudesse estar envolvida com a proliferação e/ou aumento de sobrevivência dos EBs.

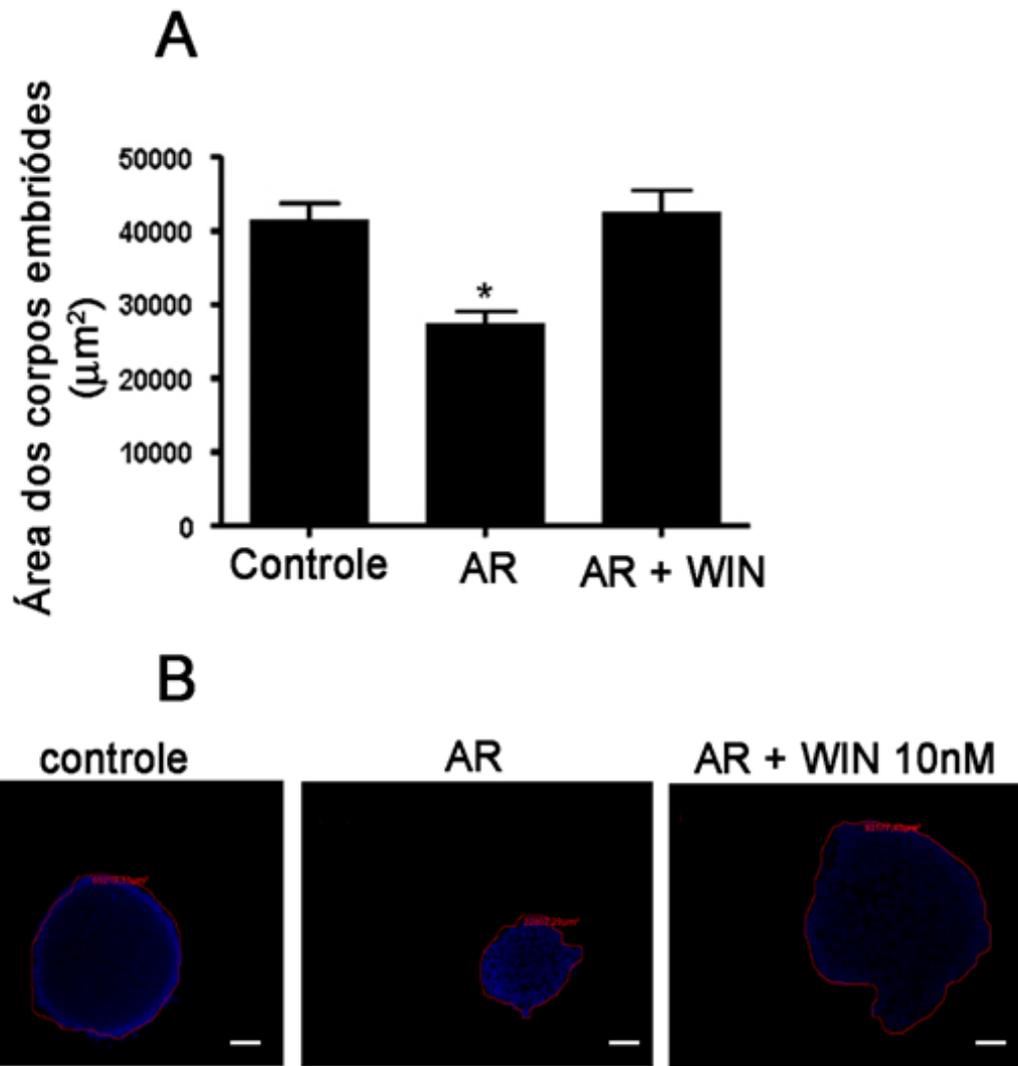


Figura 5: Agonista canabinóide reverte o efeito de diminuição do tamanho dos EBs. A) *Área dos EBs:* Para gerar a formação de EBs, mES plaqueadas sobre MEF durante dois dias foram plaqueadas por mais dois dias em placa de cultura não aderente, com meio DMEM-F2 contendo meio condicionado de LIF. Após a formação destas estruturas, o grupo controle foi tratado durante dois dias com meio EBs adicionado de meio condicionado de LIF, na presença de 0,02% de etanol (o mesmo usado na diluição de WIN 55212-2) (**controle**). Para induzir diferenciação neuronal os EBs foram tratados com 2 µM de AR durante 4 dias. Depois desse tratamento com AR, os EBs foram mantidos por mais dois dias com 0,02% de etanol (o mesmo usado durante a diluição de WIN 55212-2) (**AR**). O último grupo foi tratado durante 4 dias com AR, seguido de tratamento durante dois dias com 10 nM de WIN 55212-2 (**AR + WIN 10nM**). As quantificações foram realizadas em pelo menos três experimentos distintos, sendo realizado as medições das áreas de pelo menos 30 EBs por grupo experimental, em cada experimento. *P < 0,05. B) *Tamanho da área dos EBs:* grupo controle (**controle**), grupo tratado com 2 µM de AR durante 4 dias (**AR**) mais dois dias com 0,02% de etanol (o mesmo usado durante a diluição de WIN 55212-2) e grupo tratado com 2 µM de AR durante 4 dias mais 2 dias com 10 nM de WIN55212-2 (**AR + WIN 10 nM**). Barra de calibração corresponde a 50 µm.

4.4 Canabinóide reduz a morte celular de EBs que sofreram indução de diferenciação neuronal

Para tentar desvendar o que poderia estar ocorrendo com os EBs, fazendo com que os mesmos tivessem seu tamanho aumentado quando submetidos a um específico processo de diferenciação neuronal (tratamento com 2 μ M AR), seguido de tratamento com WIN 55212-2, procuramos realizar a técnica de detecção de fragmentação de DNA (TUNEL) e, com isso, verificar se o agonista canabinóide seria capaz de gerar efeito protetor sobre estas células.

Para tal, EBs tratados 4 dias com AR foram submetidos a mais 2 dias de tratamento com o agonista canabinóide WIN 55212-2. Na tentativa de se encontrar a melhor dose/resposta, foram utilizadas concentrações de WIN 55212-2 que variaram de 0,1 a 100 nM. Os EBs, depois de realizado o tratamento, foram fixados, emblocados, cortados em criostato e, em seguida, submetidos à técnica de TUNEL. Aproximadamente 25 EBs foram analisados e células mortas (TUNEL positivas) foram quantificadas. O grupo controle foi tratado com 2 μ M de AR durante 4 dias, seguido do tratamento com 0,02% de etanol (veículo usado para a diluição do WIN 5522-2).

Os dados obtidos mostraram que a ativação de receptores canabinóides foi capaz de gerar efeito protetor contra a morte celular. A melhor dose/resposta observada foi na concentração de 10 nM de WIN 55212-2, onde pudemos observar mais de 50% de proteção em relação ao grupo controle. Também observamos uma diminuição significativa, porém em menor proporção, quando realizado o tratamento com WIN 55212-2 na concentração de 50 nM. Concentrações de 0,1 e 100 nM não apresentaram nenhuma diferença em relação ao grupo controle (Figura 6).

