

VANESSA KAPPEL DA SILVA

**ALTERAÇÕES NAS PROTEÍNAS DE FISSÃO E FUSÃO
MITOCONDRIAIS, CASPASE 3 E SINAPTOFISINA CEREBRAIS
INDUZIDAS PELA SOBRECARGA DE FERRO NEONATAL:
REVERSÃO PELO TRATAMENTO COM CANABIDIOL**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nadja Schröder

VANESSA KAPPEL DA SILVA

**ALTERAÇÕES NAS PROTEÍNAS DE FISSÃO E FUSÃO MITOCONDRIAIS,
CASPASE 3 E SINAPTOFISINA CEREBRAIS INDUZIDAS PELA SOBRECARGA
DE FERRO NEONATAL: REVERSÃO PELO TRATAMENTO COM CANABIDIOL**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociência da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nadja Schröder

Porto Alegre

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo amor, apoio, incentivo e compreensão durante essa trajetória e principalmente pelas sábias palavras de conforto nos momentos mais difíceis. Obrigada por entenderem os meus momentos de dúvida, insegurança e fazerem de tudo para que eu nunca perdesse o foco nos meus objetivos. Com certeza, sem esse amparo eu não estaria concluindo mais essa etapa.

Agradeço à minha orientadora, Nadja Schröder, por ter apostado em mim e me concedido a oportunidade de desenvolver esse trabalho, além de todo auxílio e paciência dispensados durante esse período. Obrigada pelos bons conselhos e pelo amadurecimento profissional proporcionado.

Agradeço aos meus grandes amigos por todo o carinho e incentivo, não me deixando nunca duvidar da minha capacidade. Muito obrigada por entenderem os momentos de estresse, de angústia e de nervosismo, por não me deixarem perder o bom humor nessas situações e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Agradeço aos colegas de laboratório por todos os ensinamentos e ajuda proporcionada durante o desenvolvimento dos experimentos.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) pelo apoio científico e financeiro.

Agradeço, enfim, a todos que de alguma forma auxiliaram e contribuíram com esse trabalho.

RESUMO

O acúmulo de ferro no cérebro tem sido observado tanto no envelhecimento normal quanto em muitas doenças neurodegenerativas. Previamente, mostramos que a sobrecarga de ferro no cérebro resulta em déficits de memória persistentes, acompanhados por estresse oxidativo. Devido à elevada taxa metabólica do sistema nervoso, as mitocôndrias estão presentes em grande número em células nervosas. Tem sido demonstrado que, por meio da fissão e fusão, essas organelas promovem alterações na sua estrutura e essa dinâmica pode afetar a função mitocondrial e vice-versa. Déficits no fornecimento de energia para as sinapses têm sido associados a doenças neurodegenerativas e com a redução da funcionalidade de circuitos neurais essas células podem ativar cascatas de morte neuronal. No presente trabalho, foram analisados os efeitos do tratamento do ferro neonatal sobre os seguintes alvos: proteína 1 semelhante à dinamina (DNM1L) e proteína atrófica óptica 1 (OPA1), envolvidas na regulação de fissão e de fusão mitocondrial, respectivamente; caspase 3, uma protease essencial da fase efetora da apoptose; e sinaptofisina, um marcador sináptico. Além disso, nós investigamos os efeitos do canabidiol (CBD), principal componente não psicotrópico da *Cannabis sativa*, já mostrado capaz de melhorar a memória de ratos tratados com ferro, na reversão dos efeitos induzidos pelo ferro sobre as proteínas DNM1L, OPA1, caspase 3 e sinaptofisina. Ratos machos receberam veículo ou ferro carbonila (30mg/kg) do 12º ao 14º dia pós-natal. Na idade adulta, foram tratados com veículo ou CBD (10mg/kg) durante 14 dias. Os níveis proteicos e a expressão gênica no hipocampo e córtex foram quantificados através de Western blotting e RT-qPCR, respectivamente. A quantificação das proteínas foi realizada através da medida das densidades das bandas individuais, normalizadas pela densidade de β -actina. Para o RT-qPCR, as amostras foram normalizadas para 3 genes de referência (*GAPDH*, *HPRT1* e *RPL13A*). Os resultados da análise protéica indicaram que o tratamento com ferro no período neonatal induziu redução de DNM1L no hipocampo e OPA1 no córtex. O ferro também aumentou os níveis de caspase 3 tanto no hipocampo quanto no córtex, acompanhado por redução dos níveis de sinaptofisina no hipocampo. O CBD reverteu os efeitos induzidos pelo ferro, trazendo os níveis hipocampais de DNM1L, caspase 3 e sinaptofisina de volta aos valores comparáveis ao grupo controle. Os resultados sugerem que o ferro pode afetar a dinâmica mitocondrial, possivelmente desencadeando perda sináptica e morte celular por apoptose. A reversão desses efeitos pelo CBD indica o seu potencial efeito neuroprotetor.

Palavras-chave: Ferro, mitocôndrias, apoptose, doenças neurodegenerativas, canabidiol.

ABSTRACT

Iron accumulation in the brain has been observed in both normal aging and in several neurodegenerative diseases. We have previously shown that brain iron loading results in persistent memory deficits, which are accompanied by oxidative stress. Due to the high metabolic rate of the nervous system, mitochondria are present in large numbers in nerve cells. It has been demonstrated that through fission and fusion of mitochondria, these organelles promote changes in their structure and this dynamic can affect mitochondrial function and vice-versa. Deficits in supplying energy to the synapses have been linked to neurodegenerative diseases and once the functionality of neural circuits is reduced, these cells may activate neuronal death cascades. Here, we analyzed the effects of neonatally iron treatment on the following targets: Dynamin-1-like protein (DNM1L) and Optic atrophy 1 (OPA1), proteins involved in regulating mitochondrial fission and fusion, respectively; Caspase 3, a key protease of the effector phase of apoptosis; and Synaptophysin, as a synaptic marker. Additionally, we investigated the effects of Cannabidiol (CBD), the main non-psychoactive component of *Cannabis sativa*, previously shown to improve memory in iron-treated rats, in reversing iron-induced effects on DNM1L, OPA1, caspase 3, and synaptophysin. Male rats received vehicle or iron carbonyl (30mg/kg) at postnatal days 12-14. At adulthood, they were treated with vehicle or CBD (10 mg/kg) for 14 days. Hippocampal and cortical protein levels and gene expression were quantified using western blotting analysis and RT-qPCR, respectively. Quantitative measurements of proteins were made using densities of individual proteins, normalized to the density of β -actin. On RT-qPCR, samples were normalized to three reference genes (*GAPDH*, *HPRT1* and *RPL13A*). Western blotting results indicated that neonatal iron treatment induced a significant reduction of DNM1L in the hippocampus and OPA1 in the cortex. Iron was also shown to increase caspase 3 both in the hippocampus and cortex, which was accompanied by a significant reduction of synaptophysin levels in the hippocampus. CBD reversed iron-induced effects, bringing hippocampal DNM1L, caspase 3 and synaptophysin levels back to values comparable to the control group. The present results suggest that iron may affect mitochondrial dynamics, possibly triggering synaptic loss and apoptotic cell death. The reversion of these effects by CBD, indicates its potential neuroprotective effect.

Keywords: Iron, mitochondria, apoptosis, neurodegenerative disorders, cannabidiol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT1A - Receptor de 5-hidroxitriptamina (serotonina) 1A (sigla do inglês *5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A*)

AMP - Adenosina monofosfato (sigla do inglês *Adenosine monophosphate*)

AMPC - Adenosina monofosfato cíclico (sigla do inglês *Cyclic adenosine monophosphate*)

APAF1 - Fator 1 de ativação da protease apoptótica (sigla do inglês *Apoptotic protease activating factor-1*)

Aβ - Beta amilóide (sigla do inglês *Amyloid beta*)

ATP - Trifosfato de adenosina (sigla do inglês *Adenosine triphosphate*)

BAD - Agonista de morte celular da família Bcl-2 (sigla do inglês *Bcl-2-associated agonist of cell death*)

BAK - Proteína de morte antagonista homóloga a Bcl-2 (sigla do inglês *Bcl-2 homologous antagonist/killer*)

BAX - Proteína X da família Bcl-2 (sigla do inglês *Bcl-2-associated X protein*)

Bcl-2 - Linfoma de células Bcl- 2 (sigla do inglês *B cell lymphoma- 2*)

Bcl-XL - Linfoma de células B extra grande (sigla do inglês *B-cell lymphoma-extra large*)

CB1 - Receptor canabinóide tipo 1 (sigla do inglês *Cannabinoid receptor 1*)

CB2 - Receptor canabinóide tipo 2 (sigla do inglês *Cannabinoid receptor 2*)

CBD - Canabidiol

CD95L – Ligante do Receptor de Morte 95, também conhecido como Ligante Fas

DA - Doença de Alzheimer

DH - Doença de Huntington

DIABLO - Proteína de ligação direta ao IAP com baixo pI (sigla do inglês *Direct IAP-binding protein with low pI*), também conhecida como SMAC

DLP1 - Proteína como dinamina-1 (sigla do inglês *Dynamin-1-like protein*), também conhecida como DNM1L ou DRP1

DNA - Ácido desoxirribonucléico (sigla do inglês *Deoxyribonucleic acid*)

DNM1L – Proteína como dinamina-1 (sigla do inglês *Dynamin 1-like*), também conhecida como DLP1 ou DRP1

DP - Doença de Parkinson

DRP1 - Proteína relacionada com dinamina-1 (sigla do inglês *Dynamin related protein 1*), também conhecida como DLP1 ou DNM1L

FADD – Proteína com domínio de morte associado a Fas (sigla do inglês *Fas-associated death domain protein*)

FasL - Ligante Fas (sigla do inglês *Fas ligand*)

FasR - Receptor Fas (sigla do inglês *Fas receptor*)

Fis1 - Fissão 1 (sigla do inglês *Fission-1*)

GAPDH - Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (sigla do inglês *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

GTP - Trifosfato de guanosina (sigla do inglês *Guanosine triphosphate*)

GTPase - Hidrolase de trifosfato de guanosina (sigla do inglês *Guanosine triphosphate hydrolase*)

HPRT1 - Hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (sigla do inglês *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*)

Mfn1 - Mitofusina 1 (sigla do inglês *Mitofusin 1*)

Mfn2 - Mitofusina 2 (sigla do inglês *Mitofusin 2*)

mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro (sigla do inglês *Messenger ribonucleic acid*)

OPA1 - Proteína atrofia óptica 1 (sigla do inglês *Optic atrophy 1*)

PAR4 - Proteína de resposta apoptótica prostática 4 (sigla do inglês *Prostate apoptosis response 4*)

PC12 - Linhagem celular derivada de feocromocitoma de rato

Proteína Gi - Proteína G inibitória

RPL13A - Proteína ribossomal L13A (sigla do inglês *Ribosomal protein L13A*)

RT-qPCR - Transcriptase reversa - Reação em cadeia da polimerase em tempo real (sigla do inglês *Reverse transcription real time polymerase chain reaction*)

SMAC - Segundo ativador mitocôndrial de caspase (sigla do inglês *Second mitochondria-derived activator of caspases*), também conhecido como DIABLO

SNAP-25 - Proteína de 25kDa associada ao sinaptossoma (sigla do inglês *Synaptosomal-associated protein, 25kDa*)

TNF - Fator de necrose tumoral (sigla do inglês *Tumor necrosis factor*)

TNFR1 - Receptor 1 do fator de necrose tumoral (sigla do inglês *Tumor necrosis factor receptor 1*)

TNF α - Fator de necrose tumoral alfa (sigla do inglês *Tumor necrosis factor α*), também conhecido como TNF

TRAIL - Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (sigla do inglês *TNF-related apoptosis-inducing ligand*)

VAMP - Proteína de membrana associada à vesícula (sigla do inglês *Vesicle-associated membrane protein*)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1.1 INTRODUÇÃO	2
1.1.1. Acúmulo de ferro cerebral associado à neurodegeneração	2
1.1.2 Estrutura e dinâmica mitocondrial.....	4
1.1.2.1 Mecanismos de fissão e fusão mitocondrial	5
1.1.2.2 Função mitocondrial e envelhecimento	7
1.1.3 Apoptose	9
1.1.3.1 Vias de ativação da apoptose.....	10
1.1.3.2 Moléculas envolvidas na apoptose	13
1.1.4 Sinapse e neurodegeneração.....	14
1.1.5 Canabinóides	16
1.1.5.1 Canabidiol (CBD).....	16
1.1.5.2 Uso do CBD no tratamento de doenças neurodegenerativas	17
1.2 OBJETIVOS	20
1.2.1 Objetivo Geral	20
1.2.2 Objetivos Específicos	20
CAPÍTULO 2	22
2.1 ARTIGO CIENTÍFICO	23
CAPÍTULO 3	64
3.1 CONCLUSÕES	65
3.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS	68
ANEXO – Comprovante de submissão do artigo	74

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Acúmulo de ferro cerebral associado à neurodegeneração

Até o ano de 2050, é previsto que mais de 30% do total da população terá mais de 65 anos de idade (de Magalhães e Sandberg, 2005). Com o crescimento da população idosa, o custo associado com cuidados e tratamentos de pessoas com problemas de saúde relacionados com a idade também cresce, levando à necessidade de medidas que previnam ou revertam esses problemas (de Magalhães e Sandberg, 2005). A saúde mental é uma preocupação importante dos adultos no envelhecimento, tendo em vista que o envelhecimento humano está associado com uma alta prevalência de déficits de memória e déficits cognitivos (Joseph *et al.*, 2009). Logo, doenças neurodegenerativas e demência representam grandes problemas de saúde pública (Joseph *et al.*, 2009). Estudos dos mecanismos envolvidos na neurobiologia do envelhecimento, visando o retardo e/ou a prevenção das doenças mentais devem, então, ser uma prioridade (Joseph *et al.*, 2009). Embora a etiologia de muitas doenças neurodegenerativas (como o caso da doença de Alzheimer - DA, doença de Parkinson - DP e doença de Huntington - DH) ainda não seja completamente estabelecida, danos oxidativos mediados por metais têm sido propostos como contribuintes significativos para processos de neurodegeneração (Salvador *et al.*, 2010).

