



**CAPTAR**

ciência e ambiente para todos

**CAPÍTULO ESPECIAL • IV Encontro Nacional  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
Universidade de Aveiro**

volume 6 • número 1 • p 7 – 9

## RESUMO ALARGADO

### **Efeito do endocanabinóide 2-araquidonilglicerol na placenta humana: alterações do estado oxidativo dos citotrofoblastos**

O desenvolvimento da placenta envolve processos de proliferação, diferenciação e apoptose das células placentárias denominadas trofoblastos. Os endocanabinóides (eCBs) são mediadores lipídicos endógenos que, tal como o THC (principal componente psicoativo da *Cannabis sativa*), são agonistas dos recetores canabinóides (CB1 e CB2). A anandamida (AEA) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG) são os eCBs melhor caracterizados e juntamente com os recetores canabinóides e as enzimas de síntese e degradação dos eCBs constituem o sistema endocanabinóide (1). Estudos recentes revelaram que os eCBs estão envolvidos em diversos processos fisiológicos, incluindo a reprodução (2).

Em trabalhos anteriores, o nosso grupo demonstrou que os citotrofoblastos possuem as enzimas necessárias ao metabolismo do 2-AG e que este eCB induz uma diminuição da viabilidade das células BeWo (linha celular de coriocarcinoma humano) (3), e impede a diferenciação dos citotrofoblastos (4). Verificou-se ainda que os eCBs interferem com a viabilidade das células decíduais uterinas através da ativação do recetor CB1 e aumento dos níveis intracelulares de ceramida (5-7). Para além disso, a AEA induz alterações ao nível do perfil fosfolipídico das membranas (8). Tais evidências suportam o papel do sistema endocanabinóide durante o período de decidualização e desenvolvimento placentário.

Dado que pouco se sabe sobre o efeito do 2-AG na remodelação placentária, este trabalho visou estudar os efeitos deste eCB em citotrofoblastos humanos. Os citotrofoblastos foram isolados a partir de

Costa LF<sup>1,3•</sup>

Costa MA<sup>3</sup>

Fonseca BM<sup>3</sup>

Pereira MJ<sup>2</sup>

Teixeira NA<sup>3</sup>

Correia-da-Silva G<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Portugal

<sup>2</sup>Departamento de Biologia & CESAM, Universidade de Aveiro, Portugal

<sup>3</sup>UCIBIO, REQUIMTE, Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal

• liacosta@ua.pt

ISSN 1647-323X

placentas de termo (38 a 40 semanas de gestação) provenientes de uma gravidez normal de mulheres residentes na área do Porto, com idades compreendidas entre os 24 e os 36 anos (n=5). Após 12 horas de adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações de 2-AG (1-50  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Em alguns ensaios, procedeu-se ao tratamento prévio das células com AM251 e AM630, antagonistas dos recetores CB1 e CB2, respetivamente. O efeito do 2-AG na viabilidade celular foi avaliado por ensaios de redução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) e a citólise pela libertação da enzima lactato desidrogenase (LDH); a formação de espécies reativas de oxigénio/azoto (ROS/RNS) e alterações no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi\text{m}$ ) foram avaliados por fluorimetria; a morfologia celular foi analisada pelas colorações de H $\ddot{o}$ chst, Giemsa e microscopia de contraste de fase.

O tratamento das culturas primárias com 2-AG, em concentrações até 20  $\mu\text{M}$  não teve efeitos na viabilidade celular mas resultou num aumento de ROS/RNS (aproximadamente 40%) e diminuição do potencial de membrana mitocondrial (em cerca de 40%), efeito que parece ser parcialmente revertido pela adição dos antagonistas dos recetores CB1 e CB2. Em concentrações mais elevadas verificou-se uma perda de viabilidade, acompanhada por libertação de LDH, o que sugere morte por necrose celular, resultados suportados pela análise morfológica (Figura 1).