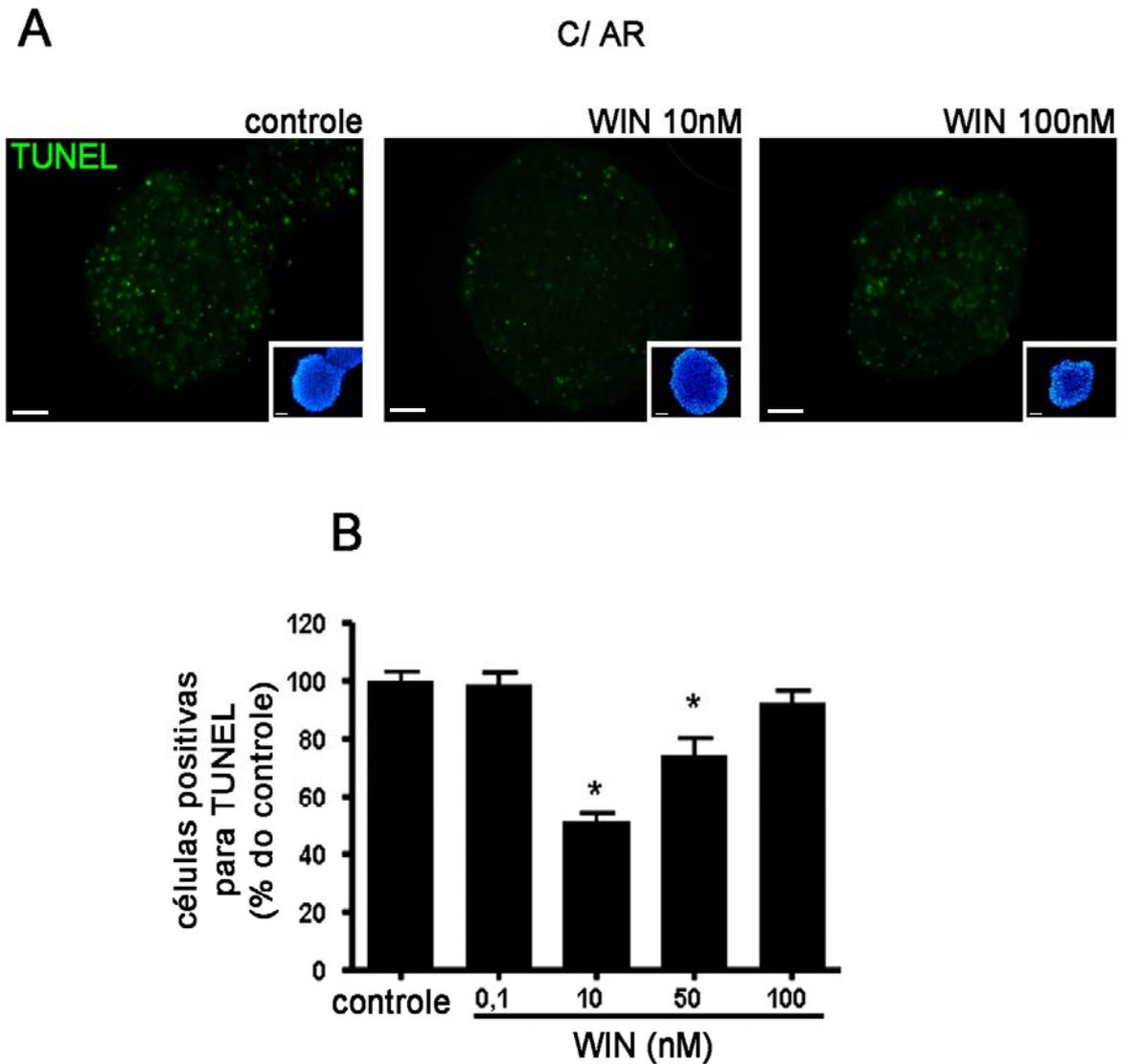


Figura 6: Canabinóide protege contra a morte celular EBs que sofreram indução específica de diferenciação: *A) EBs tratados com WIN 55212-2 tem aumento da proteção contra a morte celular:* Para gerar a formação de EBs, as mES foram plaqueadas por dois dias em placa de cultura não aderente, com meio EBs adicionado de meio condicionado de LIF. Depois desse período, todos os grupos foram tratados por mais 4 dias com 2 μ M de AR para causar uma indução neuronal. Após, o grupo controle foi mantido por mais dois dias com 0,02% de etanol (o mesmo usado durante a diluição do WIN 55212-2) (**controle**). Os demais grupos foram tratados com 10 nM de WIN 55212-2 e 100 nM, respectivamente, durante dois dias (**WIN 10nM e WIN 100nM**). Em seguida as células foram fixadas e depois submetidas a técnica de TUNEL. No canto inferior direito, EBs marcadas com DAPI. Barra de calibração corresponde a 30 μ m. *B) Quantificação da morte celular:* Essa quantificação foi realizada pela contagem das células que eram TUNEL positivas. Depois do tratamento dos EBs com concentrações de WIN 55212-2 variando de 0,1 até 100 nM, pode-se observar um efeito protetor significativo nas concentrações de 10 e 50 nM desta substância. Células marcadas foram expressas como porcentagem do controle. As quantificações foram realizadas em pelo menos três experimentos distintos. *P < 0,05.

4.5 O agonista canabinóide WIN 55212-2 não aumenta a proliferação de EBs que sofreram indução de diferenciação neuronal

Uma vez demonstrado que um agonista canabinóide é capaz de proporcionar efeito de proteção contra a morte celular e, considerando o fato de que estes compostos, conforme descrito na literatura, atuam de diferentes maneiras, ou seja, aumentando ou diminuindo a proliferação de diferentes tipos celulares, procuramos avaliar qual seria o efeito na proliferação em EBs.

O mesmo protocolo experimental, com as mesmas concentrações do agonista canabinóide utilizadas no experimento anterior foram aqui, nesse experimento, também empregadas. A técnica inicialmente utilizada para avaliar o possível efeito de interferência dos canabinóides na proliferação foi a imunocitoquímica e o anticorpo empregado foi utilizado para marcar células em metáfase (histona fosforilada). Aproximadamente 25 EBs foram analisados e as células proliferantes (fosfo-H3 positivas) foram quantificadas.

O resultado obtido com a técnica de imunocitoquímica sugeriu que a ativação dos receptores canabinóides com WIN 55212-2 não interfere com a proliferação celular.

Como outra forma de avaliar a proliferação, EBs, divididos em grupo controle e 10 nM de WIN 55212-2 foram expostos à timidina tritiada durante as últimas 6 horas de tratamento do agonista canabinóide (duração total do tratamento com o agonista canabinóide foi de 2 dias). Em seguida, conforme descrito nos material e métodos, foi realizada a avaliação da incorporação da timidina pelas células que entraram na fase S do ciclo celular.

Conforme observado nas análises por imunocitoquímica, não ocorreu nenhum aumento da proliferação celular com a técnica de incorporação de timidina tritiada. Foi possível observar, ao contrário, uma significativa diminuição da mesma (Figura 7).

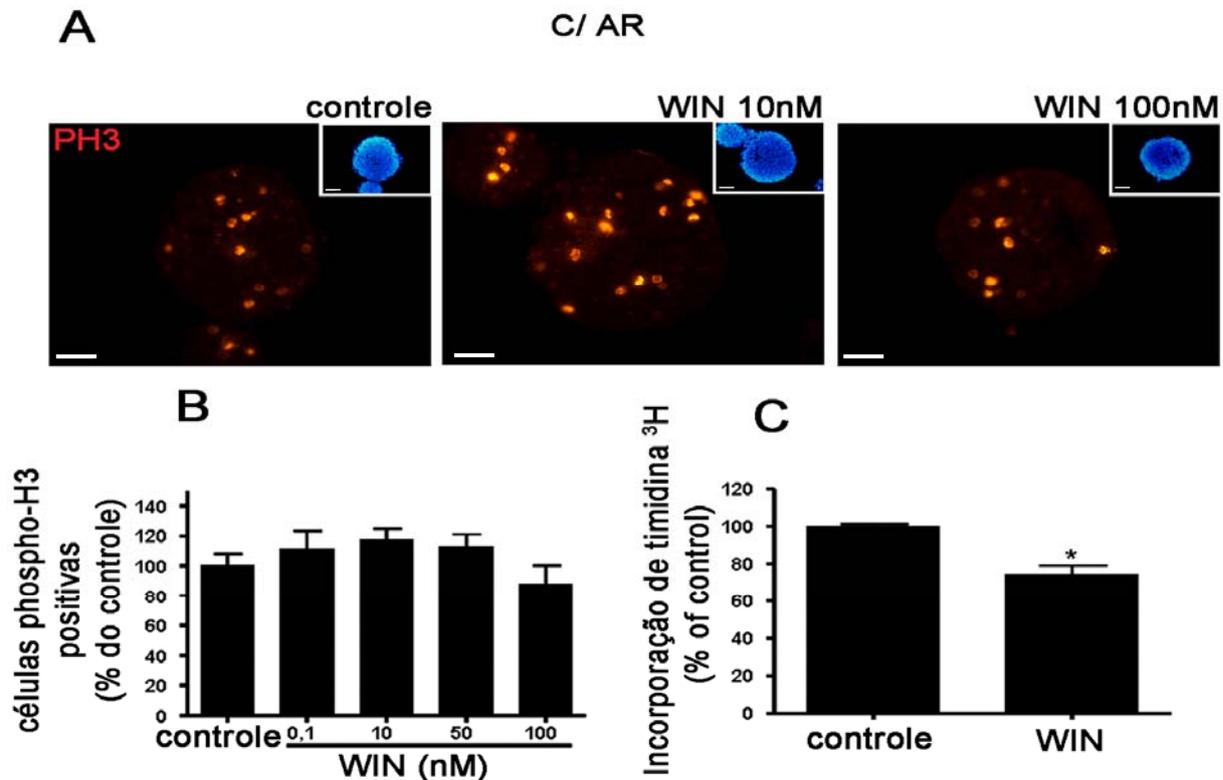


Figura 7: O agonista canabinóide WIN 55212-2 não aumenta a proliferação de EBs que sofreram indução específica de diferenciação. *A) Tratamento dos EBs com WIN 55212-2 não altera a proliferação destas células: para gerar EBs, as mES foram plaqueadas por dois dias em uma placa de cultura não aderente, com meio EBs adicionado de meio condicionado de LIF. Para induzir diferenciação neuronal os EBs foram tratados com AR 2 μM durante 4 dias. Depois desse período o grupo controle foi mantido por mais dois dias com 0,02% de etanol (o mesmo usado para diluir o agonista canabinóide WIN 55212-2) (controle). Os grupos 10 nM WIN 55212-2 e 100 nM foram mantidos por dois dias na presença do agonista canabinóide (WIN 10 nM e WIN 100 nM). Em seguida, as células foram fixadas e marcadas através do uso de um anticorpo marcador de células proliferantes (fosfo H3). No canto superior direito, EBs marcadas com DAPI. Barra de calibração corresponde a 30 μm . B) Quantificação da proliferação celular pela técnica de imunocitoquímica: essa quantificação foi realizada através da contagem do número de células fosfo H3 positivas. As concentrações de WIN 55212-2 utilizadas demonstraram não haver diferença significativa na proliferação quando comparado com o grupo controle. A contagem celular foi apresentada como porcentagem do controle. $P > 0,05$. C) Quantificação da proliferação pela técnica de incorporação de timidina tritiada: essa quantificação demonstrou haver diferença significativa da proliferação celular quando realizado o tratamento com 10 nM WIN 55212-2, em comparação como grupo controle. Todas as quantificações foram realizadas em pelo menos três experimentos distintos. $*P < 0,05$.*

4.6 Ativação de receptores canabinóides também reduz a morte celular de EBs que não sofreram indução específica de diferenciação

Procuramos também testar a hipótese de que a ativação do sistema canabinóide tem importante função de proteção contra a morte celular em EBs que não sofreram indução de diferenciação neuronal.