Os chamados “bio-metais” (como por exemplo, ferro, cobre e zinco) são conhecidos por desempenharem um papel fundamental em vários processos metabólicos, sendo então considerados essenciais para a vida (Salvador *et al.*, 2010). A homeostasia desses metais é mantida através de mecanismos altamente regulados de captação, armazenamento e secreção (Salvador *et al.*, 2010). Nos mamíferos, o ferro é indispensável para as funções biológicas vitais, sendo um componente essencial para o transporte de oxigênio e funcionando como um co-fator para processos necessários à geração de energia (Stankiewicz e Brass, 2009). Participa também da síntese de enzimas, colesterol e lipídeos, da replicação do DNA e divisão celular, entre diversas outras funções (Thomas e Jankovic, 2004).

O acúmulo de ferro no cérebro tem sido observado tanto no processo de envelhecimento normal quanto em muitas doenças neurodegenerativas (Stankiewicz e Brass, 2009). Em um estado homeostático, ele é considerado um co-fator necessário para o metabolismo neuronal, sendo requerido para funções importantes como, por exemplo, síntese de neurotransmissores e mielinização de axônios (Johnstone e Milward, 2010). Entretanto,

ferro em excesso, devido à sua facilidade de doar elétrons para o oxigênio, pode levar à formação de radicais livres através da Reação de Fenton (Mills *et al.*, 2010). Essas espécies reativas de oxigênio podem ocasionar peroxidação lipídica dos ácidos graxos que compõem as membranas celulares dos neurônios, causar danos oxidativos a proteínas constitutivas e ao DNA, além de poder levar à morte celular (Mills *et al.*, 2010).

O principal mecanismo de proteção para evitar uma sobrecarga de ferro no cérebro é a barreira hemato-encefálica, que limita a entrada de ferro no cérebro oriunda do sangue (Collard, 2009). O amadurecimento dessa barreira só acontece por volta dos 6 meses de vida de um ser humano, tornando, então, o cérebro mais suscetível aos níveis de ferro nesse período de vida (Collard, 2009). É observado que com o envelhecimento, ocorre um aumento no acúmulo cerebral de ferro e uma redistribuição do mesmo em áreas cerebrais específicas, que são alvos preferenciais nas doenças neurodegenerativas (Zecca *et al.*, 2004). No entanto, pouco se sabe sobre a regulação desses mecanismos de transporte e liberação do ferro para o interior cerebral (Zecca *et al.*, 2004). Alguns estudos já relataram que neurônios, astrócitos e microglia apresentam acúmulo de ferro em regiões específicas como nos gânglios da base, assim como no córtex e hipocampo (Zecca *et al.*, 2004; Mills *et al.*, 2010). Essas regiões já foram observadas como sendo mais suscetíveis para processos neurodegenerativos, tais como DA e DP (Zecca *et al.*, 2004; Mills *et al.*, 2010).

Visando um melhor entendimento do papel do acúmulo de ferro cerebral em processos neurodegenerativos, estudos têm sido feitos em roedores, uma vez que esse modelo animal apresenta estrutura cerebral muito semelhante aos seres humanos (Collard, 2009). Os ratos também possuem barreira hemato-encefálica imatura ao nascimento, só sendo completamente estabelecida por volta da segunda semana de vida (equivalente ao período em torno de 6 meses em humanos) (Collard, 2009). Este é um período crítico durante o qual o cérebro passa por várias etapas de desenvolvimento fundamentais, tais como maturação do crescimento axonal e dendrítico, estabelecimento de conexões neurais, sinaptogênese, multiplicação das células da glia com mielinização, além de adquirirem novas faculdades motoras, sensoriais e avanços no comportamento motor espontâneo (Fredriksson *et al.*, 1999). Estudos anteriores já observaram que nesse período ocorre um aumento no transporte específico de ferro para o cérebro e um aumento nos receptores de transferrina, o que ocasionaria uma maior captação de ferro nesse período (Taylor e Morgan, 1990). Além disso, foi visto que uma vez esse ferro absorvido, ele não retorna mais para o plasma, sendo, então, redistribuído dentro do encéfalo (Dwork *et al.*, 1990).

Fredriksson e colaboradores (1999) demonstraram pela primeira vez em estudos utilizando camundongos, que o tratamento sistêmico com ferro durante o período de rápido desenvolvimento cerebral produz acúmulo de ferro nos gânglios da base, além de causar disfunções neurocomportamentais. Também foi demonstrado que ratos tratados com ferro do 10º ao 12º dia de vida pós-natal apresentam hipoatividade motora, bem como déficits no aprendizado e memória em duas tarefas comportamentais, o labirinto radial de oito braços e a esquivia inibitória (Schröder *et al.*, 2001). Em estudo anterior, verificou-se que a memória de reconhecimento também está prejudicada em ratos tratados neonatalmente com ferro (de Lima *et al.*, 2005). Foi observado também que a administração de ferro no período neonatal induz um aumento significativo na peroxidação lipídica na substância negra, no córtex e no hipocampo, bem como um aumento de danos oxidativos às proteínas nestas mesmas regiões cerebrais de ratos adultos (de Lima *et al.*, 2005). Também foi constatada uma diminuição da atividade da superóxido dismutase (enzima anti-oxidante) na substância negra, no córtex e no hipocampo (de Lima *et al.*, 2005). Esses resultados sugerem que o ferro pode estar exercendo seus efeitos deletérios sobre a cognição através do aumento dos níveis de estresse oxidativo cerebral (de Lima *et al.*, 2005).

Em um estudo anterior, também foi demonstrado, por meio de análise imunohistoquímica, que o tratamento de ratos com ferro no período neonatal induz o aumento de proteínas Par4 e caspase 3, envolvidas na iniciação e execução da cascata de apoptose, em hipocampo e córtex de ratos adultos (Miwa *et al.*, 2011). Provavelmente, isso se justifica pelo fato do ferro possuir um grande potencial de causar danos oxidativos nas células, verificando-se então um possível aumento na suscetibilidade para a neurodegeneração (Miwa *et al.*, 2011). Tendo em vista os efeitos cognitivos causados pelo uso de ferro neonatal em ratos, esses se tornam um adequado modelo animal de neurodegeneração, permitindo um estudo mais amplo e um maior entendimento das patologias que acometem o sistema nervoso e de todos os processos biológicos que as envolvem.

1.1.2 Estrutura e dinâmica mitocondrial

Mitocôndrias desempenham papéis importantes na vida e morte de células eucarióticas, fornecendo ATP para processos metabólicos por meio da fosforilação oxidativa, além de regular outras vias metabólicas, tais como a do ciclo de Krebs, metabolismo de ácidos graxos, gliconeogênese, controle de radicais livres, sinalização de cálcio intracelular e

apoptose (Oettinghaus *et al.*, 2012). Essas organelas são altamente dinâmicas, sendo ativamente transportadas nas células e podendo mudar rapidamente a estrutura interna e a distribuição de acordo com as condições fisiológicas (Wang *et al.*, 2009a).

O sistema nervoso representa apenas 2% da massa corporal do ser humano, no entanto, consome cerca de 20% do oxigênio que é inspirado em repouso (Harris *et al.*, 2012). A alta taxa metabólica do sistema nervoso se justifica pela presença de células altamente diferenciadas e que necessitam de ATP para manter os gradientes iônicos nas membranas celulares, para a plasticidade neuronal e para a neurotransmissão (Kann e Kovács, 2007). Consistente com a elevada demanda energética, as mitocôndrias estão presentes em grande número nas células nervosas, preferencialmente nos sítios pré e pós-sinápticos, uma vez que a maior parte do ATP cerebral é consumida para promover a transmissão sináptica (Harris *et al.*, 2012).

Devido ao importante papel exercido pelas mitocôndrias no sistema nervoso, quaisquer disfunções no metabolismo dessas organelas, como alterações nos mecanismos de fissão e fusão, podem causar sérias consequências na função e sobrevivência neuronal (Wang *et al.*, 2009a). Percebe-se que moléculas envolvidas na dinâmica mitocondrial podem afetar recrutamento de mitocôndrias nas espinhas dendríticas quando da ativação de neurônios hipocâmpais (Chan, 2006). Déficits no fornecimento de energia para as sinapses mostram importante papel das mitocôndrias nas doenças neurodegenerativas, tais como DA, DP e DH (Harris *et al.*, 2012).

1.1.2.1 Mecanismos de fissão e fusão mitocondrial

É sabido que, por meio da fissão e da fusão de mitocôndrias, essas organelas sofrem mudanças em sua morfologia, comprimento, tamanho e número (Liu *et al.*, 2012) e essa dinâmica é capaz de afetar a função mitocondrial e vice-versa (Wang *et al.*, 2009a). Tanto a fissão quanto a fusão mitocondrial são críticas para a manutenção de populações saudáveis de mitocôndrias, uma vez que a fusão mitocondrial permite a troca de conteúdo intramitocondrial entre duas ou mais organelas, reduzindo a quantidade de mitocôndrias defeituosas nas células, enquanto a fissão mitocondrial permite a eliminação de danos irreversíveis e conteúdos da organela, mantendo a integridade e homogeneidade mitocondrial das células (Bossy-Wetzel *et al.*, 2003).

O balanço entre a fissão e a fusão mitocondrial é controlado por proteínas da família de grandes GTPases relacionadas à dinamina (*Large dynamin-related GTPases*) que possuem efeitos antagônicos (Liu *et al.*, 2012). A fissão envolve pelo menos duas proteínas, uma grande GTPase, chamada de Proteína 1 semelhante à dinamina (DLP1, DRP1 ou DNML1) e uma pequena, chamada Fissão 1 (Fis1) (Wang *et al.*, 2009a). A proteína DNML1 encontra-se no citoplasma e, quando recrutada para a superfície mitocondrial, por razões que ainda permanecem obscuras, medeia a fissão mitocondrial (Chen e Chan, 2005). Uma das possibilidades é que Fis1, uma proteína transmembrana ancorada na membrana mitocondrial externa, funcione como um receptor da proteína DNML1, formando um complexo oligomérico que, utilizando a hidrólise do GTP, envolve e constribe túbulo mitocondriais, dividindo a mitocôndria (Chen e Chan, 2005; Cervený *et al.*, 2007).

A fusão, por sua vez, é regulada por três grandes GTPases, chamadas de Mitofusina 1 (Mfn1), Mitofusina 2 (Mfn2) e Proteína atrofia óptica 1 (OPA1) (Liu *et al.*, 2012). Mfn1 e Mfn2 são proteínas transmembranas mitocondriais orientadas em direção à membrana externa que, durante a fusão, através da interação de seus domínios, podem formar complexos homo e heteroméricos, fazendo a junção de mitocôndrias vizinhas (Wang *et al.*, 2009a). Enquanto isso, a proteína OPA1, por estar localizada no espaço intermembrana, muito próxima à membrana interna, é responsável pela fusão mitocondrial interna (Wang *et al.*, 2009a). Na Figura 1 observa-se uma representação dos mecanismos de fissão e fusão mitocondrial.

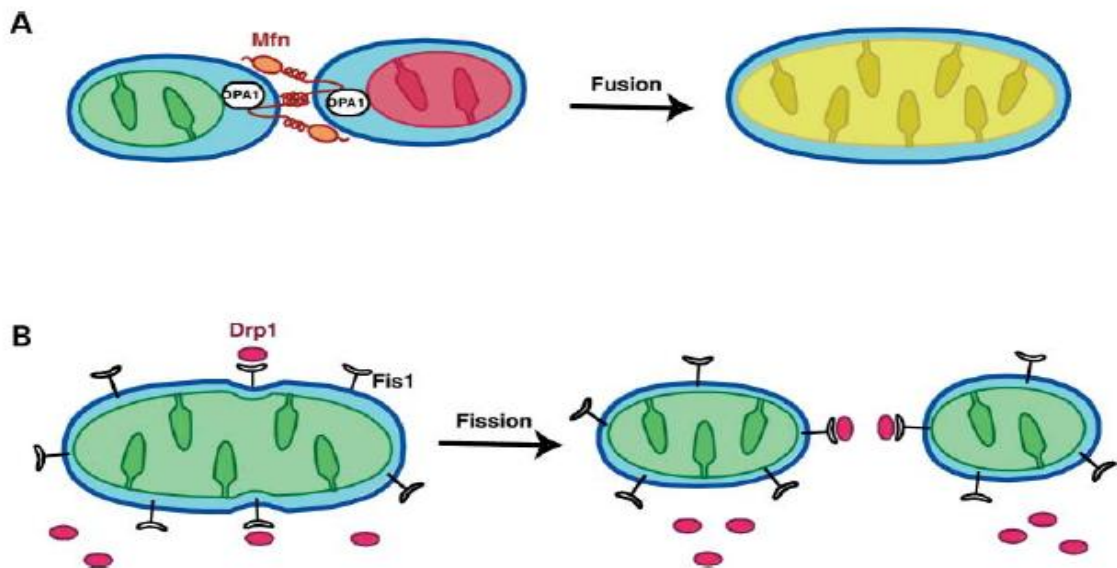


Figura 1. Moléculas de fusão e fissão mitocondrial. (A) Moléculas de fusão: Mfn é uma proteína da membrana mitocondrial externa que promove a junção entre mitocôndrias vizinhas, enquanto a proteína OPA1 localiza-se no espaço intermembranas, sendo responsável pela fusão mitocondrial interna. (B) Moléculas de fissão: a proteínas Fis1 está localizada na membrana mitocondrial externa, enquanto a proteína Drp1 (também chamada de DNM1L) encontra-se no citosol. O mecanismo de fissão permanece obscuro, mas uma das alternativas é Fis1 funcionar como receptor de Drp1 e formar pontos de constrição que levarão a mitocôndria à fissão. (Fonte: Chen e Chan, 2005).