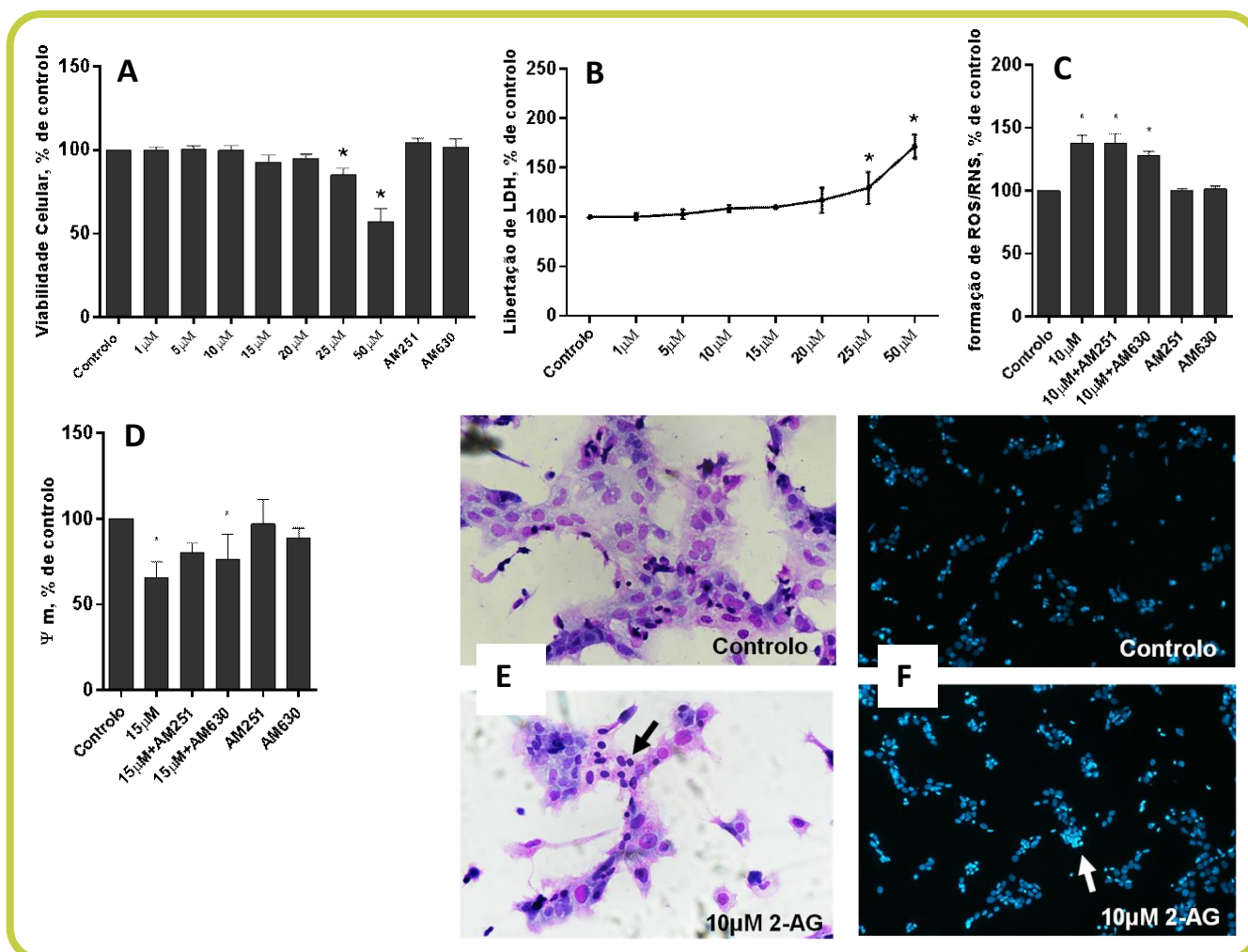


FIGURA 1: Efeito do 2-AG em culturas primárias de hCT: (A) Viabilidade celular pelo ensaio de MTT; (B) Libertação de LDH; (C) Formação ROS/RNS; (D) Potencial de membrana mitocondrial; (E) Coloração de Giemsa; (F) Coloração de H $\ddot{o}$ chst. Análise estatística efetuada através do GraphPad, Two-way ANOVA, seguido de Tukey test (\*  $p < 0,05$  vs controlo).

A desregulação do sistema endocanabinóide pode implicar alterações no estado oxidativo dos citotrofoblastos. Além disso, e uma vez que a placenta se desenvolve num estado de hipoxia, estas alterações poderão contribuir para os mecanismos patofisiológicos de algumas complicações na gravidez. Assim, o estudo do efeito dos endocanabinóides na interface materno-fetal pode ser relevante para a compreensão dos mecanismos subjacentes a algumas patologias da gravidez.



**PALAVRAS-CHAVE:** 2-araquidonilglicerol, endocanabinóides, placenta humana, citotrofoblastos, stress oxidativo

---

**agradecimentos** • Fundação para a Ciência e Tecnologia pelas bolsas de Costa M.A. (SFRH/BD/70721/2010) e Fonseca B.M. (SFRH/BPD/72958/2010); Dra Alexandrina Mendes, Centro Materno-Infantil do Norte - Centro Hospitalar do Porto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. De Petrocellis L, Di Marzo V (2009). An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 23(1):1-15.
2. Rapino C, Battista N, Bari M, Maccarrone M (2014). Endocannabinoids as biomarkers of human reproduction. *Human reproduction update*, 20(4):501-16.
3. Costa MA, Fonseca BM, Keating E, Teixeira NA, Correia-da-Silva G, (2014). 2-arachidonoylglycerol effects in cytotrophoblasts: metabolic enzymes expression and apoptosis in BeWo cells. *Reproduction*, 147(3):301-11.
4. Costa MA, Keating E, Fonseca BM, Teixeira NA, Correia-da-Silva G (2015). 2-Arachidonoylglycerol impairs human cytotrophoblast cells syncytialization: influence of endocannabinoid signalling in placental development. *Molecular and cellular endocrinology*, 399:386-94.
5. Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Taylor AH, Lam PM, Marczylo TH, Konje JC, Teixeira NA (2012). Characterisation of the endocannabinoid system in rat haemochorial placenta. *Reproductive toxicology*, 34(3):347-56.
6. Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Taylor AH, Lam PM, Marczylo TH, Konje JC, Bell SC, Teixeira NA (2010). N-acylethanolamine levels and expression of their metabolizing enzymes during pregnancy. *Endocrinology*, 151(8):3965-74.
7. Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Teixeira NA (2013). The endocannabinoid anandamide induces apoptosis of rat decidual cells through a mechanism involving ceramide synthesis and p38 MAPK activation. *Apoptosis*, 18(12):1526-35.
8. Almada M, Domingues MR, Doria ML, Fonseca BM, Teixeira NA, Correia-da-Silva G. (2015). Lipidomic approach towards deciphering anandamide effects in rat decidual cell. *Journal of cellular physiology*, 230(7):1549-57.