Avaliação da neurotoxicidade de fitocanabinoides e canabinoides sintéticos em células SH-SY5Y diferenciadas

Bruna Macedo [1], Evguenia Bekman [2,3,4], Diana Carrasqueira [5]

[1] Mestrado em Tecnologias Laboratoriais em Ciências Forenses, Egas Moniz School of Health & Science, Campus Universitário, Quinta da Granja, Monte de Caparica, 2829-511 Caparica, Almada, Portugal
[2] iBB - Institute for Bioengineering and Biosciences and Department of Bioengineering, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal
[3] Associate Laboratory i4HB – Institute for Health and Bioeconomy, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal
[4] The Egas Moniz Center for Interdisciplinary Research, Egas Moniz School of Health & Science, Campus Universitário, Quinta da Granja, Monte de Caparica, 2829-511 Caparica, Almada, Portugal
[5] Proliferation and Fate Regulation of Stem Cells, NOVA Medical School, Universidade NOVA de Lisboa, Campo dos Mártires da Pátria, 130, 1169-056 Lisboa, Portugal

Introdução

Novas substâncias psicoativas

"[...] substâncias de abuso, isoladas ou em preparações, que não estão sujeitas ao controlo das Convenções internacionais de 1961 e 1971, mas que podem constituir uma ameaça para a saúde pública." (UNODC, 2024).

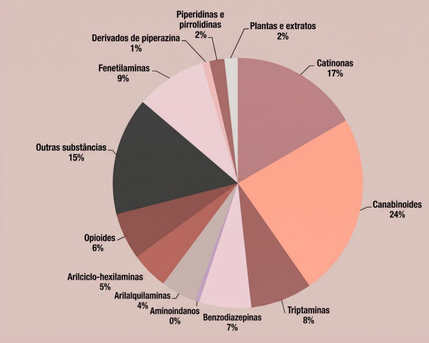


Figura 1 – Distribuição das classes de NSP reportadas em 2024. Adaptado de EUDA, 2026.

Canabinoides

Endocanabinoides

Produzidos pelo organismo, atuam no sistema endocanabinoide, regulando diversas funções fisiológicas (Gorzo et al., 2022).

Fitocanabinoides

Origem natural, produzidos pelas **plantas**, principalmente pela *Cannabis sativa* (Blebea et al., 2024).

Sintéticos

Produzidos por **síntese química**, mimetizam a atividade dos canabinoides naturais (Roque-Bravo et al., 2023).

Os canabinoides sintéticos podem apresentar maior potência farmacológica e efeitos mais imprevisíveis do que os naturais (Roque-Bravo et al., 2023).

Linha celular SH-SY5Y

Linha celular humana derivada de neuroblastoma, amplamente utilizada como modelo *in vitro* em estudos de neurobiologia (Lopez-Suarez et al., 2022; Shipley et al., 2016).

Fenótipo N

Morfologia neuronal, prolongamentos longos e ramificados, características de diferenciação neuronal (Bell et al., 2013).

Fenótipo S

Morfologia achatada e alongada, ↑ adesão ao substrato e características semelhantes a células estromais (Bell et al., 2013).

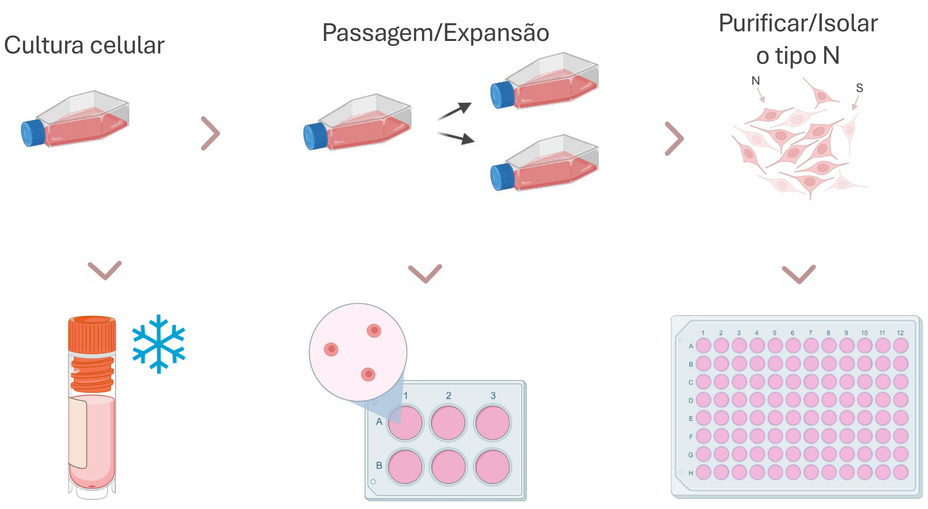
Objetivos

1. Estabelecer e caracterizar um protocolo de diferenciação neuronal em 2D das células SH-SY5Y, através da análise morfológica, da imunofluorescência e da expressão génica de marcadores neuronais.
2. Avaliar os efeitos da exposição das células SH-SY5Y diferenciadas a cinco canabinoides (THC, CBD, THJ-018, EG-018 e SGT-151), avaliando o impacto na viabilidade e integridade celular, morfologia neuronal e expressão génica, de modo a comparar as respostas em função da origem dos compostos.