1.1.2.2 Função mitocondrial e envelhecimento

O envelhecimento está associado a um declínio das funções mitocondriais, ocorrendo uma diminuição da fosforilação oxidativa e da síntese de ATP, um aumento de mutações mitocondriais, modificações na estrutura das mitocôndrias e uma produção aumentada de radicais livres, situações as quais podem predispor a doenças neurodegenerativas (Bossy-Wetzel *et al.*, 2003). Alguns estudos têm analisado o papel dessas proteínas mitocondriais em doenças neurodegenerativas, encontrando aumento da expressão gênica e proteica das moléculas de fissão e diminuição das moléculas de fusão em tecido cortical de pacientes com DA (Manczak *et al.*, 2011) e DH (Shirendeb *et al.*, 2011). Além disso, a proteína DNM1L está relacionada com a hiperfosforilação da tau e com depósitos beta-amilóides (A β) na DA (Manczak *et al.*, 2012). Outros investigadores observaram expressão gênica e proteica

diminuída de DNM1L, OPA1, Mfn1 e Mfn2, com aumento de apenas Fis1 no hipocampo de pacientes com DA (Wang *et al.*, 2009b), além de aumento da regulação da DNM1L e OPA1 na penumbra isquêmica, apresentando diminuição da regulação dessas proteínas no núcleo isquêmico de ratos (Liu *et al.*, 2012).

Além disso, essas organelas participam centralmente da iniciação e execução da apoptose e de outros tipos de morte celular, característica marcante nessas doenças neurodegenerativas (Bossy-Wetzel *et al.*, 2003). Após a célula receber determinados estímulos apoptóticos (evento que será posteriormente melhor abordado e detalhado), as mitocôndrias passam a apresentar proteínas membro da família Bcl-2 em sua superfície, os quais são responsáveis por causar permeabilização da membrana externa da mitocôndria, permitindo a liberação de estruturas específicas pró-apoptóticas para o citosol da célula (Chan, 2006). Ao mesmo tempo, as proteínas DNM1L também se direcionam para a membrana externa mitocondrial, ficando co-localizadas com as proteínas da família Bcl-2 (Chen e Chan, 2005). Essa co-localização de proteínas da família Bcl-2 e DNM1L pode ser essencial para que a maquinaria de fissão promova apoptose celular (Youle e Karbowski, 2005).

No entanto, deve-se levar em consideração que a fissão mitocondrial ocorre normalmente também em células saudáveis, sem desencadear processos apoptóticos (Chen e Chan, 2005). Essa fragmentação reversível pode ser induzida pela inibição de complexos respiratórios, ou por causa de aumento de níveis de cálcio citosólico, sem levar à apoptose (Youle e Karbowski, 2005). Da mesma forma, proteínas anti-apoptóticas não interferem na indução da fissão mitocondrial, mostrando que esses podem ser dois eventos separáveis (Bossy-Wetzel *et al.*, 2003).

Estudos já mostraram que uma inibição de proteínas DNM1L e Fis1 pode impedir a fragmentação mitocondrial, inibir a liberação do citocromo c, podendo atrasar ou reduzir a extensão da morte celular, ainda que esses mecanismos moleculares precisem ser melhor explorados (Chan, 2006). Células deficientes de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 apresentam fragmentação mitocondrial atenuada, mas os mecanismos envolvidos continuam a ser elucidados (Cho *et al.*, 2010). A apoptose neuronal relacionada com alterações na morfologia mitocondrial tem sido insuficientemente investigada até agora, entre outros motivos, pelo fato de ser difícil de detectar *in vivo* como as células morrem por apoptose, por serem rapidamente removidas por micróglia (Oettinghaus *et al.*, 2012).

As proteínas da família Bcl-2 também se co-localizam com as proteínas de fusão Mfn2 na membrana mitocondrial externa, e evidências de que superativação de Mfn2 inibe

proteínas pró-apoptóticas sugerem que essas proteínas possam controlar a fusão mitocondrial através de Mfn2 (Cho *et al.*, 2010). Por outro lado, é percebido que deficiência de proteínas Mfn1 e Mfn2 ocasionam extensiva fragmentação mitocondrial, mas a apoptose não é reforçada (Cho *et al.*, 2010).

Logo, no caso da apoptose, é observado que, a partir do momento que estímulos apoptóticos chegam às células, eles podem permitir que a maquinaria de fissão mitocondrial (com o auxílio das proteínas DNM1L e Fis1) promova esse tipo de morte celular, sendo um evento precedente à liberação do citocromo c e ativação de caspase (Youle e Karbowski, 2005). Em contraste, proteínas envolvidas na fusão mitocondrial (como é o caso da proteína OPA1) podem desempenhar um papel protetor contra a apoptose (Chan, 2006). Estudos mostram que inibição de proteínas de fissão leva à resistência aos estímulos apoptóticos (Oettinghaus *et al.*, 2012), enquanto inibição de proteínas de fusão leva à facilitação de morte celular em resposta a sinais apoptóticos (Chan, 2006).

1.1.3 Apoptose

A apoptose, uma das formas de morte celular programada, é uma parte essencial da vida dos organismos multicelulares, tendo um importante papel no desenvolvimento e homeostasia dos tecidos (Mattson, 2000). Durante o desenvolvimento, muitas células são produzidas em excesso, as quais eventualmente sofrem morte celular programada, contribuindo assim para a estruturação dos órgãos e tecidos (Jin e El-Deiry, 2005). Logo, a apoptose é um processo fisiológico balanceado e regulado (Mattson, 2000). A perda dessa regulação resulta em condições patológicas, tais como defeitos no desenvolvimento, doenças autoimunes, neurodegeneração e câncer (Mattson, 2000; Jin e El-Deiry, 2005).

No sistema nervoso normal, é preciso haver um equilíbrio nos mecanismos que possibilitam a sobrevivência das células nervosas, ocorrendo um balanço entre a produção de novas células e a morte de células velhas e/ou ineficazes (Mattson, 2000). No entanto, a perda desse equilíbrio leva à morte prematura de neurônios adultos e a alterações funcionais irreversíveis, levando à neurodegeneração (Jin e El-Deiry, 2005).

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela perda progressiva de células em específicas populações neuronais (Jellinger, 2001). Por exemplo, na DA, o tipo mais comum de demência em idade avançada, ocorre perda de neurônios hipocámpais e corticais,

enquanto na DP, o mais conhecido distúrbio do movimento, ocorre perda de neurônios na substância negra e em outros núcleos subcorticais (Jellinger, 2001).

O papel da apoptose nas doenças neurodegenerativas não se encontra totalmente elucidado, uma vez que muitos dos estudos analisando esse tipo de morte celular utilizam critérios não exclusivos de apoptose (Okouchi *et al.*, 2007). Logo, pode haver a contribuição de outras formas de morte celular, não apoptóticas, que compartilham características semelhantes, dificultando a interpretação dos resultados obtidos nesses estudos (Okouchi *et al.*, 2007). Apesar dessas limitações, existe um consenso para a participação apoptótica na morte celular em processos neurodegenerativos (Okouchi *et al.*, 2007). Cérebros de pessoas que sofrem dessas doenças demonstraram maior expressão de proteínas relacionadas à apoptose e específica fragmentação do DNA (Kajta, 2004).

Essa morte celular programada é caracterizada por modificações celulares distintas das que ocorrem em um outro tipo de morte celular, a necrose (Okouchi *et al.*, 2007). A apoptose é uma morte celular caracterizada por um encolhimento celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, formação de bolhas na membrana e formação de corpos apoptóticos que serão rapidamente fagocitados por macrófagos ou por células vizinhas, evitando assim uma resposta inflamatória nos tecidos da região (Jellinger, 2001). Esse tipo de morte celular é dependente de energia oriunda do ATP para a síntese protéica e ativação de sinais como a formação do apoptossomo (Okouchi *et al.*, 2007).

1.1.3.1 Vias de ativação da apoptose

Estudos indicam que existem duas principais rotas de ativação da apoptose: a via extrínseca ou do receptor de morte e a via intrínseca ou mitocondrial (Alberghina e Colangelo, 2006). No entanto, já foi evidenciado que essas duas vias estão ligadas e que as moléculas de uma via podem influenciar na outra (Alberghina e Colangelo, 2006). Essas duas rotas convergem para uma mesma etapa de execução, que vai resultar, no final, na fagocitose celular (Alberghina e Colangelo, 2006). A Figura 2 mostra esquematicamente as duas vias da cascata de apoptose.

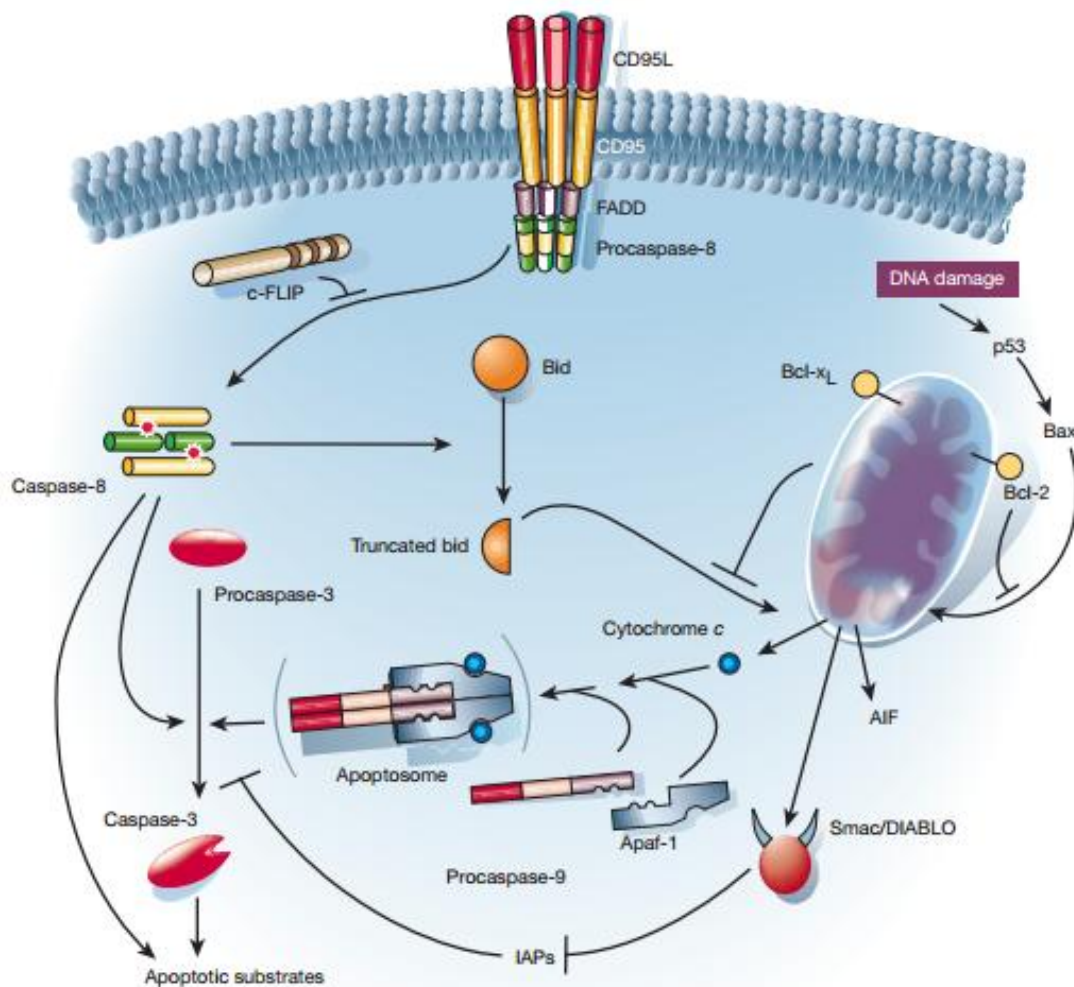


Figura 2. Vias extrínseca e intrínseca de apoptose. A via extrínseca (à esquerda) é ativada por moléculas (tais como CD95L) que se ligam aos seus receptores de “morte” na superfície celular e, por meio de moléculas adaptadoras FADD, recruta moléculas pró-caspase 8, resultando na ativação da mesma. Já a via intrínseca (à direita) é ativada por sinais intracelulares que convergem na mitocôndria e por meio de membros da família Bcl-2, modifica a permeabilidade da membrana mitocondrial, fazendo essa organela liberar moléculas como citocromo c e Smac/DIABLO. No caso do citocromo c, ele irá se associar à proteína adaptadora Apaf1 e ativar moléculas pró-caspase 9. Essas duas vias de ativação irão culminar em uma rota comum de execução de apoptose, por meio da ativação de pró-caspase 3 (Fonte: Hengartner, 2000).