Para tal, EBs, após 2 dias de cultivo em placa não aderente, foram submetidos a mais 2 dias de tratamento com o agonista canabinóide WIN 55212-2, em meio EBs adicionado de meio condicionado de LIF. Na tentativa de se encontrar a melhor dose/resposta, foram utilizadas concentrações de WIN 55212-2 que variaram de 0,1 a 100 nM. Os EBs, depois de realizado o tratamento, foram fixados, emblocados, cortados em criostato e, em seguida, submetidos à técnica de TUNEL. Aproximadamente 25 EBs foram analisados e células mortas (TUNEL positivas) foram quantificadas. O grupo controle foi tratado com 0,02% de etanol (o mesmo usado na diluição do WIN 5522-2)

Interessantemente, nossos dados mostraram que estes EBs, mesmo sem sofrer indução neuronal com AR, quando tratados com 10 e 50 nM de WIN 55212-2 tiveram redução da morte celular de cerca de 45% e 25%, respectivamente. Concentrações de 0,1 e 100 nM não apresentaram nenhuma diferença em relação ao grupo controle (Figura 8).

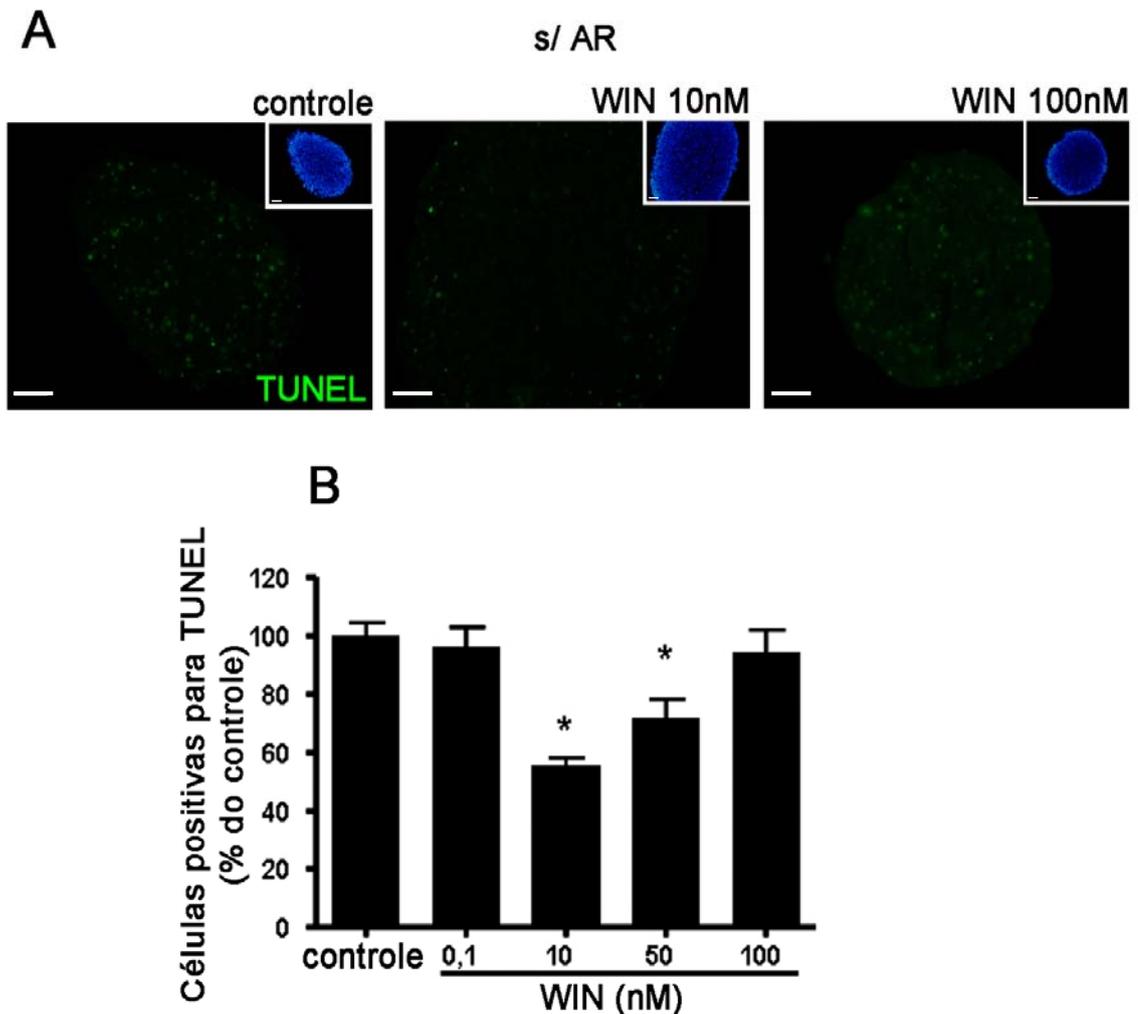


Figura 8: Ativação de receptores canabinóides protege contra a morte celular EBs que não sofreram indução específica de diferenciação: A) *EBs tratadas com WIN 55212-2 tem aumento da proteção contra a morte celular:* para gerar a formação dessas estruturas, as mES foram plaqueadas por dois dias em placa de cultura não aderente, com meio EBs adicionado de meio condicionado de LIF. Após esse período, o grupo controle foi mantido por mais dois dias com 0,02% de etanol (o mesmo usado durante a diluição do WIN 55212-2) (**controle**). Os demais grupos foram tratados com 10 nM de WIN 55212-2 e 100 nM, respectivamente, durante dois dias. (**WIN 10 nM e WIN 100 nM**). Em seguida as células foram fixadas e depois submetidas a técnica de TUNEL. No canto superior direito, EBs marcadas com DAPI. Barra de calibração corresponde a 30 μ m. B) *Quantificação da morte celular:* essa quantificação foi realizada pela contagem das células TUNEL positivas. Depois do tratamento dos EBs com concentrações de WIN 55212-2 variando de 0,1 até 100 nM, pode-se observar um significativo efeito protetor nas concentrações de 10 e 50 nM desta substância. Células TUNEL positivas foram expressas como porcentagem do controle. As quantificações foram realizadas em pelo menos três experimentos distintos. *P < 0,05.

4.7 O agonista canabinóide WIN 55212-2 não aumenta a proliferação celular de EBs que não sofreram indução específica de diferenciação

Para testar a hipótese de que a ativação de canabinóides talvez pudesse estar relacionada com alteração da proliferação de EBs que não sofreram indução neuronal, foi utilizado o mesmo protocolo experimental, com as mesmas concentrações do agonista canabinóide utilizadas no experimento anterior.

A técnica inicialmente utilizada para avaliar o possível efeito de interferência dos canabinóides na proliferação foi a imunocitoquímica e um anticorpo foi utilizado para marcar células em metáfase (histona H3 fosforilada). Aproximadamente 25 EBs foram analisados e as células proliferantes (fosfo-H3 positivas) foram quantificadas. Os EBs do grupo controle, após serem cultivados durante 2 dias em placa de cultura não aderente, foram tratados durante mais 2 dias com 0,02% de etanol (veículo usado para a diluição do WIN 55212-2), em meio EBs adicionado de meio condicionado de LIF.

O resultado obtido com a técnica de imunocitoquímica sugeriu que, quando realizado a ativação dos receptores canabinóides com WIN 55212-2, não ocorre aumento da proliferação celular.

Para avaliar melhor o resultado de proliferação, EBs, divididos em grupo controle e 10 nM de WIN 55212-2 foram expostos a timidina tritiada durante as últimas 6 horas de tratamento do agonista canabinóide (duração total do tratamento com o agonista canabinóide foi de 2 dias). Em seguida, conforme descrito nos material e métodos, foi realizado a avaliação da incorporação da timidina pelas células que haviam entrado na fase S do ciclo celular.

Também nesse caso, de acordo com os resultados de imunocitoquímica, não ocorreu nenhum aumento da proliferação celular com a técnica de incorporação de timidina tritiada. Foi possível observar, ao contrário, uma significativa diminuição da mesma (Figura 9).