Metodologia

2 Ensaios preliminares em células indiferenciadas

Cultura celular → Passagem/Expansão → Purificar/Isolar o tipo N



Congelar

Otimização da densidade de plaqueamento para a diferenciação

Testar os veículos e o canabinóide mais forte em células indiferenciadas

1 Estabelecimento e caracterização de um protocolo de diferenciação

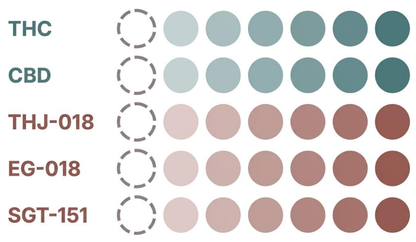
SH-SY5Y indiferenciadas → Fatores de diferenciação → SH-SY5Y diferenciadas → RT-qPCR após extração de RNA → Imunofluorescência



Permite avaliar alterações na expressão génica

Permite confirmar a expressão e localização de proteínas

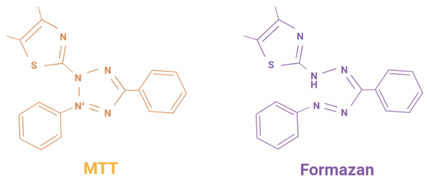
3 Exposição aos canabinoides



Diferentes concentrações e tempos de exposição → 3 replicados biológicos

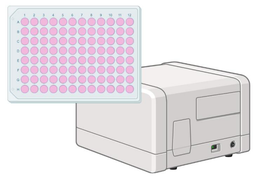
4 Avaliação dos efeitos

MTT (viabilidade celular)



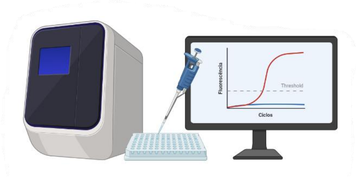
Células metabolicamente ativas reduzem o MTT em Formazan - constitui indicadores indiretos da atividade e do estado celular

LDH (integridade da membrana)



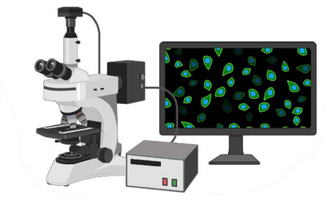
Quando ocorre dano na membrana celular a LDH é libertada

RT-qPCR após extração de RNA



(MAP2 (microtúbulos), TUBB3, Nestina, GFAP, MKI67)

Imunofluorescência



Marcadores: MAP2 e β-III-tubulina
Morfometria do comprimento e número de neurites
Análise de Sholl | Puncta pré-sinápticos

→ Análise estatística

Resultados esperados

Ensaios preliminares

Banco de células estabelecido e condições experimentais selecionadas

Diferenciação

Aquisição de características neuronais

Exposição aos canabinoides e avaliação dos efeitos

Espera-se que a exposição aos canabinoides induza alterações dependentes da concentração e do tempo de tratamento na viabilidade, na morfologia neuronal e na expressão génica, com perfis distintos entre fitocanabinoides e sintéticos

Conclusão

Estabelecimento de um **protocolo de diferenciação mais fisiológico e fiável**

Contribuição para um **melhor conhecimento da neurotoxicidade** destes canabinoides

Comparação dos efeitos em células indiferenciadas e em diferenciadas, ressaltando a importância do processo de diferenciação dando confiança a estudos preliminares *in vitro*.

Referências

Bell, N., Hann, V., Redfern, C. P. F., & Cheek, T. R. (2013). Store-operated Ca2+ entry in proliferating and retinoic acid-differentiated N- and S-type neuroblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1833*(3), 643–651. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.11.025

Blebea, N. M., Pricopie, A. I., Vlad, R. A., & Hancu, G. (2024). Phytocannabinoids: Exploring Pharmacological Profiles and Their Impact on Therapeutical Use. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Number 8). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/ijms25084204

EUDA. (2026). *New psychoactive substances-the current situation in Europe (European Drug Report 2026)*.

Gorzo, A., Havași, A., Spînu, Ștefan, Oprea, A., Burz, C., & Sur, D. (2022). Practical Considerations for the Use of Cannabis in Cancer Pain Management—What a Medical Oncologist Should Know. *Journal of Clinical Medicine*, *11*(17), 5036. https://doi.org/10.3390/jcm11175036

Lopez-Suarez, L., Awabdh, S. Al, Coumoul, X., & Chauvet, C. (2022). The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants. *NeuroToxicology*, *92*, 131–155. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.07.008

Roque-Bravo, R., Silva, R. S., Malheiro, R. F., Carmo, H., Carvalho, F., da Silva, D. D., & Silva, J. P. (2023). Synthetic Cannabinoids: A Pharmacological and Toxicological Overview. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *63*(1), 187–209. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-031122-113758

Shipley, M. M., Mangold, C. A., & Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Journal of Visualized Experiments*, (108). https://doi.org/10.3791/53193

UNODC. (2024). *The challenge of New Psychoactive Substances: A Technical Update 2024*.