A via de sinalização extrínseca que inicia a apoptose envolve a interação de ligantes de “morte” que pertencem à super família TNF de citocinas, os quais incluem o TNF α , o FasL e o TRAIL, com seus receptores transmembrana (Elmore, 2007; Okouchi *et al.*, 2007). O domínio de “morte” dos receptores desempenha um papel crítico na transmissão do sinal da

superfície celular para as vias de sinalização intracelular (Okouchi *et al.*, 2007). A sequência de eventos que define a fase extrínseca da apoptose é melhor caracterizada para os pares de ligantes e receptores de morte FasL / FasR e TNF- α / TNFR1 (Elmore, 2007). Nesses casos, após a interação do ligante ao seu receptor, proteínas adaptadoras citoplasmáticas são recrutadas e se associam à pró-caspase 8, formando um complexo de sinalização que resulta na ativação auto-catalítica de pró-caspase 8 em caspase 8 (Elmore, 2007).

As vias de sinalização intrínseca que iniciam a apoptose envolvem uma variedade de estímulos não mediados por receptores e que produzem sinais intracelulares que agem diretamente sobre alvos dentro da célula e convergem na mitocôndria (Elmore, 2007). Os estímulos que iniciam a via intrínseca produzem sinais intracelulares que podem agir de modo positivo ou negativo (Elmore, 2007). Sinais negativos envolvem a ausência de determinados fatores de crescimento, hormônios e citocinas que podem levar à perda da supressão da apoptose, ativando a mesma (Elmore, 2007). Outros estímulos, que agem de uma forma positiva, incluem a radiação, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecções virais, danos no DNA e os radicais livres (Jin e El-Deiry, 2005). Esses estímulos provocam alterações na membrana mitocondrial interna, cuja permeabilidade é controlada pelos membros da família Bcl-2 (*B cell lymphoma- 2*) (Kajta, 2004). Isso resulta na abertura dos poros de permeabilidade de membrana da mitocôndria, perda do potencial de membrana e a libertação de dois grupos principais para o citosol (Okouchi *et al.*, 2007). O primeiro grupo, composto principalmente pelo citocromo c e Smac/DIABLO, participa de um evento inicial, enquanto o segundo grupo participa de um evento tardio, sendo liberado da mitocôndria durante a apoptose, após a célula se comprometer a morrer (Elmore, 2007). No caso do citocromo c, após sua liberação, ele irá se ligar a proteínas adaptadoras que irão ocasionar a ativação da caspase 9 (Alberghina e Colangelo, 2006). Smac/DIABLO agem sobre inibidores de apoptose (Elmore, 2007).

Após a fase de iniciação da apoptose, com a ativação da caspase 8 na via extrínseca e da caspase 9 na via intrínseca, ocorrerá a fase efetora da apoptose, na qual essas caspases ativadas irão agir sobre outras caspases, denominadas executoras de apoptose (caspases 3, 6 e 7), ativando-as (Okouchi *et al.*, 2007). Uma vez que as caspases executoras forem ativadas, elas irão provocar uma série de processos proteolíticos que irão resultar na finalização da morte celular (Okouchi *et al.*, 2007).

1.1.3.2 Moléculas envolvidas na apoptose

Os mecanismos de apoptose são altamente complexos e sofisticados, envolvendo uma cascata de eventos moleculares (Wyllie *et al.*, 2010), conforme visão geral apresentada no ítem anterior. Existem vários grupos de moléculas envolvidas na cascata de apoptose, incluindo moléculas da família Bcl-2, caspases, proteínas adaptadoras que controlam ativação ou inativação de caspases, membros da família de receptores do TNF, bem como fatores de transcrição, proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, entre outras (Wyllie *et al.*, 2010). No entanto, o “coração” desse mecanismo abrange duas famílias de proteínas, as caspases e os membros da família Bcl-2 (Wyllie *et al.*, 2010).

Caspases são enzimas proteolíticas com resíduo cisteína no seu sítio catalítico que cliva proteínas em resíduos aspartato e são consideradas indispensáveis para promover a cascata que leva à morte celular programada (Troy e Salvesen, 2002). Os mamíferos possuem quatorze caspases já identificadas, possuindo distintas funções no processo inflamatório e na apoptose (Kajta, 2004). Baseadas em suas funções, as caspases podem ser classificadas dentro de três grupos (Jin e El-Deiry, 2005). O primeiro grupo é o das chamadas caspases inflamatórias, que inclui as caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13 e 14, que estão envolvidas em processos inflamatórios ao invés de apoptóticos (Jin e El-Deiry, 2005). O segundo grupo é o das caspases iniciadoras apoptóticas, que abrange as caspases 2 e 9 na via intrínseca e 8 e 10 na via extrínseca, que são responsáveis por mediar o sinal de morte celular (Jin e El-Deiry, 2005). Já o terceiro grupo é o das caspases efetoras de apoptose, composto pelas caspases 3, 6 e 7, que estão envolvidas em estágios posteriores dessa cascata e culminam nos processos finais de morte celular, comuns às vias intrínseca e extrínseca (Jin e El-Deiry, 2005).

As caspases são sintetizadas na forma de pró-enzimas inativas na maioria das células e podem ser ativadas por estímulos apoptóticos, permitindo assim, a ativação da cascata de apoptose (Okouchi *et al.*, 2007). Nesse sentido, as caspases iniciadoras (8 da via extrínseca e 9 da via intrínseca) são cataliticamente ativadas pela interação com proteínas adaptadoras, enquanto as caspases efetoras, tendo como principal a caspase 3, são ativadas pelas caspases iniciadoras e levam à clivagem de vários substratos, induzindo à morte celular (Okouchi *et al.*, 2007). Essa cascata proteolítica, na qual uma caspase pode ativar outras caspases, amplifica a via de sinalização apoptótica e leva a uma rápida morte celular (Elmore, 2007).

A atividade das caspases pode ser regulada por outras proteínas, como as pertencentes à família Bcl-2 (Wyllie, 2010). Essa família é composta por mais de 30 proteínas e é dividida em grupos, de acordo com a atividade (Okouchi *et al.*, 2007). Nessa família existem as

proteínas com função anti-apoptóticas (entre as quais estão Bcl-2 e Bcl-XL) e as com função pró-apoptóticas (entre as quais estão Bax, Bad e Bak) (Okouchi *et al.*, 2007). Essas proteínas têm essencial significância uma vez que ela podem determinar se as células devem cometer apoptose ou se devem abortar o processo (Elmore, 2007). Acredita-se que o mais importante mecanismo de ação das proteínas da família Bcl-2 é na regulação da liberação do citocromo c da mitocôndria através da alteração de permeabilidade da membrana mitocondrial (Elmore, 2007).

Uma outra proteína com papel crucial na via intrínseca da apoptose é o fator 1 de ativação da protease apoptótica (Apaf1) (Harlan *et al.*, 2006). A Apaf1, em condições normais, é uma proteína monomérica citosólica inativa (Harlan *et al.*, 2006). Certos estímulos apoptóticos levam a permeabilização mitocondrial e liberação do citocromo c (Harlan *et al.*, 2006). Uma vez o citocromo c presente no citosol, ele irá se ligar à proteína adaptadora Apaf1, fazendo que essa proteína sofra uma modificação conformacional e forme um complexo molecular chamado apoptossomo (Campioni *et al.*, 2005). Esse apoptossomo interage com a pró-caspase 9 e induz sua clivagem, ativando-a (Campioni *et al.*, 2005). A caspase 9, então, irá iniciar a cascata de proteólise (Campioni *et al.*, 2005). Pode-se dizer, então, que a Apaf1 é a responsável por interligar os sinais apoptóticos oriundos da mitocôndria com a via das caspases, promovendo assim a morte celular (Ashraf *et al.*, 2007).

As células nervosas podem desencadear a ativação de cascatas de morte neuronal, quando a funcionalidade dos circuitos neuronais encontra-se diminuída. A capacidade de sinalização sináptica contribui com a propagação de fatores neurotróficos que possibilitam a sobrevivência das células nervosas. Nos casos das doenças neurodegenerativas, essa morte ocorre excessivamente, permitindo, então, que a observação da viabilidade sináptica seja um importante parâmetro no estudo de morte celular.

1.1.4 Sinapse e neurodegeneração

A perda de sinapses é um fator primário envolvido no declínio intelectual associado às doenças neurodegenerativas como DA (Shimada *et al.*, 2003). A perda sináptica se correlaciona muito mais estritamente com o declínio cognitivo do que a contagem de células, e essa redução na viabilidade sináptica ocorre mais cedo e em maior escala do que a morte neuronal (Shimada *et al.*, 2003). Durante o envelhecimento normal, a densidade das sinapses declina, no entanto, para definir como demência, é preciso ocorrer perda de 40% das sinapses

quando em comparação com pessoas apresentando envelhecimento normal (Downes *et al.*, 2008).

As vesículas sinápticas desempenham um papel crucial na neurotransmissão em terminais pré-sinápticos (Shojo e Kibayashi, 2006). Essas vesículas são originadas dos corpos celulares e são transportadas por fluxo axonal anterógrado para terminais pré-sinápticos e após ocorre o retorno através do fluxo axonal retrógrado aos corpos celulares para degradação (Shojo e Kibayashi, 2006). A sinaptofisina é a principal proteína transmembrana integral das vesículas sinápticas (King e Arendash, 2002). Ela é uma glicoproteína de membrana localizada em todas as vesículas sinápticas neuronais e em algumas células endócrinas (King e Arendash, 2002). No entanto, essa glicoproteína pode estar presente tanto em sinapses excitatórias quanto em inibitórias, em diversos tipos de neurotransmissores secretados na fenda sináptica e em diferentes sítios sinápticos (axodendríticos e axosômáticos) (Sarnat *et al.*, 2010). Outras proteínas da parede vesicular sináptica incluem sinaptobrevina (antigamente chamada de VAMP), sinaptotagmina e SNAP-25, entre outras (Sarnat *et al.*, 2010). A Figura 3 mostra um diagrama esquemático de um terminal pré-sináptico, no qual se observam diversas proteínas presentes, entre elas a sinaptofisina.

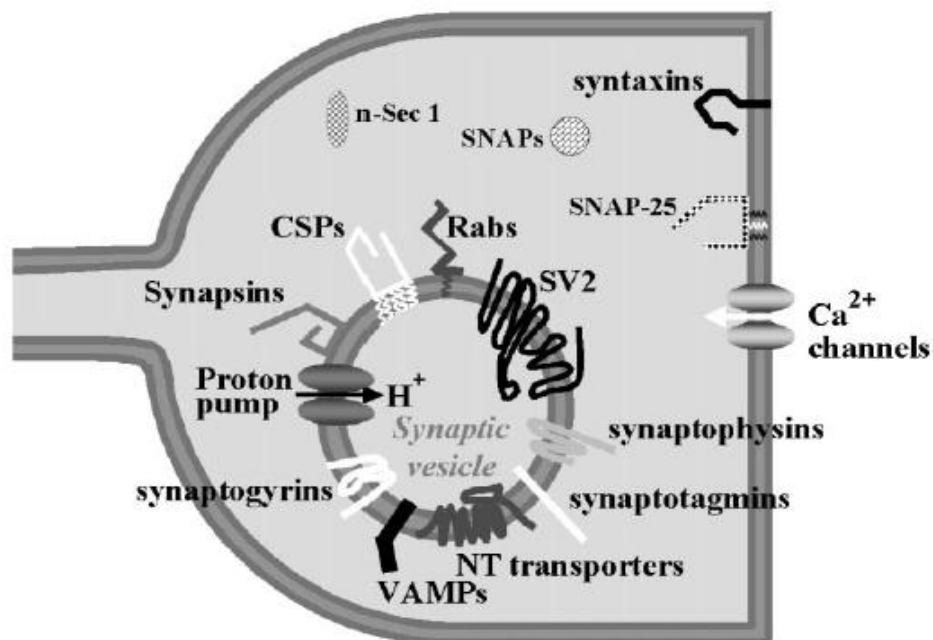


Figura 3. Terminal pré-sináptico, ilustrando a presença de uma vesícula sináptica. As membranas das vesículas sinápticas contêm diferentes proteínas e entre elas encontra-se a sinaptofisina (Fonte: Staple *et al.*, 2000).

Vários estudos já indicaram que a sinaptofisina regula a exocitose e endocitose dos neurotransmissores e que participa na formação e reciclagem de vesículas sinápticas (Shojo e Kibayashi, 2006). Também já foi sugerido que a sinaptofisina desempenha um papel na formação e estabilização das sinapses (Shojo e Kibayashi, 2006). Como a perda de sinapses é correlacionada com o grau de disfunção cerebral, os níveis de sinaptofisina também podem servir como um marcador funcional do cérebro (Shojo e Kibayashi, 2006).

Muitos estudos atualmente tem voltado sua atenção para a busca de estratégias de prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas. Uma droga em crescente estudo é o canabinóide natural Canabidiol, o qual algumas pesquisas já têm sugerido apresentar um potencial terapêutico em várias patologias, entre elas as relacionadas ao sistema nervoso.

1.1.5 Canabinóides

Os canabinóides compõem um grupo heteromórfico de moléculas que apresentam atividade sobre receptores específicos, denominados receptores de canabinóides (Zuardi, 2008). São diferenciados em três grupos: endógenos ou endocanabinóides, canabinóides sintéticos e fitocanabinóides (Zuardi, 2008). Este último engloba compostos terpenólicos naturais derivados da planta *Cannabis sativa* (Zuardi, 2008).