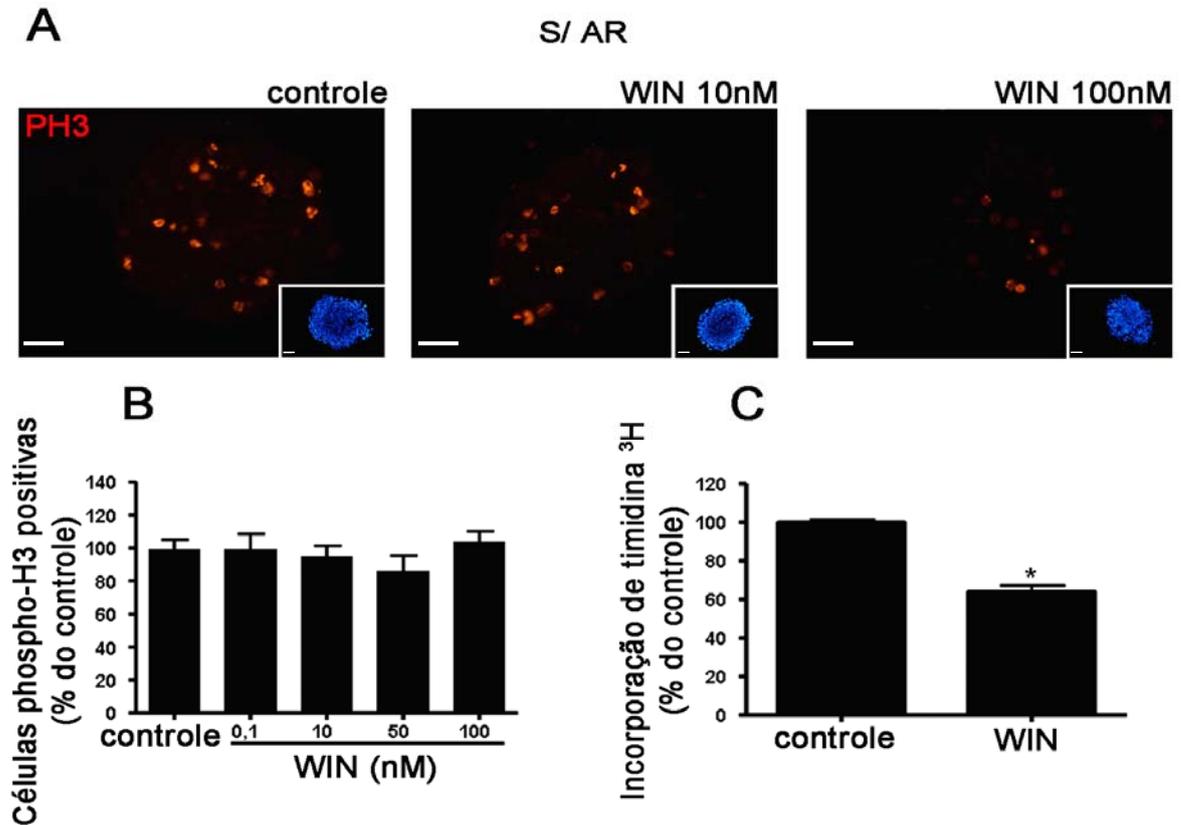


Figura 9: O agonista canabinóide WIN 55212-2 não aumenta a proliferação de EBs não sofreram indução específica de diferenciação A) *Tratamento dos EBs com WIN 55212-2 não altera a proliferação destas células:* para gerar EBs, as mES foram plaqueadas por dois dias em um placa de cultura não aderente, em meio EBs adicionado de meio condicionado de LIF. Depois desse período o grupo controle foi mantido por mais dois dias com 0,02% de etanol (o mesmo usado para diluir o agonista canabinóide WIN 55212-2), em meio EBs adicionado de meio condicionado de LIF (**controle**). Os grupos 10 nM de WIN 55212-2 e 100 nM foram mantidos por dois dias na presença do agonista canabinóide, também em meio EBs adicionado de meio condicionado de LIF (**WIN 10 nM e WIN 100 nM**). Em seguida, as células foram fixadas e marcadas através do uso de um anticorpo marcador de células proliferantes (fosfo H3). No canto inferior direito, EBs marcadas com DAPI. Barra de calibração corresponde a 30 μm . B) *Quantificação da proliferação celular:* essa quantificação foi realizada através da contagem do número de células fosfo H3 positivas. As concentrações de WIN 55212-2 utilizadas demonstraram não haver diferença significativa na proliferação quando comparado com o grupo controle. A contagem celular foi apresentada como porcentagem do controle. $P > 0,05$. C) *Quantificação da proliferação pela técnica de incorporação de timidina tritiada:* essa quantificação demonstrou haver diferença significativa da proliferação celular quando realizado o tratamento com 10 nM WIN 55212-2, em comparação com grupo controle. Todas as quantificações foram realizadas em pelo menos três experimentos distintos. $*P < 0,05$.

4.8 A ativação do receptor CB1 está relacionado com o efeito de proteção celular

Procuramos observar se o efeito de proteção observado estaria ocorrendo via ativação dos receptores CB1. Para tal, utilizamos um bloqueador específico de CB1, chamado AM251. EBs que sofreram indução neuronal com AR e EBs que não sofreram indução neuronal, foram tratados com 10 nM de WIN 55212-2, associado ao tratamento com 300 nM do antagonista AM251. Além disso, também foram realizados grupos tratados somente com 10 nM de WIN 55212-2 ou tratados somente com 300 nM do antagonista. O grupo controle foi tratado com 0,02% de etanol (veículo usado para a diluição do WIN 55212-2). Aproximadamente 25 EBs foram analisados e células mortas (TUNEL positivas) foram quantificadas.

Os dados gerados permitiram concluir que EBs que sofreram indução neuronal com AR, seguido de tratamento com WIN 55212-2, tiveram uma diminuição da morte celular, em relação ao grupo controle. Esse efeito foi totalmente revertido quando realizado o tratamento associado do agonista canabinóide com o antagonista AM251. Quando realizado somente o tratamento com AM251 não houve diferença, em relação ao grupo controle (Figura 10 A-B).

Resultados semelhantes foram obtidos com os EBs que não sofreram indução neuronal. No entanto, quando realizado o tratamento associado do agonista canabinóide com o antagonista AM251, o bloqueio, nessa condição, ocorreu parcialmente (Figura 10 A-C).

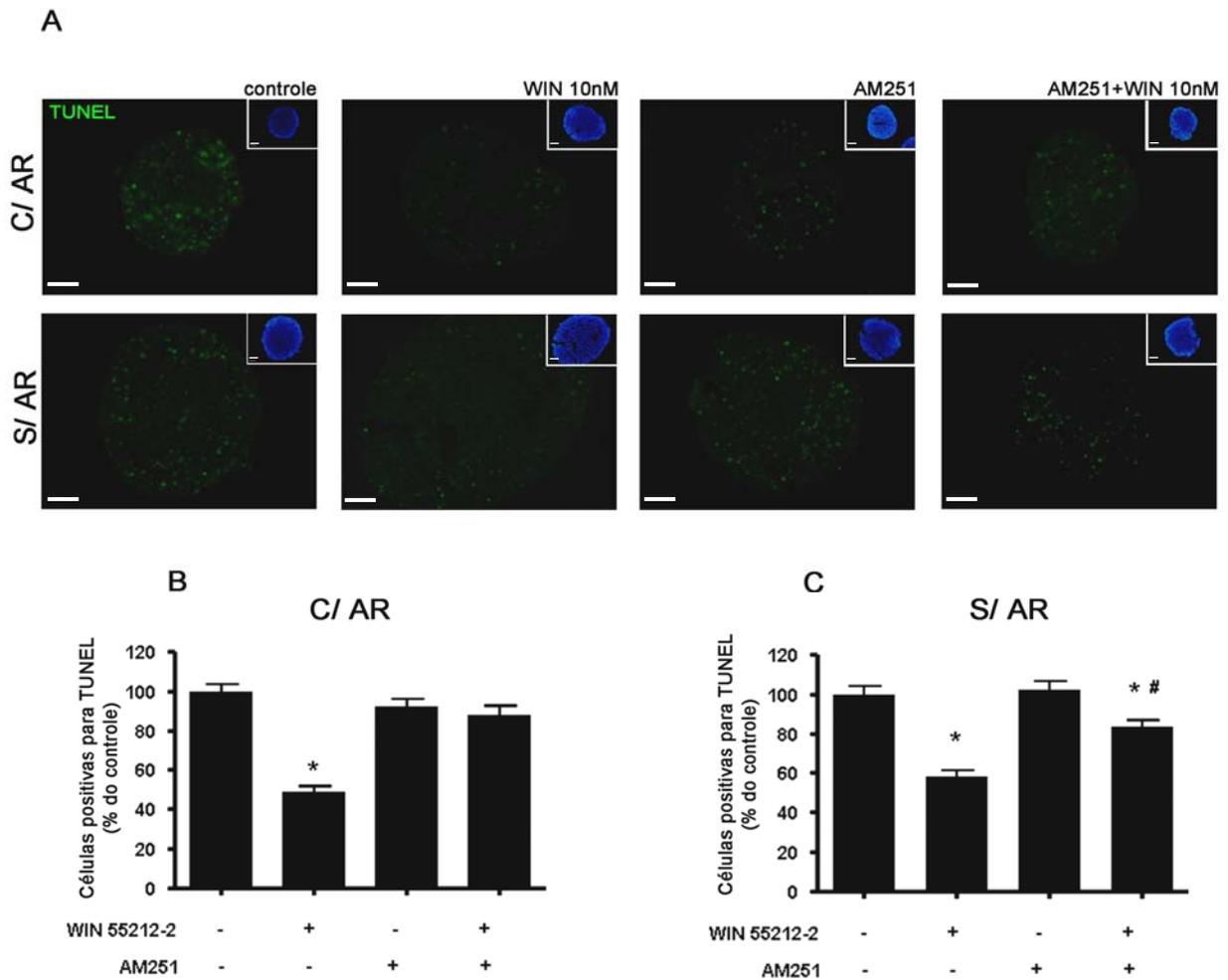


Figura 10: O receptor CB1 está relacionado com o efeito de proteção celular. A) *O antagonista de CB1 (AM251) reverte o efeito do agonista canabinóide WIN 55212-2: para gerar EBs, as mES foram plaqueadas por dois dias em uma placa de cultura não aderente, em meio EBs adicionado de meio condicionado de LIF. Para induzir diferenciação neuronal os EBs foram tratados com AR 2 μ M durante 4 dias. Os grupos controles dos EBs que sofreram e que não sofreram indução neuronal com AR (c/AR e s/AR) foram mantidos por dois dias com 0,02% de etanol (o mesmo usado para diluir o agonista canabinóide WIN 55212-2) (controle). Os demais grupos foram tratados com 10 nM de WIN 55212-2, 300 nM AM 251 e 300 nM AM251 associado com 10 nM WIN 55212-2 durante dois dias (WIN 10 nM, AM251 e AM251 + WIN 10 nM). Em seguida, as células foram fixadas e depois submetidas à técnica de TUNEL. No canto superior direito, EBs marcadas com DAPI. Barra de calibração corresponde a 30 μ m.* B) *Quantificação da morte celular em EBs que sofreram indução neuronal: pode-se observar uma reversão total do efeito de proteção da morte celular quando realizado o tratamento com 10 nM de WIN 55212-2 associado ao tratamento com o antagonista específico de CB1 (AM251), em EBs que sofreram indução neuronal com AR.* C) *Quantificação da morte celular em EBs que não sofreram indução neuronal: pode-se observar uma reversão parcial do efeito de proteção da morte celular quando realizado o tratamento com 10 nM de WIN 55212-2 associado ao tratamento com um antagonista específico de CB1 (AM251), em EBs que não sofreram indução neuronal com AR. Todas as quantificações foram realizadas em pelo menos três experimentos distintos. *P < 0,05.*

4.9 Estabilidade cromossômica

Recentemente, um trabalho desenvolvido por Peterson e colaboradores (2007) demonstrou que o efeito protetor contra a morte celular proporcionado por um inibidor de caspases pode estar relacionado com aumento da instabilidade cromossômica. Por esse motivo procuramos investigar se o efeito protetor da ativação dos receptores canabinóides poderia, além de favorecer a sobrevivência celular, estar causando aumento no número de células com alterações cromossômicas.