1.1.5.1 Canabidiol (CBD)

O Canabidiol, o principal constituinte não psicotrópico da *Cannabis sativa*, foi isolado pela primeira vez no final dos anos 1930 (Scuderi, *et al.*, 2009). Desde o início dos estudos, realizados na década de 1970, um grande número de efeitos farmacológicos do CBD tem sido descrito (Scuderi, *et al.*, 2009). Uma série de ações, incluindo anticonvulsivantes, sedativas, hipnóticas, ansiolíticas, antipsicóticas, anti-inflamatórias e neuroprotetoras têm sido demonstradas em estudos clínicos e pré-clínicos (Zuardi, 2008). A maioria dos efeitos exercidos pelos fitocanabinóides é mediada através de ação antagonista ou agonista em receptores específicos (Zuardi, 2008). Porém, os mesmos podem exercer alguns efeitos que não são intercedidos por receptores, tais como: efeitos no sistema imunológico, no sistema circulatório e efeitos neuroprotetores (Zuardi, 2008).

Os tecidos de mamíferos expressam pelo menos dois tipos de receptores para canabinóides: CB₁ e CB₂ (Scuderi *et al.* 2009). Ambos estão acoplados à proteína G inibitória (proteína Gi), à adenilato ciclase (negativamente) e à proteína quinase ativada por mitógeno (positivamente) (Grotenhermen, 2003; Pertwee, 2006; Ryberg *et al.*, 2007). A ativação de proteínas Gi ocasiona a inibição da adenilato ciclase, diminuindo dessa forma a conversão de AMP à AMP cíclico (Grotenhermen, 2003; Pertwee, 2006; Ryberg *et al.*, 2007). Tem sido demonstrado que o CBD se liga com baixa afinidade aos receptores canabinóides CB1 e CB2 (Scuderi *et al.*, 2009), portanto, modos de ação desse fitocanabinóide independente de CB1 e CB2 têm sido investigados. Evidências indicam que o CBD se liga em receptores vanilóides tipo 1 (Bisogno *et al.*, 2001) e receptores serotoninérgicos 5-HT1A, o que poderia explicar alguns dos seus efeitos (Mishima *et al.*, 2005; Campos e Guimarães, 2008).

1.1.5.2 Uso do CBD no tratamento de doenças neurodegenerativas

Ainda que o mecanismo de ação dessa substância não esteja totalmente elucidado, é crescente o número de estudos que sugerem o CBD como um potencial agente terapêutico no tratamento de doenças neurodegenerativas como DA, DP, DH e Esclerose Múltipla (Zuardi, 2008). No entanto, a caracterização desse potencial efeito é limitada pela falta de estudos utilizando modelos animais adequados de disfunção cognitiva que reproduzam aspectos de doenças neurodegenerativas (Bisogno e Di Marzo, 2008). Alguns trabalhos publicados apresentam modelos animais de mamíferos roedores apropriados e diferentes estratégias terapêuticas que se mostraram efetivas no tratamento de patologias como DP e DA. Atualmente, é reconhecido que o CBD é um potente antioxidante, como foi demonstrado pela primeira vez em 1998 (Hampson *et al.*, 1998). Posteriormente, outros estudos têm evidenciado que alguns dos efeitos protetores do CBD podem estar relacionados as suas propriedades antioxidantes.

Com relação à DP, autores afirmam que o mecanismo de ação do CBD é neutralizar o dano oxidativo aos neurônios da substância negra (Sevcik e Masek, 2000). Em um estudo com ratos, foi observado que o CBD, quando administrado imediatamente após a lesão, reverteu a depleção de dopamina causada pela 6-hidroxi-dopamina (García-Arencia *et al.*, 2007). Neste mesmo estudo, descobriu-se que o efeito do CBD implicou no aumento da expressão dos níveis de mRNA para Cu,Zn-superóxido dismutase, enzima chave de defesa endógena contra estresse oxidativo (García-Arencia *et al.*, 2007). Esse estudo concluiu que esse canabinóide possui propriedade antioxidante independente de receptor e fornece

neuroproteção contra a degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (García-Arencibia *et al.*, 2007).

Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi executado tratamento agudo e crônico com CBD, em doses de 5mg/kg e 10mg/kg, em ratos tratados com ferro no período neonatal. No tratamento agudo, foi observado que ratos adultos que receberam a dose de 5mg/kg de CBD não conseguiram restaurar o prejuízo de memória de reconhecimento de longa duração causado pelo ferro, enquanto que aqueles que receberam 10mg/kg conseguiram reverter completamente esse dano (Fagherazzi *et al.*, 2012). Já no tratamento crônico com CBD, tanto a dose de 5mg/kg quanto a dose de 10mg/kg se mostraram eficientes para reverter os prejuízos ocasionados pelo ferro no período neonatal (Fagherazzi *et al.*, 2012). No entanto, observou-se que essa substância não afetou a memória dos ratos controle, tanto no uso agudo quanto no uso crônico (Fagherazzi *et al.*, 2012). Esses resultados forneceram evidências de um potencial uso do CBD no tratamento do declínio cognitivo associado a doenças neurodegenerativas. A Figura 4 apresenta os resultados dos tratamentos agudo e crônico com CBD obtidos pelo nosso grupo de pesquisa.

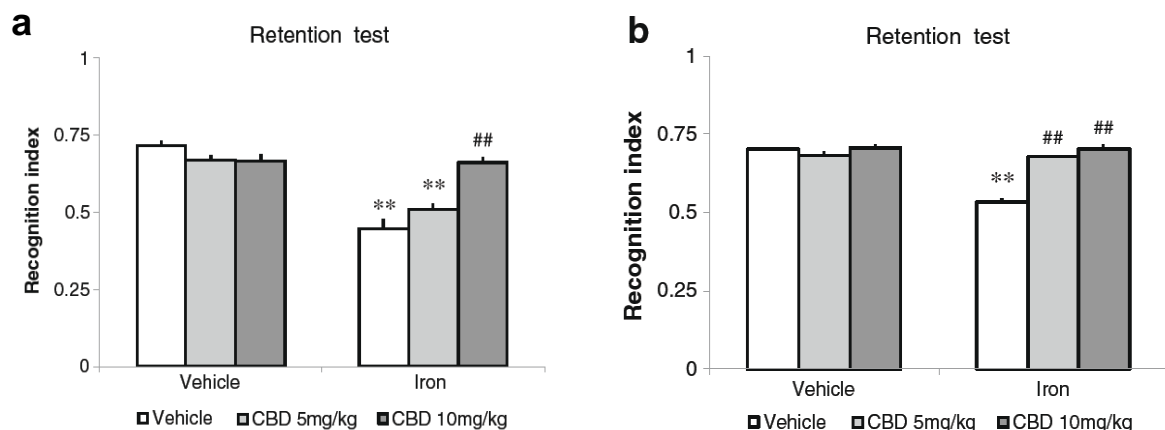


Figura 4. Efeitos do tratamento agudo (a) e crônico (b) de CBD sobre o déficit de memória de reconhecimento induzido pelo ferro. Índices de reconhecimento nas sessões de testes são expressos como média \pm SEM. Injeção única (tratamento agudo) de CBD ou veículo foi administrada intraperitonealmente imediatamente após a sessão de treino, ou injeções diárias durante 14 dias (tratamento crônico) foram administradas intraperitonealmente. No tratamento crônico a sessão de treino foi realizada 24h após a última injeção. $N= 10-16$ por grupo. Diferenças entre veículo-veículo e outros grupos são indicadas por ** $p<0,001$ e as diferenças entre ferro-veículo e ferro-CBD são indicadas por ## $p<0,001$ (Adaptado de Fagherazzi *et al.*, 2012).

Recentemente, foi mostrado que o tratamento com ferro aumenta os níveis de expressão de marcadores apoptóticos (Miwa *et al.*, 2011) e gliose reativa (Fernandez *et al.*, 2011) em regiões do cérebro. É possível que, além de seus efeitos antioxidantes, o CBD seja capaz de proteger o tecido nervoso contra estímulos apoptóticos levando a uma recuperação neurofuncional (Castillo *et al.*, 2010). Por exemplo, o CBD, foi capaz de reduzir a concentração de caspase 9 no tecido danificado em um modelo animal de lesão hipóxico-isquêmica (Castillo *et al.*, 2010). Na DA, demonstrou-se que o CBD aumenta os níveis de pró-caspase 3, e em paralelo reduz os níveis de caspase 3 em células PC12 tratadas com A β (Iuvone *et al.*, 2004). Isso indica que o composto está intimamente relacionado com a inibição da apoptose neuronal, visto que o mesmo impede a fragmentação do DNA induzida por placas A β , processo típico de morte celular programada (Iuvone *et al.*, 2004).

Embora exista um modelo experimental de tratamento neonatal com ferro bem estabelecido, demonstrando que o mesmo pode provocar diversas alterações na fase de envelhecimento, incluindo prejuízo cognitivo, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão totalmente estabelecidos. Uma vez que o processo de declínio cognitivo observado em animais tratados com ferro no período neonatal pode estar associado a estresse oxidativo, prejuízos energéticos e alterações na mitocôndria, esse trabalho visa verificar se uma sobrecarga de ferro no período neonatal está associada com modificações na dinâmica mitocondrial, a partir da análise de alterações nas proteínas de fissão e fusão mitocondrial, DNM1L e OPA1, respectivamente. Sabendo que alterações na dinâmica mitocondrial podem ocasionar, entre outros efeitos, morte neuronal, o trabalho objetiva investigar uma molécula-chave da cascata de apoptose, a Caspase 3. A análise da proteína sinaptofisina visa verificar se o ferro leva a um prejuízo na viabilidade sináptica, que pode contribuir para a morte de células nervosas. Tendo em vista a necessidade de complementação aos estudos que propõem um potencial terapêutico para o CBD, esse trabalho também visa verificar o papel do CBD como restaurador dos prejuízos causados pelo tratamento neonatal com ferro.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Este projeto teve como objetivo investigar os efeitos do tratamento neonatal com ferro sobre os mecanismos moleculares de apoptose, dinâmica mitocondrial e sobre marcador sináptico em estruturas cerebrais de ratos e verificar se possíveis alterações nesses mecanismos poderiam ser revertidas por meio de tratamento com CBD.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do tratamento com ferro do 12º ao 14º dia de vida pós-natal sobre a expressão gênica e proteica da proteína de fissão mitocondrial DNMI1L no hipocampo e córtex de ratos.
- Avaliar o efeito do tratamento com ferro do 12º ao 14º dia de vida pós-natal sobre a expressão gênica e proteica da proteína de fusão mitocondrial OPA1 no hipocampo e córtex de ratos.
- Avaliar o efeito do tratamento com ferro do 12º ao 14º dia de vida pós-natal sobre a expressão gênica e proteica do marcador apoptótico Caspase 3 no hipocampo e córtex de ratos.
- Avaliar o efeito do tratamento com ferro do 12º ao 14º dia de vida pós-natal sobre a expressão gênica e proteica do marcador sináptico Sinaptofisina no hipocampo e córtex de ratos.
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com CBD sobre a expressão gênica e proteica de DNMI1L no hipocampo e córtex de ratos controles e ratos tratados com ferro no período neonatal.

- Avaliar o efeito do tratamento crônico com CBD sobre a expressão gênica e proteica de OPA1 no hipocampo e córtex de ratos controles e ratos tratados com ferro no período neonatal.
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com CBD sobre a expressão gênica e proteica de Caspase 3 no hipocampo e córtex de ratos controles e ratos tratados com ferro no período neonatal.
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com CBD sobre a expressão gênica e proteica do marcador sináptico Sinaptofisina no hipocampo e córtex de ratos controles e ratos tratados com ferro no período neonatal.

CAPÍTULO 2

2.1 ARTIGO CIENTÍFICO

**SUBMETIDO AO PERIÓDICO “MOLECULAR NEUROBIOLOGY”
NO DIA 25/04/2013**

Original Article

Molecular Neurobiology

Cannabidiol normalizes caspase 3, synaptophysin, and mitochondrial fission protein DNM1L expression levels in rats with brain iron overload: implications for neuroprotection

Vanessa Kappel da Silva • Betânia Souza de Freitas • Arethuza da Silva Dornelles • Laura Roesler Nery • Lucio Falavigna • Rafael Dal Ponte Ferreira • Maurício Reis Bogo • Jaime Eduardo Cecílio Hallak • Antônio Waldo Zuardi • José Alexandre S. Crippa • Nadja Schröder

V. K. da Silva • B. S. de Freitas • A. da S. Dornelles • L. R. Nery • L. Falavigna • R. D. P. Ferreira • N. Schröder

Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

V. K. da Silva • M. R. Bogo • J. E. C. Hallak • A. W. Zuardi • J. A. S. Crippa • N. Schröder
National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

M. R. Bogo

Center for Genomics and Molecular Biology, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

J. E. C. Hallak • A. W. Zuardi • J. A. S. Crippa

Department of Neuroscience and Behavior, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

N. Schröder (Corresponding author)

Department of Physiological Sciences, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, Av. Ipiranga, 6681 Prédio 12D, Sala 301, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil; Telephone number: +55 51 3353 4743; nadja.schroder@pucrs.br

Abstract

We have recently shown that chronic treatment with Cannabidiol (CBD) was able to recover memory deficits induced by brain iron loading in a dose-dependent manner in rats. Brain iron accumulation is implicated in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, including Parkinson's and Alzheimer's, and has been related to cognitive deficits in animals and human subjects. Deficits in synaptic energy supply have been linked to neurodegenerative diseases, evidencing the key role played by mitochondria in maintaining viable neural cells and functional circuits. It has also been shown that brains of patients suffering from neurodegenerative diseases have increased expression of apoptosis-related proteins and specific DNA fragmentation. Here we have analyzed the expression level of brain proteins involved with mitochondrial fusion and fission mechanisms (DNM1L and OPA1), the main integral transmembrane protein of synaptic vesicles (synaptophysin), and caspase 3, an apoptosis-related protein, in order to gain a better understanding of the potential of CBD in restoring the damage caused by iron loading in rats. We found that CBD rescued iron-induced effects, bringing hippocampal DNM1L, caspase 3, and synaptophysin levels back to values comparable to the control group. Our results suggest that iron affects mitochondrial dynamics, possibly triggering synaptic loss and apoptotic cell death, and indicate that CBD should be considered as a potential molecule with memory-rescuing and neuroprotective properties to be used in the treatment of cognitive deficits observed in neurodegenerative disorders.