Para tal, foi utilizada a técnica de cariotipagem. EBs tratados com 10 nM de WIN 55212-2 durante 2 dias, foram expostos nas últimas 6 horas de tratamento a uma substância capaz de acumular células na fase de metáfase (colcemida). Após este procedimento, foi realizada toda metodologia, conforme descrito nos material e métodos, para a obtenção e contagem das células em metáfase. O grupo controle foi tratado com 0,02% de etanol (veículo usado para a diluição do WIN 55212-2).

Os dados obtidos revelaram que, quando realizado o tratamento com WIN 55212-2, o número de células que mantiveram a estabilidade cromossômica ficou em torno de 68%, enquanto que no grupo controle foi de cerca de 60% (Figura 11).

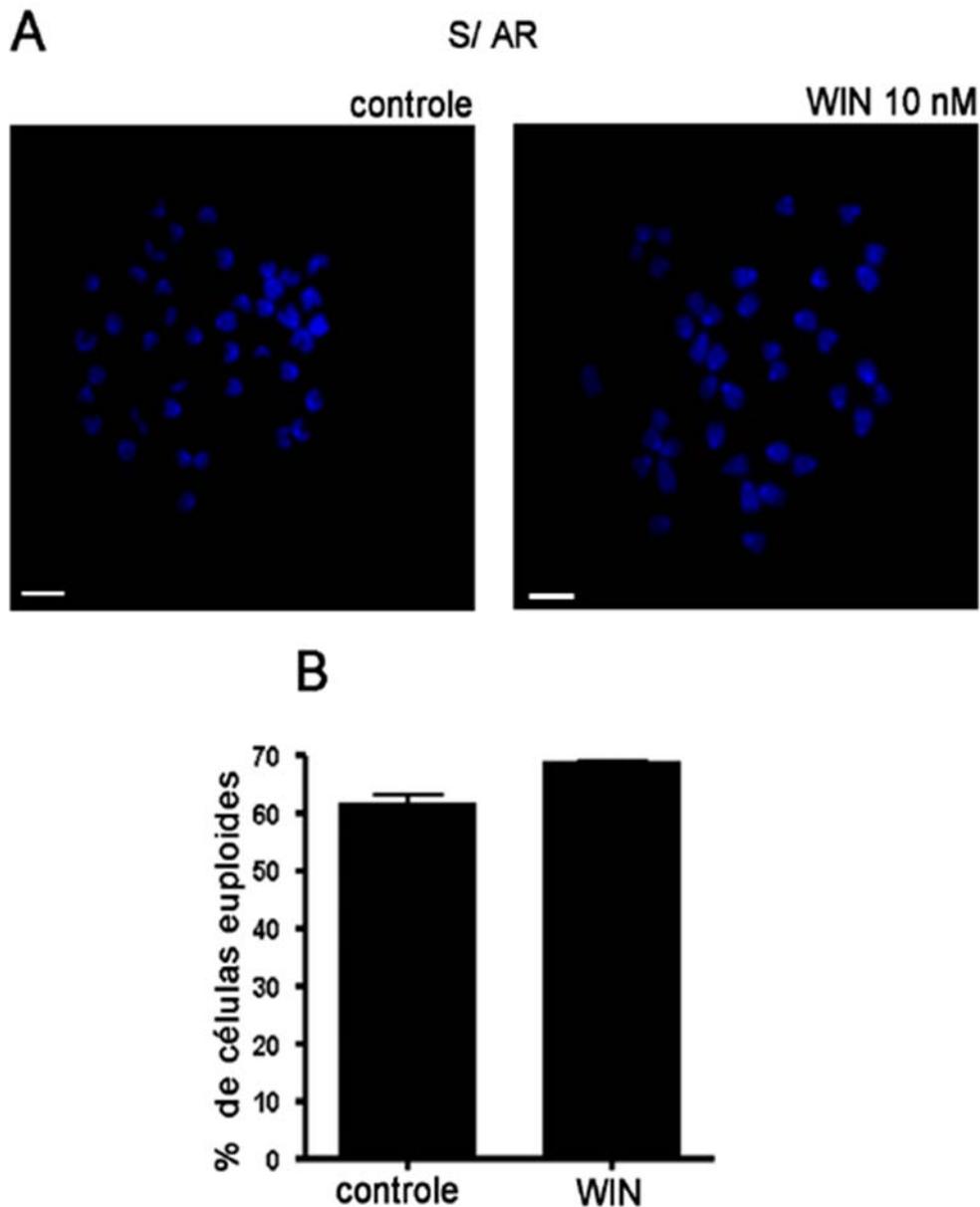


Figura 11: Estabilidade cromossômica. A) *EBs tratados com WIN 55212-2 são capazes de manter o número de cromossomos estáveis:* para gerar EBs, as mES foram plaqueadas por dois dias em uma placa de cultura não aderente. Depois desse período, o grupo controle foi mantido por mais dois dias com 0,02% de etanol (o mesmo usado para diluir o agonista canabinoide WIN 55212-2) (**controle**) ou com 10 nM de WIN 55212-2 (**WIN 10 nM**), ambos na presença de meio condicionado de LIF. Figura demonstrando cromossomos (metáfase) no grupo controle (42 cromossomos) e no tratado com 10 nM de WIN 55212-2 (40 cromossomos). Os cromossomos foram marcados com DAPI. Barra de calibração 10 μ m. B) *Manutenção da estabilidade cromossômica:* gráfico demonstrando a manutenção da estabilidade cromossômica de EBs tratados com 10 nM de WIN 55212-2. As quantificações foram realizadas em dois experimentos distintos. * $P < 0,05$.

4.10 O agonista canabinóide WIN 55212-2 aumenta a migração celular

Para realizar o ensaio de migração celular os EBs, após terem recebido 4 dias de tratamento com AR, seguido de mais 2 dias de tratamento com 10 nM de WIN 55212-2, foram cultivados em meio neurobasal, sobre lamínulas previamente tratadas com laminina e fibronectina. O grupo controle, ao invés de ter sido tratado com WIN 55212-2, recebeu tratamento com 0,02% de etanol (veículo usado para a diluição do WIN 55212-2). Passados 2 dias, os EBs foram fixados e, em seguida, realizada a marcação com DAPI e análise do número total de células que migraram a partir destes EBs.

Nossos dados demonstraram que o grupo que havia sido previamente tratado com 10 nM de WIN 55212-2 apresentou um aumento significativo no número de células que migraram, em relação ao grupo controle (Figura 12 A).

Com o objetivo de verificar se o tratamento com AR, seguido do tratamento com WIN 55212-2 e do ensaio de migração celular, seria capaz de aumentar o número de neurônios formados, foi realizado a técnica de imunocitoquímica sobre essas células.

Para tal, um clássico marcador neuronal, conhecido como β tubulina III (MENEZES, 1994; LEE, 1990), foi utilizado. A quantificação foi realizada através da análise do número total de células que apresentaram marcação (β tubulina III positivas).

Nossos dados demonstraram não haver aumento significativo no número de neurônios formados no grupo previamente tratado com 10 nM de WIN 55212-2, em relação ao controle (Figura 12 B).