Keywords: Cannabidiol • iron • mitochondria • apoptosis • neurodegenerative disorders.

Introduction

Brain iron accumulation is implicated in the pathogenesis of neurodegenerative diseases [1], mainly due to the formation of free radicals that cause significant oxidative damage [2]. Iron accumulation in neurons, astrocytes, and microglia has been reported in the basal ganglia as well as in the cortex and hippocampus, regions affected in neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD) [2-9]. Studies using imaging techniques show that iron accumulation in specific brain areas correlates with poor performance in cognitive tests, both in healthy elderly individuals [10-14] and in patients with dementia [9, 15-17].

Previous studies in rodents have shown that oral administration of iron during the period of rapid brain development produces iron accumulation in the basal ganglia and causes neurobehavioral deficits [18], including motor hypoactivity and learning, and memory impairments [19]. The negative impact of iron on cognition may be due to increasing levels of cerebral oxidative stress, as impaired recognition memory, increased lipid peroxidation, and decreased antioxidant defenses have been observed in the hippocampus, cortex, and substantia nigra in rats presenting higher levels of iron in the brain [20, for a review see 21].

Through fission and fusion, mitochondria modify their morphology and length while their size and numbers also change [22], all dynamic processes critical for the maintenance of healthy populations of mitochondria and which can affect their function [23]. Both mitochondrial fission and fusion are critical for the maintenance of healthy populations of mitochondria, since mitochondrial fusion allows the exchange of intramitochondrial content between two or more organelles, reducing the quantity of defective mitochondria in the cells, while mitochondrial fission allows elimination of irreversibly damaged organelle content, maintaining the homogeneity and integrity of mitochondria [24].

Deficits in synaptic energy supply have been linked to neurodegenerative diseases such as AD, PD, and Huntington (HD), evidencing the key role played by mitochondria in maintaining viable neural cells and functional circuits [25]. Synaptic loss is a primary factor involved in the intellectual decline associated with neurodegenerative diseases such as AD [26]. It has been observed that the correlation between synaptic loss and cognitive decline is stronger than that between cognitive decline and cell counts, and that synaptic loss occurs earlier and to a greater extent than neuronal death [26]. Besides energy production, mitochondria also play a central role in starting and promoting both apoptosis as well as other types of cell death [24]. It has also been shown that brains of patients suffering from neurodegenerative diseases have increased expression of apoptosis-related proteins and specific DNA fragmentation [27].

Cannabidiol (CBD), the main non-psychoactive constituent of *Cannabis sativa*, is known to have antioxidant [28, 29] and antiapoptotic [30, 31] properties. A few studies show that in newborn rats, CBD is neuroprotective against hypoxia-ischemia [32] and striatal lesions caused by 3-nitropropionic acid, an inhibitor of mitochondrial complex II [33]. Additionally, we have recently shown that chronic treatment with CBD was able to recover iron-induced memory deficits in a dose-dependent manner in rats [34].

Lately, CBD has received attention as a promising candidate therapy in AD [35], however additional information is required to characterize the mechanisms underlying its neuroprotective properties.

In order to gain a better understanding of the potential of CBD in restoring the damage caused by iron loading in rats, we analyzed the expression level of proteins involved with mitochondrial fusion and fission mechanisms, namely cytosolic dynamin-related protein 1 (*DNM1L*) and optic atrophy protein 1 (*OPA1*); the main integral transmembrane protein of synaptic vesicles (synaptophysin); and caspase 3, an apoptosis-related protein. Our findings

support the potential of CBD in reversing cognitive decline and its clinical use in treating neurodegenerative disorders such as PD and AD.

Material and Methods

Animals

Pregnant Wistar rats were obtained from the State Health Science Research Foundation (FEPPS-RS, Porto Alegre, Brazil).

After birth each litter was adjusted within 48h to eight rat pups, and to contain offspring of both genders in about equal proportions. Each pup was kept with its mother in a plastic cage with sawdust bedding at a room temperature of $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and a 12/12 h light/dark cycle. At the age of 3 weeks, pups were weaned and the males were selected and raised in groups of three to five in individually ventilated cages with sawdust bedding. For postnatal treatments, animals were given standardized pellet food and tap water *ad libitum*.

All experimental procedures were performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and the recommendations on animal use of the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior (SBNec) and approved by the Institutional Ethics Committee of the Pontifical Catholic University (CEUA 11/00247). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Treatments

Iron neonatal treatment

The neonatal iron treatment has been described in detail elsewhere [34, 36]. Briefly, 12-day-old rat pups received orally a single daily dose (10 ml/kg solution volume) of vehicle (5% sorbitol in water) (control group) or 30 mg/kg of body weight of Fe^{2+} (iron carbonyl, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) via a metallic gastric tube, over 3 days (postnatal days 12-14).

Cannabidiol

Adult (3-month-old) rats, treated neonatally with vehicle or iron were randomly distributed into two subgroups that received a daily intraperitoneal injection of vehicle (Tween 80 – saline solution 1:16 v/v) or CBD (approximately 99.9% pure; THC-Pharm, Frankfurt, Germany and STI-Pharm, Brentwood, UK, at the dose of 10 mg/kg) for 14 consecutive days. This experimental design resulted in four experimental groups: (1) sorbitol administered in the neonatal period and vehicle in adulthood (Sorb-Veh), (2) sorbitol administered in the neonatal period and CBD in adulthood (Sorb-CBD), (3) iron administered in the neonatal period and vehicle in adulthood (Iron-Veh), and (4) iron administered in the neonatal period and CBD in adulthood (Iron-CBD). Drug solutions were freshly prepared immediately prior to administration [34].

Sample preparation for molecular analysis

Rats were euthanized by decapitation at 24h after the last injection of CBD treatment. Cortex and hippocampus were quickly dissected, left hemispheres placed in a cooled RNA-later solution (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) for RT-qPCR assays, and right hemispheres placed in a cooled protease inhibitor solution (Complete Mini, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) for Western Blotting assays. Samples were stored at -80°C for subsequent molecular analyses.

Western Blotting analysis

Proteins were extracted in homogenization buffer containing 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0, 100mM NaCl, protease inhibitor cocktail, Triton X-100 0.5%, and SDS 0.1%. After 30 min in ice, samples were centrifuged at 13500 rpm for 10 min [adapted from

37]. The supernatant was collected and the protein content was determined using Bradford assay [38]. Aliquots were stored at -20°C.

Twenty-five µg of protein was separated on a 10% SDS polyacrylamide gel and transferred electrophoretically to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5% non fat dry milk in TBS containing 0.05% Tween 20 and were incubated overnight with one of the following antibodies: anti-β-actin (Abcam, Cambridge, UK) at 1:2500; anti-DNM1L (Abcam, Cambridge, UK) at 1:500; anti-OPA1 (Abcam, Cambridge, UK) at 1:2000; anti-synaptophysin (Abcam, Cambridge, UK) at 1:1500; and anti-caspase 3 (Abcam, Cambridge, UK) at 1:1000. Goat anti-mouse IgG and goat polyclonal anti-rabbit IgG (both from Abcam, Cambridge, UK) secondary antibodies were used and detected using ECL Western Blotting Substrate Kit (Abcam, Cambridge, UK). Pre-stained molecular weight protein markers (SuperSignal Molecular Weight Protein Ladder, Thermo Scientific, Rockford, USA) were used to determine the detected bands' molecular weight and confirm target specificity of antibodies. The densitometry quantification was performed using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Total blotting protein levels of samples were normalized according to each sample's β-actin protein levels [adapted from 36].

Quantitative Real-time PCR Analysis (RT-qPCR)

The expression analyses of *DNM1L*, *OPA1*, synaptophysin, and caspase 3 were carried out by a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay as previously described [39]. Cerebral cortex and hippocampus from adult rats were isolated for total RNA extraction with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) in accordance with manufacturer instructions. RNA purity was quantified spectrophotometrically, calculating the ratio between the absorbance values at 260nm and 280nm, and the samples were tested by electrophoresis in a 1.0% agarose gel with gelRed nucleic acid stain (Biotium, Hayward,

USA). cDNA species were synthesized with SuperScriptTMIII First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, USA) [adapted from 39]. For all transcripts, RT-qPCRs were performed using SYBR green. Standard reactions (25 µl) were assembled as follows: 4 µl of SYBR green qPCR supermix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0.25 µl of each forward and reverse primers (10 µM, Table 1), 0.25 µl of dNTPs (10mM), 1.5 µl of MgCl₂ (50mM), 2.5 µl of PCR buffer (10X), 3.7 µl DEPC water, 0.05 µl of Platinum TaqDNA 0.5U (Invitrogen, Carlsbad, USA), and 12.5 µl of template. Templates were 1:50 diluted cDNA samples, and in the case of negative controls, cDNAs were replaced by DEPC water. All RT-qPCR assays were carried out in quadruplicate using an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Forty amplification cycles were performed, with each cycle consisting of 94°C for 15 seconds followed by 60°C for 35 seconds. Amplification and dissociation curves generated by the software Applied Biosystems 7500 were used for gene expression analysis. Cycle-temperature (Ct) values were obtained for each gene. Following the removal of outliers (samples that had problems with amplification), raw fluorescence data were exported to the LinRegPCR 12.x (<http://LinRegPCR.HFRC.nl>) to determine the PCR amplification efficiency of each sample. PCR efficiency of each sample, together with Ct values, was used to calculate a relative gene expression value for each transcript, according to the equation $R = (E_{ref})^{CT_{sample}} \times (E_{sample})^{-CT_{sample}} \times (E_{sample})^{CT_{ref}} \times (E_{ref})^{-CT_{ref}}$, where E refers to PCR efficiency, Ct is the Ct value for each amplification, Ref is the value of the reference gene and sample to the gene in question [40]. Samples obtained from six animals in each group were normalized to three reference genes [glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*), and ribosomal protein L13A (*RPL13A*)] and run in quadruplicate [41]. PCR primer sequences are available in Table 1.

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm S.E.M. and were analyzed using SPSS software by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by appropriate Post-Hoc tests when necessary. In all comparisons, *p* values less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

Results

We aimed to analyze the effects of iron loading in the neonatal period on mitochondrial dynamic by evaluating two proteins critically involved in the processes of mitochondrial fission and fusion, DNM1L and OPA1, respectively. Western Blotting and RT-qPCR analysis of the mitochondrial fission protein, DNM1L, are shown in Figures 1 and 2, respectively. ANOVA comparisons of DNM1L expression in the hippocampus revealed statistically significant differences among groups, both according to Western Blotting results (Fig. 1a; $F_{(3,14)} = 6.753$; $p = 0.005$) and RT-qPCR analysis (Fig. 2a; $F_{(3,59)} = 3.989$; $p = 0.012$). Post hoc tests revealed that rats neonatally treated with iron and having received vehicle in adulthood (Iron-Veh group) presented reduced DNM1L protein and gene expression levels when compared to the control group (Sorb-Veh group; $p = 0.003$ and $p = 0.031$, for Western Blotting and RT-qPCR, respectively); DNML1 protein levels of iron-treated rats that received CBD were not significantly different from controls. Post hoc comparisons of RT-qPCR results show that *DNML1* gene expression in the hippocampus of iron-treated rats that received CBD in adulthood were significantly higher than levels in iron-treated rats that received vehicle in adulthood ($p = 0.004$, Fig. 2a). In addition, *DNML1* gene expression was not significantly different from controls, suggesting that CBD was able to reverse iron-induced reduction of DNML1 gene and protein expression. No significant effects were observed on DNM1L protein (Fig. 1b; $F_{(3,12)} = 1.242$; $p = 0.338$) and gene expression (Fig. 2b; $F_{(3,46)} = 0.694$; $p = 0.560$) in the cortex.

Results of Western Blotting analysis and RT-qPCR for the mitochondrial fusion protein OPA1 are shown in Figures 3 and 4, respectively. ANOVA comparisons of Western Blotting results showed statistically significant differences among groups both in the hippocampus (Fig. 3a; $F_{(3,16)} = 7.064$; $p = 0.003$) and in the cortex (Fig. 3b; $F_{(3,16)} = 4.074$; $p =$

0.025). Further analysis with Tukey HSD tests revealed that CBD treatment of vehicle-treated rats increased OPA1 levels in the hippocampus, when compared to the control group ($p = 0.002$, Fig. 3a). Iron-treated rats that received either vehicle or CBD in adulthood presented reduced OPA1 levels when compared with the control group (p values = 0.041 and 0.036, respectively, Fig. 3b) in the cortex. Conversely, RT-qPCR analysis of *OPA1* gene expression revealed no significant differences, either in the hippocampus (Fig. 4a; $F_{(3,68)} = 2.174$; $p = 0.099$) or in the cortex (Fig. 4b; $F_{(3,41)} = 1.088$; $p = 0.365$).