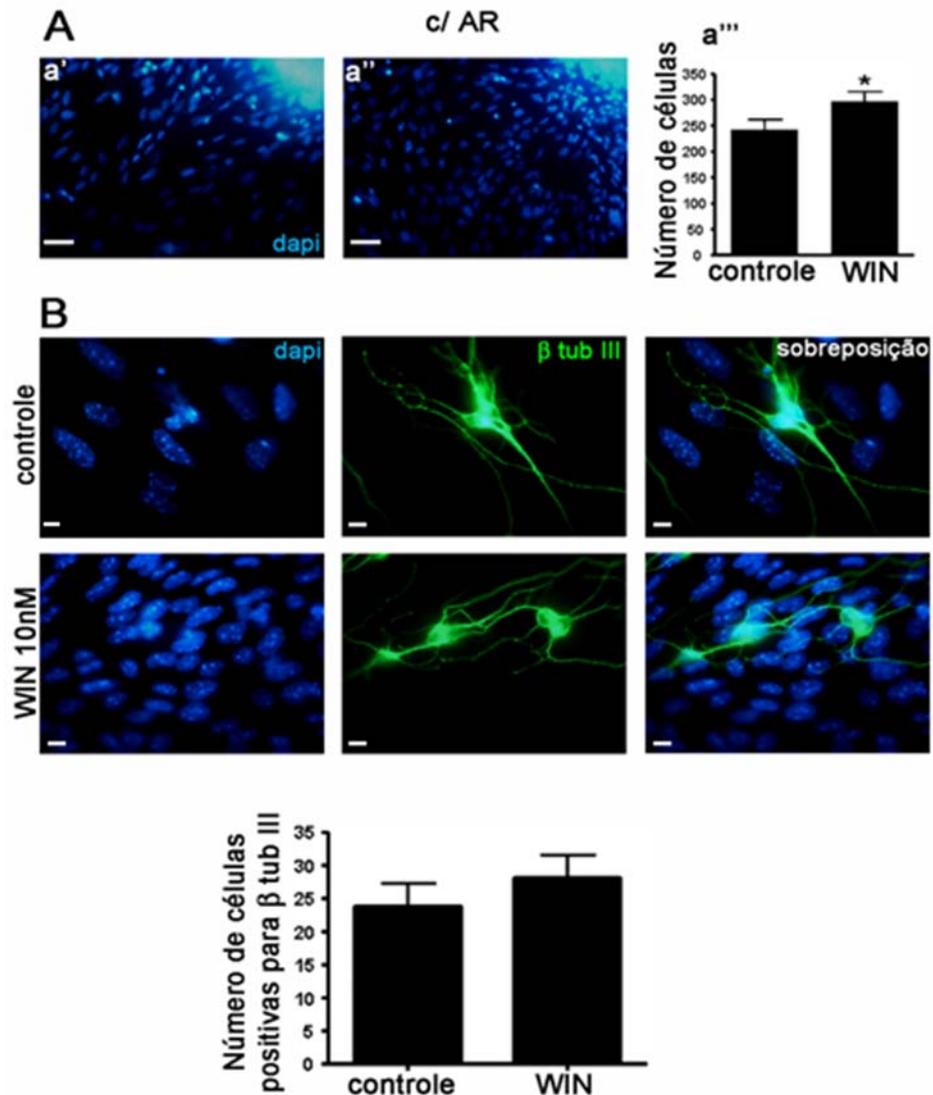


Figura 12: O agonista canabinóide WIN 55212-2 aumenta a migração celular. A) *EBs pré-tratados com WIN 55212-2 apresentam aumento da migração celular:* depois do tratamento com 2 μ M de AR durante 4 dias e mais 2 dias de tratamento com 10 nM de WIN 55212-2, os EBs foram plaqueados em uma placa de cultura previamente tratada com laminina e fibronectina, onde permaneceram por um período de 48 horas. Em seguida, as células foram fixadas e os núcleos foram corados com DAPI (a' e a''). Gráfico apresentando a quantificação da média do número total de células que migraram por área (88,4 mm²) (a'''). Pode ser observado um significativo aumento do número de células que migraram no grupo tratado com 10 nM WIN 55212-2 (WIN) quando comparado com o grupo controle (controle). *P< 0,05. Barra de calibração de 30 μ m. B) *A imunocitoquímica para o marcador neuronal β tubulina III não apresentou diferença significativa do número de neurônios na condição tratada, quando comparada com o controle:* o gráfico apresenta a quantificação do número de células β tubulina III positivas entre o grupo controle (controle) e tratado com 10 nM de WIN 55212-2 (WIN) (% do total). Barra de calibração corresponde a 10 μ m. P>0,05. Todas as quantificações foram realizadas em pelo menos três experimentos distintos.

4.11 Resumo dos resultados

Tabela 1 – Avaliação da ação do agonista canabinóide WIN-55212-2 em células-tronco embrionárias murinas

<i>Análises</i>	<i>EBs</i>	<i>EBs c/ AR</i>	<i>EBs + WIN</i>	<i>EBs c/ AR + WIN</i>
Receptor CB1	+	+		
Receptor CB2	+	-		
Tamanho dos EBs				>
Aumento sobrevivência			+	+
Efeito protetor via CB1			+	+
Efeito protetor via CB2			+	-
Aumento da proliferação			-	-
Número de células euplóides			=	
Migração celular				+
Número de neurônios				=

5 DISCUSSÃO

Vários estudos têm usado fatores de transcrição, como OCT4, SOX2 e NANOG, para marcar células-tronco embrionárias pluripotentes (NICHOLS, 1998; AVILION, 2003; CHAMBERS, 2003; MITSUI, 2003). A presença dos RNAm desses fatores e a marcação positiva para a proteína OCT4 nas culturas de mES realizadas em nosso laboratório comprovaram a confiabilidade da nossa metodologia de cultivo.

De acordo com nossos dados, EBs apresentam tanto receptores CB1, quanto CB2. A presença de ambos os receptores nestas células indica que endocanabinóides possuam função desde o início do desenvolvimento do indivíduo, uma vez que já havia sido anteriormente descrito que a AEA é produzida pela parede uterina e que a produção desse endocanabinóide é extremamente importante para auxiliar na implantação dos embriões no útero (DAS, 1995; PARIA, 1995). Nossos dados também estão de acordo com o trabalho de Jiang e colaboradores (2007) que, recentemente, também demonstraram a presença de receptores CB1 e CB2 em mES.

Os EBs, quando sofreram um processo de diferenciação neuronal, continuaram a expressar CB1. Este resultado está de acordo com dados da literatura, uma vez que existem vários trabalhos demonstrando a presença e a importância desse receptor em células nervosas (MATSUDA, 1990; GERARD, 1991). No entanto, diferentemente de CB1, a expressão de CB2 não foi mais detectada em EBs que sofreram indução neuronal. A não detecção desse receptor nessa condição provavelmente se deve ao fato do mesmo ser encontrado,

principalmente, em células do sistema imunológico (GALIEGUE, 1995). Jiang e colaboradores (2007), além de terem demonstrado a presença do receptor CB2 em mES, também demonstraram que o mesmo permanecia presente quando essas células sofriam um processo de diferenciação para tecidos hematopoéticos. Corroborando nossos resultados, Griffin e colaboradores (1999) sugeriram que o receptor CB2 não está presente em neurônios do SNC de ratos adultos. Shouman e colaboradores (2006), ao avaliar os efeitos protetores da ativação de agonistas canabinóides no cérebro, também não detectaram, pela técnica de PCR em tempo real, a presença desse receptor no neocórtex. Porém, diferentemente dos achados de Griffin, de Shouman e dos nossos próprios achados, Onaivi (2006), afirmou ter encontrado esse receptor (CB2) em neurônios.

Svensson e colaboradores (2006) observaram a presença de receptores CB1 em células embrionárias de carcinoma murino P19 (P19) que sofreram e que não sofreram indução neuronal com AR. Este grupo de pesquisadores, no entanto, não conseguiu observar a presença de receptores CB2, nem nas células que sofreram e nem nas células que não sofreram indução neuronal com AR.

Recentemente foi sugerido que a ativação dos receptores canabinóides em colônias de mES gera um aumento do tamanho das mesmas (JIANG, 2007). Nossos resultados demonstraram que esse aumento também ocorre em EBs que sofreram indução neuronal.

Quando analisamos a proteção celular de EBs que sofreram indução neuronal com AR, podemos observar uma diminuição na morte celular com o uso de concentrações de 10 e 50 nM de WIN 55212-2. Este dado está de acordo com outros trabalhos que já haviam demonstrado a importância da ativação do sistema canabinóide para aumentar a sobrevivência celular (MARSICANO, 2003; MECHOULAM, 2002).

O uso de 100 nM do agonista canabinóide não apresentou efeito protetor. A ausência de efeito nessa concentração pode ter sido gerada por uma dessensibilização dos receptores

(LUK, 2004; JIN, 1999), uma vez que a mesma aparentemente não apresentou efeito tóxico sobre essas células.

Um trabalho que avaliou o efeito dos canabinóides na depressão também demonstrou que diferentes dosagens dessas substâncias podem gerar efeitos diferentes sobre o animal, ou seja, em determinadas concentrações esses canabinóides atuavam como antidepressivos e em concentrações mais elevadas não apresentavam esse efeito (BAMBICO, 2007).

Os canabinóides, conforme demonstrado em experimento *in vivo*, atuam na proteção de células submetidas a estresse, como por exemplo, no caso do AVC levando, inclusive, a um aumento dos receptores CB1 (MECHOULAM, 2002). O AR, além de ser um importante fator para diferenciação de células-tronco, é considerado um grande indutor de apoptose em vários tipos celulares (OKAZAWA, 1996). Provavelmente devido a esse aumento da mortalidade celular causada pelo AR foi observado em nosso trabalho um efeito levemente superior de proteção celular em EBs que sofreram indução neuronal, seguido do tratamento com WIN 55212-2, em relação aos que não sofreram essa indução.

A via de sinalização que está envolvida com o efeito de aumento da sobrevivência celular em progenitores oligodendrocitários, quando realizado o tratamento com canabinóides, é a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) (MOLINA-HOLGADO, 2002). Por esse motivo, embora não tenhamos ainda demonstrado, acreditamos que o aumento da sobrevivência em EBs também ocorre através dessa via de sinalização.

O resultado de avaliação da proliferação de EBs que não sofreram indução neuronal, quando realizada a técnica de imunocitoquímica com o anticorpo fosfo-H3, foi semelhante aos EBs que sofreram essa indução. No entanto, quando realizada a avaliação pela técnica de incorporação de timidina tritiada, parece ter ocorrido uma diminuição no número de células proliferantes.

Corroborando com nossos achados, Blazquez e colaboradores (2006) observaram que a ativação dos receptores canabinóides provocava a diminuição do crescimento, da

proliferação, da angiogênese e de metástases de melanomas de camundongos. Aguado e colaboradores (2007) demonstraram que canabinóides levam a uma inibição da geração de gliomas. No entanto, diferentemente de nossos resultados, Molina-Olgado e colaboradores (2007) mostraram que a ativação do sistema canabinóide é capaz de induzir neurogênese em células-tronco neurais.

Procurando avaliar se o efeito protetor ocorria via receptores CB1 ou CB2, foi utilizado um bloqueador específico de CB1 (AM251). EBs que sofreram indução neuronal com AR, tratados com 10 nM de WIN 55212-2 associado com 300 nM de AM251, reverteram o efeito protetor. Essa reversão já era esperada devido ao fato de não ter sido observada a presença de receptores CB2 nessas células.

No entanto, quando realizado o mesmo tratamento em EBs que não sofreram indução neuronal, pode-se observar uma reversão parcial do efeito, sugerindo, nesse caso, que tanto os receptores CB1, quanto os receptores CB2, ativam vias de sinalização relacionadas com o aumento da sobrevivência dessas células. Molina-Olgado e colaboradores (2002) também sugerem que o efeito de proteção de progenitores oligodendrocitários, proporcionado por agonistas canabinóides, se deve a ativação, tanto de receptores CB1, quanto de receptores CB2.

O efeito protetor contra a morte celular poderia estar relacionado com aumento da instabilidade cromossômica (PETERSON, 2007). Nossos dados, ao contrário, revelaram que a ativação dos receptores canabinóides com 10 nM de WIN 55212-2, além de causar efeito protetor em EBs, apresenta uma tendência a aumentar o número de células euplóides, em relação ao grupo controle. Essa tendência de aumentar a estabilidade cromossômica talvez esteja relacionada com o efeito de diminuição da proliferação celular, devido a possíveis alterações do ciclo celular. No entanto, maiores estudos relacionadas a esta questão ainda terão que ser realizados para que se possa, futuramente, esclarecer melhor essa questão.

Quando realizado o tratamento com AR, seguido do tratamento com 10 nM WIN 55212-2 e, após isto, feito o ensaio de migração celular, pode-se observar uma elevação no número de células que migraram, em relação ao grupo controle. Esses dados sugerem que a ativação dos receptores canabinóides é capaz de promover aumento da sobrevivência celular e, conseqüentemente, gerar um aumento no número total de células que migraram.

No entanto, quando realizada a técnica de imunocitoquímica com o anticorpo β -tubulina III (marcador neuronal) em EBs que também haviam sido previamente tratados com AR, seguido do tratamento com WIN 55212-2 e, após isto, feito o ensaio de migração celular, não foi possível observar aumento no número de neurônios formados. Avaliações de diferenciação para outros tipos celulares, como por exemplo, astrócitos e microglia, não foram realizadas.

Os dados apresentados nesse trabalho indicam que agonistas canabinóides poderão ser utilizados não só para o aumento do número de células em culturas de EBs, como também poderão ser utilizados para eventuais terapias celulares. Como potencial agente terapêutico, os agonistas canabinóides poderiam aumentar o número e/ou a sobrevivência das células a serem transplantadas. Além disso, as células-tronco embrionárias, se transplantadas conjuntamente com substâncias canabinóides, poderiam ter maior facilidade para se integrarem a rede neuronal. Isso poderia implicar em uma melhora clínica e/ou na cura de diversas patologias nervosas, como por exemplo, na Doença de Parkinson e em casos de lesões medulares.

7 CONCLUSÕES

- ✓ A ativação do sistema canabinóide reduz a morte e não aumenta a proliferação celular de EBs que sofreram e dos que não sofreram indução neuronal;
- ✓ O receptor CB1 está relacionado com o efeito de proteção celular nos EBs que sofreram indução neuronal, porém, nos EBs que não sofreram esse processo de diferenciação, tanto o receptor CB1, quanto o CB2, estão relacionados com esse aumento da sobrevivência;
- ✓ O agonista canabinóide WIN-55212-2 diminui a taxa de morte sem aumentar a instabilidade cromossômica;
- ✓ O tratamento com WIN-55212-2 provoca uma elevação no número de células que migraram;
- ✓ O processo de diferenciação neuronal não é alterado quando realizado a ativação do sistema canabinóide.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUADO, T.; ROMERO, E.; MONORY, K.; PALAZUELOS, J.; SENDTNER, M.; MARSICANO, G.; LUTZ, B.; GUZMAN, M.; GALVE-ROPERH, I. The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. **J Biol Chem**, v. 282, n. 33, p.23892-8, Aug, 2007.

AHUJA, Y. R.; VIJAYALAKSHMI, V.; POLASA, K. Stem cell test: a practical tool in toxicogenomics. **Toxicology**, v. 231, n. 1, p.1-10, 2007.

ANTONARAKIS, S. E.; LYLE, R.; DERMITZAKIS, E. T.; REYMOND, A.; DEUTSCH, S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 10, p.725-38, Oct, 2004.

AVILION, A. A.; NICOLIS, S. K.; PEVNY, L. H.; PEREZ, L.; VIVIAN, N.; LOVELL-BADGE, R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. **Genes Dev**, v. 17, n. 1, p.126-40, Jan, 2003.

BAMBICO, F. R.; KATZ, N.; DEBONNEL, G.; GOBBI, G. Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. **J Neurosci**, v. 27, n. 43, p.11700-11, Oct, 2007.

BLAZQUEZ, C.; CARRACEDO, A.; BARRADO, L.; REAL, P. J.; FERNANDEZ-LUNA, J. L.; VELASCO, G.; MALUMBRES, M.; GUZMAN, M. Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. **FASEB J**, v. 20, n. 14, p.2633-5, Dec, 2006.

CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M.; NICHOLS, J.; LEE, S.; TWEEDIE, S.; SMITH, A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, v. 113, n. 5, p.643-55, May, 2003.

CHRISTOU, Y. A.; MOORE, H. D.; SHAW, P. J.; MONK, P. N. Embryonic stem cells and prospects for their use in regenerative medicine approaches to motor neurone disease. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 33, n. 5, p.485-98, Oct, 2007.

COUTTS, M.; KEIRSTEAD H. S. Stem cells for the treatment of spinal cord injury. **Exp Neurol**, Sep, 2007.

DAS, S. K.; PARIA, B. C.; CHAKRABORTY, I.; DEY, S. K. Cannabinoid ligand-receptor signaling in the mouse uterus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 10, p.4332-6, May, 1995.

DRAPER, B. W.; MCCALLUM, C. M.; STOUT, J. L.; SLADE, A. J.; MOENS, C. B. A high-throughput method for identifying N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-induced point mutations in zebrafish. **Methods Cell Biol**, v. 77, p. 91-112, 2004.

ELSHEIKH, M.; DUNGER, D. B.; CONWAY, G. S.; WASS, J. A. Turner's syndrome in adulthood. **Endocr Rev**, v. 23, n. 1, p.120-40, Feb, 2002.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p.154-6, Jul, 1981.

FERNANDEZ-RUIZ, J.; BERRENDERO, F.; HERNANDEZ, M. L.; RAMOS, J. A. The endogenous cannabinoid system and brain development. **Trends Neurosci**, v. 23, n. 1, p.14-20, Jan, 2000.

FRIEL, R.; VAN DER SAR, S.; MEE, P. J. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, n. 13, p.1894-903, Dec, 2005.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, n. 5457, p.1433-8, Feb, 2000.

GALIEGUE, S.; MARY, S.; MARCHAND, J.; DUSSOSSOY, D.; CARRIERE, D.; CARAYON, P.; BOUABOULA, M.; SHIRE, D.; LE FUR, G.; CASELLAS, P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. **Eur J Biochem**, v. 232, n. 1, p.54-61, Aug, 1995.

GELLER, L. N.; POTTER, H. Chromosome missegregation and trisomy 21 mosaicism in Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**, v. 6, n. 3, p.167-79, Jun, 1999.

GERARD, C. M.; MOLLEREAU, C.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. **Biochem J**, v. 279, p.129-34, Oct, 1991.

GOYA, R. L.; KUAN, W. L.; BARKER, R. A. The future of cell therapies in the treatment of Parkinson's disease. **Expert Opin Biol Ther**, v. 7, n. 10, p.1487-98, Oct, 2007.

GRIFFIN, G.; WRAY, E. J.; TAO, Q.; MCALLISTER, S. D.; RORRER, W. K.; AUNG, M. M.; MARTIN, B. R.; ABOOD, M. E. Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. **Eur J Pharmacol**, v. 377, n. 1, p.117-25, Jul, 1999.

HOWLETT, A. C.; BARTH, F.; BONNER, T. I.; CABRAL, G.; CASELLAS, P.; DEVANE W. A.; FELDER, C. C.; HERKENHAM, M.; MACKIE, K.; MARTIN, B. R.; MECHOULAM, R.; PERTWEE, R. G. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacol Rev**, v. 54, n. 2, p.161-202, Jun, 2002.

JACOBS, S.; LIE, D. C.; DECICCO, K. L.; SHI, Y.; DELUCA, L. M.; GAGE, F. H.; EVANS, R. M. Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 10, p.3902-7, Mar, 2006.

JIANG, S.; FU, Y.; WILLIAMS, J.; WOOD, J.; PANDARINATHAN, L.; AVRAHAM, S.; MAKRIYANNIS, A.; AVRAHAM, S.; AVRAHAM, H. K. Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells. **PLoS ONE**, v. 2, n. 7, p.641, 2007.

JIN, W.; BROWN, S.; ROCHE, J. P.; HSIEH, C.; CELVER, J. P.; KOVOOR, A.; CHAVKIN C.; MACKIE, K. Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. **J Neurosci**, v. 19, n. 10, p.3773-80, May, 1999.

JOANNIDES, A. J.; CHANDRAN, S. Human embryonic stem cells: An experimental and therapeutic resource for neurological disease. **J Neurol Sci**, Oct, 2007.

KINGSBURY, M. A.; FRIEDMAN, B.; MCCONNELL, M. J.; REHEN, S. K.; YANG, A. H.; KAUSHAL, D.; CHUN, J. Aneuploid neurons are functionally active and integrated into brain circuitry. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 17, p.6143-7. Apr, 2005.