Figures 5 and 6 show the results of Western Blotting and RT-qPCR analysis of the synaptic marker synaptophysin. Statistical comparison using ANOVA revealed a statistically significant difference in synaptophysin levels among groups in the hippocampus (Fig. 5a; $F_{(3,15)} = 7.411$; $p = 0.003$), but not in the cortex (Fig. 5b; $F_{(3,15)} = 1.809$; $p = 0.189$). Further analysis with Tukey HSD test showed that rats neonatally treated with iron and having received vehicle in adulthood present a significant reduction on synaptophysin levels when compared to the control group ($p = 0.015$). Synaptophysin levels in the hippocampus of iron-treated rats that received CBD in adulthood were significantly higher than in iron-treated rats that received vehicle in adulthood ($p = 0.003$). Moreover, synaptophysin levels in the iron-CBD group were not significantly different from controls, suggesting that CBD was able to reverse iron-induced reduction on synaptophysin (Fig. 5a). No significant differences were observed on synaptophysin gene expression by RT-qPCR, in the hippocampus (Fig. 6a; $F_{(3,68)} = 0.952$; $p = 0.421$) or in the cortex (Fig. 6b; $F_{(3,52)} = 0.984$; $p = 0.408$).

Western Blotting and RT-qPCR analysis of caspase 3 are presented in Figures 7 and 8, respectively. ANOVA comparisons of caspase 3 protein expression by Western Blotting in the hippocampus revealed significant differences among groups (Fig. 7a; $F_{(3,17)} = 7.148$; $p = 0.003$). Posterior analysis with Tukey HSD tests showed that neonatal iron treatment produced an increase in caspase 3 levels when compared to the control group ($p = 0.002$).

Levels of caspase 3 were significantly lower in the Iron-CBD group when compared to iron-treated rats that received vehicle ($p = 0.024$, Fig.7a) and were not significantly different from controls, suggesting that CBD treatment was able to significantly reduce iron-induced increasing levels of the apoptotic protein caspase 3. No significant differences among groups were observed in RT-qPCR analysis of caspase-3 levels in the hippocampus (Fig. 8a; $F_{(3,45)} = 1.643$; $p = 0.193$). Cortex exhibited statistically significant differences in caspase 3 expression both in Western Blotting (Fig. 7b; $F_{(3,16)} = 9.796$; $p = 0.001$) and in RT-qPCR analyses (Fig. 8b, $F_{(3,47)} = 3.744$; $p = 0.017$). Post-hoc tests indicated that caspase 3 protein expression was increased in iron-treated rats that received vehicle ($p = 0.006$) or CBD ($p = 0.005$) in adulthood (Fig. 7b) when compared to the control group. Similar results were observed in RT-qPCR, with increases of caspase 3 gene expression on iron-treated rats that received vehicle ($p = 0.027$, Fig. 8b). Interestingly, caspase 3 gene expression in the cortex of iron-treated rats that received CBD was not statistically different from controls (Fig. 8b).

Discussion

In the present study, we show that iron treatment significantly reduces protein levels and gene expression of the mitochondrial fission protein DNM1L in the hippocampus and mitochondrial fusion protein OPA1 levels in the cortex of rats. Additionally, we observed that iron induced a significant increase in caspase 3 protein levels both in the hippocampus and cortex, while there was a significant reduction of synaptophysin levels in the hippocampus. Gene expression of caspase 3 was also increased in the cortex. CBD completely reversed iron-induced effects on the proteins here analyzed, bringing hippocampal DNM1L, caspase 3, and synaptophysin protein levels, as well as gene expression of *DNM1L*, back to values similar to those observed in the control group. Not all iron-induced effects on protein targets, as detected by Western Blotting analysis, reflected on the expression of their corresponding genes, as revealed by molecular analysis. This discrepancy was observed in the levels of OPA1 in the cortex, Synaptophysin in the hippocampus, and caspase 3 in the hippocampus and suggests that a posttranscriptional modulation may have occurred in these cases.

There is little information available on the role of mitochondrial fission and fusion proteins in neurodegenerative diseases. However, evidence indicates that an imbalance in mitochondrial dynamics, including increased mitochondrial fragmentation, is an early event associated to neurodegenerative processes. A recent study has shown that expression of DNM1L and the transmembrane fission 1 (Fis1) proteins are increased, while expression of fusion proteins Mitofusin 1 (Mfn1), Mitofusion 2 (Mfn2), and OPA1 is decreased in *post mortem* brain specimens of AD patients when compared to age-matched controls [42]. Experiments using co-immunoprecipitation have shown that DNM1L interacts with hyperphosphorylated tau in *post mortem* AD brains and brain tissues from Amyloid precursor protein (APP), APP/ presenilin-1 (PS1), and 3XTg-AD mice, possibly exacerbating

mitochondrial deficiencies [43]. However, reduced levels of DNM1L, OPA1, Mfn1, and Mfn2 gene and protein expression, and increased Fis1 in the hippocampus of AD patients have been found [44]. In addition, it has been shown that APP overexpression reduces the levels of DNM1L and OPA1 while it increases the levels of Fis1, induces changes in mitochondrial morphology and distribution, and increases reactive oxygen species (ROS) levels in human neuroblastoma M17 cells [45].

Mitochondria contribute to cellular iron homeostasis in which ROS related to iron deregulation acts in a feed-forward manner, as both cause and consequence of mitochondrial dysfunction [46]. We have previously reported that iron treatment increases oxidative stress parameters and superoxide production in sub-mitochondrial particles (20, 47) in the cortex and hippocampus of rats. We thus hypothesize that iron-induced oxidative stress may be related to mitochondrial dysfunction, resulting in alterations in the expression of fusion and fission proteins observed here, which might ultimately lead to unbalanced mitochondrial dynamics and impaired energy production in our model. It is possible that a reduction in the mitochondrial fission protein DNM1L may prevent elimination of defective mitochondria and that CBD acts by antagonizing this effect.

Impaired mitochondrial function may lead to a reduction in synaptic viability, as these organelles are preferentially localized in synaptic terminals. Our results show that synaptophysin, one of the main proteins in presynaptic terminals, was significantly reduced in the hippocampus of rats treated with iron, suggesting that these rats may have synaptic abnormalities contributing to iron-induced memory impairments. These results are consistent with other studies, which show reduced synaptophysin in the posterior cerebral cortex in a mouse model of brain aging associated with cerebral atrophy and learning and memory deficits [26].

In AD patients, synaptophysin levels were reduced in the hippocampus, when compared to controls, and hippocampal synaptophysin levels correlated with neuropsychological measurements, including Mini-mental state examination scores (48). Another study has also found a significant decrease in synaptophysin in the frontal cortex of brain specimens obtained from AD patients, compared to age-matched controls (49), suggesting a reduction in synaptic density, which may be associated to cognitive impairment. Interestingly, here we show that CBD was able to reverse iron-induced reductions in synaptophysin levels and, as previously reported [34], to improve memory impairments associated to iron.

Although some studies have described that fission machinery promotes apoptotic death while fusion machinery protects against apoptotic stimulus [50,51], in our study we found reduced DNMI1L fission protein levels in combination with increased caspase 3 protein levels in the hippocampus. Thus, it is likely that other stimuli, possibly related to the extrinsic apoptotic pathway, including a reduction in neurotrophic factors, are related to increased levels of caspase 3 observed here. Faulty synaptic transmission can contribute to increasing and/or activating the neuronal death machinery, and may work as apoptotic stimulus [26]. Our results indicate a combined occurrence of mitochondrial deregulation and synaptic loss with increased caspase 3 levels, corroborating the hypothesis that the mitochondrial imbalance results in energetic failure leading to an impaired synaptic function that can culminate in increased activity of the cellular death machinery. Our findings confirm a previous immunohistochemistry study in which we demonstrated that iron leads to increased levels of PAR4 and caspase 3, key apoptotic markers involved in triggering and promoting activation of apoptosis cascade in the cortex and hippocampus of adult rats, leading to a potential susceptibility to neurodegeneration [52]. A previous *in vitro* study using human neuroblastoma cells exposed to ferric ammonium citrate has shown that iron overload

produces increased oxidative stress and activates redox-sensitive signals, leading to apoptotic cell death, with increases in caspase 3 activity [53]. Additionally, iron chelation with M30 decreases apoptosis in human neuroblastoma cells by reducing pro-apoptotic proteins Bad and Bax, and by inhibiting the cleavage and activation of caspase 3 [54]. The present results showing that CBD reversed iron-induced hippocampal increase of caspase 3 are consistent with previous studies indicating that CBD was able to reduce the concentration of caspase 9 in damaged tissue in an animal model of hypoxic-ischemic injury [30], and to enhance the levels of pro-caspase 3. Additionally, CBD reduced the levels of caspase 3 in PC12 cells treated with A β , preventing DNA fragmentation (a typical process of programmed cell death) induced by A β [31].

Over the years, we have focused our research on the effects of iron treatment on cognitive parameters. We have consistently demonstrated that iron, when administered in the neonatal period, induces significant and long-lasting cognitive deficits in a variety of hippocampal-based memory paradigms, including spatial [19], aversively motivated [19, 36] and recognition memory tasks [20]. In this study, it is noteworthy that the most pronounced iron-induced effects were observed in the hippocampus. We have recently demonstrated that CBD was able to completely abolish iron-induced deficits in hippocampus-dependent memory [34]. The present findings show that CBD was able to rescue iron-induced alterations in synaptophysin and caspase 3 levels, as well as DNMI1L expression in the hippocampus. Thus, by reducing caspase 3 levels, possibly due to CBD antiapoptotic properties, and by recovering synaptophysin levels back to control values, CBD may confer neuroprotection. These effects might explain memory-ameliorating properties of CBD. In humans, recent studies have shown that CBD protects against THC-induced reduction of hippocampal volume in chronic cannabis users [55] and prevents THC-induced hippocampal

episodic memory impairment, which may relate to its cannabinoid receptor 1 (CB1) antagonistic effects [56].

Interestingly, we observed that CBD increased the levels of the mitochondrial fusion protein OPA1 in the hippocampus of sorbitol-treated rats, an effect that might be related to CBD's neuroprotective properties, since mitochondrial fusion may be considered as a protective mechanism. Corroborating our *in vivo* results, Ryan and colleagues [57] demonstrated that CBD protects against the mitochondrial uncoupler FCCP in SH cells and in cultured hippocampal neurons *in vitro*. More studies are necessary to better elucidate the effects of CBD on mitochondria.

Taken together, our findings support the hypothesis that CBD positively modulates hippocampal memories while it also offers neuroprotection. Given its safety and reduced side effects, CBD is a promising candidate for the treatment of neurodegenerative disorders involving memory decline.

In conclusion, our study shows that rats treated with iron present altered mitochondrial dynamics, which is possibly related to iron-induced oxidative stress. Impaired mitochondrial functioning and synaptic loss may contribute to the activation of apoptotic mechanisms, increasing apoptotic markers, such as caspase 3, observed here. Impaired mitochondrial functioning and synaptic loss may play a causative role in the cognitive deficits reported in our model, as has been described in previous studies [20, 34, 36, 58, 59].

This is a pioneer study linking *in vivo* iron loading with changes in gene and protein expression that suggest alterations in mitochondrial dynamics and synaptic loss in the central nervous system. Altogether, our findings indicate that CBD should be considered as a potential molecule with memory-rescuing and neuroprotective properties to be used in the treatment of cognitive deficits observed in neurodegenerative disorders.

Acknowledgements

V.K.S. is supported by a CAPES/MEC fellowship. L.F. is supported by a FAPERGS scholarship. M.R.B, J.E.H., A.W.Z., J.A.C., and N.S. are CNPq Research fellows. This research was supported by the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM). This manuscript was reviewed by a professional science editor and by a native English-speaking copy editor to improve readability.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Stankiewicz JM, Brass SD (2009) Role of iron in neurotoxicity: a cause for concern in the elderly? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12(1):22-29.
2. Mills E, Dong XP, Wang F, Xu H (2010) Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. *Future Med Chem* 2(1):51-64.
3. Dexter DT, Carayon A, Javoy-Agid F, Agid Y, Wells FR, Daniel SE et al (1991) Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* 114 (Pt 4):1953-1975.
4. Hirsch EC, Brandel JP, Galle P, Javoy-Agid F, Agid Y (1991) Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis. *J Neurochem* 56(2):446-451.
5. Good PF, Perl DP, Bierer LM, Schmeidler J (1992) Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study. *Ann Neurol* 31(3):286-292.
6. Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 5(11): 863-873.
7. Schenck JF, Zimmerman EA, Li Z, Adak S, Saha A, Tandon R et al (2006) High-field magnetic resonance imaging of brain iron in Alzheimer disease. *Top Magn Reson Imaging* 17(1):41-50.
8. Oakley AE, Collingwood JF, Dobson J, Love G, Perrott HR, Edwardson JA et al (2007) Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. *Neurology* 68(21):1820-1825.

9. Zhu WZ, Zhong WD, Wang W, Zhan CJ, Wang CY, Qi JP et al (2009) Quantitative MR phase-corrected imaging to investigate increased brain iron deposition of patients with Alzheimer disease. *Radiology* 253(2):497-504.
10. Pujol J, Junqué C, Vendrell P, Grau JM, Martí-Vilalta JL, Olivé C et al (1992) Biological significance of iron-related magnetic resonance imaging changes in the brain. *Arch Neurol* 49(7):711-717.
11. Sullivan EV, Adalsteinsson E, Rohlfing T, Pfefferbaum A (2009) Relevance of Iron Deposition in Deep Gray Matter Brain Structures to Cognitive and Motor Performance in Healthy Elderly Men and Women: Exploratory Findings. *Brain Imaging Behav* 3(2):167-175.
12. Bartzokis G, Lu PH, Tingus K, Peters DG, Amar CP, Tishler TA et al (2011) Gender and iron genes may modify associations between brain iron and memory in healthy aging. *Neuropsychopharmacology* 36(7):1375-1384.
13. Penke L, Valdés Hernández MC, Maniega SM, Gow AJ, Murray C, Starr JM et al (2012) Brain iron deposits are associated with general cognitive ability and cognitive aging. *Neurobiol Aging* 33(3):510-517.
14. Rodrigue KM, Daugherty AM, Haacke EM, Raz N (2012) The role of hippocampal iron concentration and hippocampal volume in age-related differences in memory. *Cereb Cortex* in press, DOI: 10.1093/cercor/bhs139
15. Brass SD, Benedict RH, Weinstock-Guttman B, Munschauer F, Bakshi R (2006) Cognitive impairment is associated with subcortical magnetic resonance imaging grey matter T2 hypointensity in multiple sclerosis. *Mult Scler* 12(4):437-444.
16. House MJ, St Pierre TG, Foster JK, Martins RN, Clarnette R (2006) Quantitative MR imaging R2 relaxometry in elderly participants reporting memory loss. *AJNR Am J Neuroradiol* 27(2):430-439.