LEE, M. K.; REBHUN, L. I.; FRANKFURTER, A. Posttranslational modification of class III beta-tubulin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87, n.18, p.7195-9, Sep, 1990

LENGAUER, C.; ISSA, J. P. The role of epigenetics in cancer. DNA Methylation, Imprinting and the Epigenetics of Cancer--an American Association for Cancer Research. **Mol Med Today**, v. 4, n. 3, p.102-3, Mar, 1998.

LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instability in colorectal cancers. **Nature**, v. 386, n. 6625, p.623-7, Apr, 1997.

LILLEY, C. E.; CARSON, C. T.; MUOTRI, A. R.; GAGE, F. H.; WEITZMAN, M. D. DNA repair proteins affect the lifecycle of herpes simplex virus 1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 16, p.5844-9, Apr 19, 2005.

LONGO, L.; BYGRAVE, A.; GROSVELD, F. G.; PANDOLFI, P. P. The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. **Transgenic Res**, v. 6, n. 5, p.321-8, Sep, 1997.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, v. 193, p.265-275, 1951.

LUK, T.; JIN, W.; ZVONOK, A.; LU, D.; LIN, X. Z.; CHAVKIN, C.; MAKRIYANNIS, A.; MACKIE, K. Identification of a potent and highly efficacious, yet slowly desensitizing CB1 cannabinoid receptor agonist. **Br J Pharmacol**, v. 142, n. 3, p.495-500, Jun, 2004.

MADEN, M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 10, p.755-65, Oct, 2007.

MARK, M.; GHYSELINCK, N. B.; CHAMBON, P. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 46, p.451-80, 2006.

MARSICANO, G.; GOODENOUGH, S.; MONORY, K.; HERMANN, H.; EDER, M.; CANNICH, A.; AZAD, S. C.; CASCIO, M. G.; GUTIERREZ, S. O.; VAN DER STELT, M.; LOPEZ-RODRIGUEZ, M. L.; CASANOVA, E.; SCHUTZ, G.; ZIEGLGANSBERGER, W.; DI MARZO, V.; BEHL, C.; LUTZ, B. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. **Science**, v. 302, n. 5642, p.84-8, Oct, 2003.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J.; YOUNG, A. C.; BONNER, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p.561-4, Aug, 1990.

MECHOULAM, R.; PANIKASHVILI, D.; SHOHAMI, E. Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. **Trends Mol Med**, v. 8, n. 2, p.58-61, Feb, 2002.

MENEZES, J. R.; LUSKIN, M. B. Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. **J Neurosci**, v. 14, n. 9, p.5399-416, Sep, 1994.

MING-TANG, L.; YONG, J.; SHUM-MEI, W.; YONG-MINGL, L.; FANG, W.; XIA, C.; HONG, Y.; TONG-HOI, M. cDNA Cloning, Prokaryotic and Eukaryotic Expression and Characterization of Porcine Leukemia Inhibitory Factor. **Chem. Res. Chinese**, v. 22, 145-149, 2006.

MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H.; SEGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI K.; MARUYAMA, M.; MAEDA, M.; YAMANAKA, S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**, v. 113, n. 5, p.631-42, May, 2003.

MOLINA-HOLGADO, F.; RUBIO-ARAIZ, A.; GARCIA-OVEJERO, D.; WILLIAMS, R. J.; MOORE, J. D.; AREVALO-MARTIN, A.; GOMEZ-TORRES, O.; MOLINA-HOLGADO, E. CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. **Eua J Neurosci** v. 25, p.629-634, 2007.

MOLINA-HOLGADO, E.; VELA, J. M.; AREVALO-MARTIN, A.; ALMAZAN, G.; MOLINA-HOLGADO, F.; BORRELL, J.; GUAZA, C. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. **J Neurosci**, v. 22, p.9742-9753, 2002.

MOTULSKY, H. **Instuitive biostatístics**. New york, Oxford University Press, 1995.

NICHOLS, J.; ZEVNIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; NIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBERS, I.; SCHOLER, H.; SMITH, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**, v. 95, n. 3, p.379-91, Oct, 1998.

OKAZAWA, H.; SHIMIZU, J.; KAMEI, M.; IMAFUKU, I.; HAMADA, H.; KANAZAWA I. Bcl-2 inhibits retinoic acid-induced apoptosis during the neural differentiation of embryonal stem cells. **J Cell Biol**, v. 132, n. 5, p.955-68, Mar, 1996.

ONAIWI, E. S. Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. **Neuropsychobiology**, v. 54, n. 4, p.231-46, 2006.

OREN, T.; SHER, J. A.; EVANS, T. Hematopoiesis and retinoids: development and disease. **Leuk Lymphoma**, v. 44, n. 11, p.1881-91, Nov, 2003.

PARIA, B. C.; DAS, S. K.; DEY, S. K. The preimplantation mouse embryo is a target for cannabinoid ligand-receptor signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 21, p.9460-4, Oct, 1995.

PERA, M. F. Unnatural selection of cultured human ES cells? **Nat Biotechnol**, v. 22, n. 1, p.42-3, Jan, 2004.

PETERSON S. E., YANG A. H., WESTRA J. W., YUNG Y. C., MUTOH T, REHEN S. K., CHUN J. E. Non-uniform changes in mosaic aneuploidies of the developing cortex following caspase inhibition. Society for Neuroscience. Disponível em: http://www.sfn.org/am2007/index.cfm?pagename=call_for_abstracts. Acesso em janeiro de 2008.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 11, p.873-84, Nov, 2003.

POUTON, C. W.; HAYNES, J. M. Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, n. 13, p.1918-34, Dec, 2005.

RAJAGOPALAN, H.; LENGAUER, C. Aneuploidy and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p.338-41, Nov, 2004.

RASNICK, D.; DUESBERG, P. H. How aneuploidy affects metabolic control and causes cancer. **Biochem J**, v. 340, p.621-30, Jun, 1999.

REHEN, S. K.; YUNG, Y. C.; MCCREIGHT, M. P.; KAUSHAL, D.; YANG, A. H.; ALMEIDA, B. S.; KINGSBURY, M. A.; CABRAL, K. M.; MCCONNELL, M. J.; ANLIKER, B.; FONTANOZ, M.; CHUN, J. Constitutional aneuploidy in the normal human brain. **J Neurosci**, v. 25, n. 9, p.2176-80, Mar, 2005.

REHEN, S. K.; MCCONNELL, M. J.; KAUSHAL, D.; KINGSBURY, M. A.; YANG, A. H.; CHUN, J. Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 23, p.13361-6, 2001.

ROUBERTOUX, P. L.; KERDELHUE, B. Trisomy 21: from chromosomes to mental retardation. **Behav Genet**, v. 36, n. 3, p.346-54, May, 2006.

SHOUMAN, B.; FONTAINE, R. H.; BAUD, O.; SCHWENDIMANN, L.; KELLER, M.; SPEDDING, M.; LELIEVRE, V.; GRESSENS, P. Endocannabinoids potently protect the newborn brain against AMPA-kainate receptor-mediated excitotoxic damage. **Br J Pharmacol**, v. 148, n. 4, p.442-51, Jun, 2006.

SMITH, A. G.; HOOPER, M. L. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. **Dev Biol**, v. 121, n. 1, p.1-9, May, 1987.

SOLTER D.; SKREB, N.; DAMJANOV, I. Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. **Nature**, v. 227, n. 5257, p.503-4, Aug, 1970.

SOPRANO, D. R.; TEETS, B. W.; SOPRANO, K. J. Role of retinoic Acid in the differentiation of embryonal carcinoma and embryonic stem cells. **Vitam Horm**, v. 75, p.69-95, 2007.

Stevens, L. C. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. **Dev Biol**, v. 21, n. 3, p.364-82, Mar, 1970.

SUKOYAN, M. A.; KERKIS, A. Y.; MELLO, M. R.; KERKIS, I. E.; VISINTIN, J. A.; PEREIRA, L. V. Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 5, p.535-42, May, 2002.

SVENSSON, A. C.; JOHANSSON, M.; PERSSON, E.; CARCHENILLA, M. S.; JACOBSSON, S. O. Expression of functional CB1 cannabinoid receptors in retinoic acid-differentiated P19 embryonal carcinoma cells. **J Neurosci Res**, v. 83, n. 6, p.1128-40, May, 2006.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, p.861-872, 2007.

THOMSON, H. Bioprocessing of embryonic stem cells for drug discovery. **Trends Biotechnol**, v. 25, n. 5, p.224-30, May, 2007.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p.1145-7, Nov, 1998.

VORSANOVA, S. G.; KOLOTIL, A. D.; IOUROV, I. Y.; MONAKHOV, V. V.; KIRILLOVA, E. A.; SOLOVIEV, I. V.; YUROV, Y. B. Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis. **J Histochem Cytochem**, v. 53, n. 3, p.375-80, Mar, 2005.

WATSON, S. J.; BENSON, J. A.; JOY, J. E. Marijuana and medicine: assessing the science base: a summary of the 1999 Institute of Medicine report. **Arch Gen Psychiatry**, v. 57, n. 6, p.547-52, Jun, 2000.

WATT, F. M.; HOGAN B. L. Out of Eden: stem cells and their niches. **Science**, v. 287, n. 5457, p.1427-30, Feb, 2000.

YU J.; VODYANIK, M. A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE J. L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G. A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, I. I.; THOMSON, J. A. Induced of pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, v. 318, p.1879-80, 2007.

ZHOU, Q. J.; SHAO, J. Z.; XIANG, L. X.; HU, R. Z.; LU, Y. L.; YAO, H.; DAI, L. C. Generation of embryoid bodies from mouse embryonic stem cells cultured on STO feeder cells. **Cell Biol Int**, v. 29, n. 9, p.817-25, Sep, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)