17. Ding B, Chen KM, Ling HW, Sun F, Li X, Wan T et al (2009) Correlation of iron in the hippocampus with MMSE in patients with Alzheimer's disease. *J Magn Reson Imaging* 29(4):793-798.
18. Fredriksson A, Schröder N, Eriksson P, Izquierdo I, Archer T (1999) Neonatal iron exposure induces neurobehavioural dysfunctions in adult mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 159(1):25-30.
19. Schröder N, Fredriksson A, Vianna MR, Roesler R, Izquierdo I, Archer T (2001) Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. *Behav Brain Res* 124(1): 77-85.
20. de Lima MN, Polydoro M, Laranja DC, Bonatto F, Bromberg E, Moreira JC et al (2005) Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *Eur J Neurosci* 21(9):2521-2528.
21. Schröder N, Figueiredo LS, de Lima M N M (2013) Role of brain iron accumulation in cognitive dysfunction: evidence from animal models and human studies. *J Alzheimers Dis* 34(4): 797-812.
22. Liu W, Tian F, Kurata T, Morimoto N, Abe K (2012) Dynamic changes of mitochondrial fusion and fission proteins after transient cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res* 90(6):1183-1189.
23. Wang X, Su B, Zheng L, Perry G, Smith MA, Zhu X (2009) The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 109 (Suppl) 1:153-159.
24. Bossy-Wetzel E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2003) Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol* 15(6):706-716.

25. Harris JJ, Jolivet R, Attwell D (2012) Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75(5):762-777.
26. Shimada A, Keino H, Satoh M, Kishikawa M, Hosokawa M (2003) Age-related loss of synapses in the frontal cortex of SAMP10 mouse: a model of cerebral degeneration. *Synapse* 48(4):198-204.
27. Kajta M (2004) Apoptosis in the central nervous system: Mechanisms and protective strategies. *Pol J Pharmacol* 56(6):689-700.
28. Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D (1998) Cannabidiol and (-) Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14):8268-8273.
29. García-Arencibia M, González S, de Lago E, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J (2007) Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res* 1134(1):162-170.
30. Castillo A, Tolón MR, Fernández-Ruiz J, Romero J, Martínez-Orgado J (2010) The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiol Dis* 37(2):434-440.
31. Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA (2004) Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem* 89(1):134-141.
32. Pazos MR, Cinquina V, Gómez A, Layunta R, Santos M, Fernández-Ruiz J et al (2012) Cannabidiol administration after hypoxia-ischemia to newborn rats reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function. *Neuropharmacology* 63(5):776-783.

33. Sagredo O, Ramos JA, Decio A, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J (2007) Cannabidiol reduced the striatal atrophy caused 3-nitropropionic acid in vivo by mechanisms independent of the activation of cannabinoid, vanilloid TRPV1 and adenosine A2A receptors. *Eur J Neurosci* 26(4):843-851.
34. Fagherazzi EV, Garcia VA, Maurmann N, Bervanger T, Halmenschlager LH, Busato SB et al (2012) Memory-rescuing effects of cannabidiol in an animal model of cognitive impairment relevant to neurodegenerative disorders. *Psychopharmacology (Berl)* 219(4):1133-1140.
35. Karl T, Cheng D, Garner B, Arnold JC (2012) The therapeutic potential of the endocannabinoid system for Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets* 16(4):407-420.
36. Silva PF, Garcia VA, Dornelles A da S, Silva VK, Maurmann N, Portal BC et al (2012) Memory impairment induced by brain iron overload is accompanied by reduced H3K9 acetylation and ameliorated by sodium butyrate. *Neuroscience* 200:42-49.
37. Arciello M, Capo CR, Cozzolino M, Ferri A, Nencini M, Carrì MT et al (2010) Inactivation of cytochrome c oxidase by mutant SOD1s in mouse motoneuronal NSC-34 cells is independent from copper availability but is because of nitric oxide. *J Neurochem* 112(1):183-192.
38. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
39. Amaral AU, Seminotti B, Cecatto C, Fernandes CG, Busanello EN, Zanatta A et al (2012) Reduction of Na(+), K(+)-ATPase activity and expression in cerebral cortex of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice: A possible mechanism for brain injury in glutaric aciduria type I. *Mol Genet Metab* 107(3):375-382.

40. Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
41. Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G (2008). Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. *Synapse* 62: 302-309.
42. Manczak M, Calkins MJ, Reddy PH (2011) Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet* 20(13): 2495-2509.
43. Manczak M, Reddy PH (2012) Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage. *Hum Mol Genet* 21(11): 2538-2547.
44. Wang X, Su B, Lee HG, Li X, Perry G, Smith MA et al (2009) Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29(28):9090-9103.
45. Wang X, Su B, Siedlak SL, Moreira PI, Fujioka H, Wang Y et al (2008) Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(49):19318-19323.
46. Horowitz MP, Greenamyre JT (2010) Mitochondrial iron metabolism and its role in neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2:S551-S568.
47. Dal-Pizzol F, Klamt F, Frota ML, Andrades ME, Caregnato FF, Vianna M et al (2001) Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult wistar rat. *Brain Res Dev Brain Res* 130: 109-114.
48. Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, Price DL, Martin LJ (1997) Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(8):933-944.

49. Reddy PH, Mani G, Park BS, Jacques J, Murdoch G, Whetsell W Jr et al (2005) Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *J Alzheimers Dis* 7(2):103-117.
50. Youle RJ, Karbowski M (2005) Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8):657-663.
51. Chan DC (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125(7):1241-1252.
52. Miwa CP, de Lima MN, Scalco F, Vedana G, Mattos R, Fernandez LL et al (2011) Neonatal iron treatment increases apoptotic markers in hippocampal and cortical areas of adult rats. *Neurotox Res* 19(4):527-535.
53. Salvador GA, Oteiza PI (2011) Iron overload triggers redox-sensitive signals in human IMR-32 neuroblastoma cells. *Neurotoxicology* 32(1): 75-82.
54. Avramovich-Tirosh Y, Reznichenko L, Mit T, Zheng H, Fridkin M, Weinreb O et al (2007) Neurorescue activity, APP regulation and amyloid-beta peptide reduction by novel multi-functional brain permeable iron- chelating- antioxidants, M-30 and green tea polyphenol, EGCG. *Curr Alzheimer Res* 4(4): 403-411.
55. Demirakca T, Sartorius A, Ende G, Meyer N, Welzel H, Skopp G et al (2011) Diminished gray matter in the hippocampus of cannabis users: possible protective effects of cannabidiol. *Drug Alcohol Depend* 114(2-3): 242-245.
56. Englund A, Morrison PD, Nottage J, Hague D, Kane F, Bonaccorso S et al (2013) Cannabidiol inhibits THC-elicited paranoid symptoms and hippocampal-dependent memory impairment. *J Psychopharmacol* 27(1):19-27.
57. Ryan D, Drysdale AJ, Lafourcade C, Pertwee RG, Platt B (2009) Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca^{2+} levels. *J Neurosci* 29(7): 2053-2063.

58. de Lima MN, Presti-Torres J, Garcia VA, Guimarães MR, Scalco FS, Roesler R et al (2008) Amelioration of recognition memory impairment associated with iron loading or aging by the type 4-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram in rats. *Neuropharmacology* 55(5):788-792.
59. Perez VP, de Lima MN, da Silva RS, Dornelles AS, Vedana G, Bogo MR et al (2010) Iron leads to memory impairment that is associated with a decrease in acetylcholinesterase pathways. *Curr Neurovasc Res* 7(1):15-22.

Table 1: Sequences of forward (F) and reverse (R) primers used in quantitative Real-time PCR analysis

Protein	Gene	Accession Number	Primers (5'-3')
Caspase 3 ^b	<i>CASP3</i>	NM_012922	F-AAGATACCAGTGGAGGCCGACTTC R-GGGAGAAGGACTCAAATTCCGTGG
DNM1L ^b	<i>DNM1L</i>	NM_053655	F-AGAATATTCAAGACAGCGTCCCAAAG R-CGCTGTGCCATGTCCTCGGATTC
GAPDH ^a	<i>GAPDH</i>	NM_017008	F-TCACCACCATGGAGAAGGC R- GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA
HPRT1 ^a	<i>HPRT1</i>	NM_012583	F-GCAGACTTTGCTTTCCTTGG R-CGAGAGGTCCTTTTCACCAG
OPA1 ^b	<i>OPA1</i>	BC111071	F-AAGAACCTGGAATCTCGAGGAGTCG R-CCAGAACAGGACCACGTCGTTGC
RPL13A ^a	<i>RPL13A</i>	NM_173340	F- ACAAGAAAAAGCGGATGGTG R- TTCCGGTAATGGATCTTTGC
Synaptophysin ^b	<i>SYP</i>	NM_012664	F-CTTTCTGGCTACAGCCGTGTTCG R-GTTCCTGTCTGGCGGCACATG

^a According to [41].

^b Designed by authors.

Figure Captions

Fig. 1 Western Blotting of Dynamin-1-like protein (DNM1L) fission protein expression in the hippocampus (a) and cortex (b) of rats treated with sorbitol (Sorb) or iron neonatally and treated with vehicle (Veh) or cannabidiol (CBD) chronically in adulthood (3 months of age). 25µg of protein, normalized to β-actin, were separated on SDS-PAGE and probed with specific antibodies. Representative Western Blots for DNM1L and β-actin in the hippocampus (c) and in the cortex (d) are shown. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey HSD post-hoc. Data expressed as mean ± S.E.M. N = 3 - 5 per group. Differences between Sorb-Veh vs. Iron-Veh are indicated as ** p <0.01.

Fig. 2 Relative *DNM1L* gene expression in the hippocampus (a) and cortex (b) of 3-month-old rats treated with sorbitol (Sorb) or iron neonatally and treated with vehicle (Veh) or cannabidiol (CBD) chronically. Samples obtained from six animals in each group were normalized to three reference genes (*GAPDH*, *HPRT1*, and *RPL13A*) and run in quadruplicate. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by LSD post-hoc. Data expressed as mean ± S.E.M. Difference between Sorb-Veh vs. Iron-Veh is indicated as * p <0.05; difference between Iron-Veh vs. Iron-CBD is indicated as ++ p <0.01.

Fig. 3 Western Blotting of Optic atrophy 1 (OPA1) fusion protein expression in the hippocampus (a) and cortex (b) of 3-month-old rats treated with sorbitol (Sorb) or iron neonatally and treated with vehicle (Veh) or cannabidiol (CBD) chronically. 25µg of protein, normalized to β-actin, were separated on SDS-PAGE and probed with specific antibodies. Representative Western Blots for OPA1 and β-actin in the hippocampus (c) and in the cortex (d) are shown. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey

HSD post-hoc. Data expressed as mean \pm S.E.M. N = 4 - 6 per group. Differences between Sorb-Veh vs. other groups are indicated as * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Fig. 4 Relative *OPA1* gene expression in the hippocampus (a) and cortex (b) of 3-month-old rats treated with sorbitol (Sorb) or iron neonatally and treated with vehicle (Veh) or cannabidiol (CBD) chronically. Samples obtained from six animals in each group were normalized to three reference genes (*GAPDH*, *HPRT1*, and *RPL13A*) and run in quadruplicate. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by LSD post-hoc. Data expressed as mean \pm S.E.M. No statistically significant differences were found among groups.

Fig. 5 Western Blotting of Synaptophysin protein expression in the hippocampus (a) and cortex (b) of 3-month-old rats treated with sorbitol (Sorb) or iron neonatally and treated with vehicle (Veh) or cannabidiol (CBD) chronically. 25 μ g of protein, normalized to β -actin, were separated on SDS-PAGE and probed with specific antibodies. Representative Western Blots for synaptophysin and β -actin in the hippocampus (c) and in the cortex (d) are shown. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey HSD post-hoc. Data expressed as mean \pm S.E.M. N = 4 - 6 per group. Differences between Sorb-Veh vs. Iron-Veh are indicated as * $p < 0.05$; difference between Iron-Veh vs. Iron-CBD is indicated as ++ $p < 0.01$.

Fig. 6 Relative Synaptophysin gene expression in the hippocampus (a) and cortex (b) of 3-month-old rats treated with sorbitol (Sorb) or iron neonatally and treated with vehicle (Veh) or cannabidiol (CBD) chronically. Samples obtained from six animals in each group were normalized to three reference genes (*GAPDH*, *HPRT1*, and *RPL13A*) and run in

quadruplicate. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by LSD post-hoc. Data expressed as mean \pm S.E.M. No significant differences were found among groups.

Fig. 7 Western Blotting of caspase 3 protein expression in the hippocampus (a) and cortex (b) of 3-month-old rats treated with sorbitol (Sorb) or iron neonatally and treated with vehicle (Veh) or cannabidiol (CBD) chronically. 25 μ g of protein, normalized to β -actin, were separated on SDS-PAGE and probed with specific antibodies. Representative Western Blots for caspase 3 and β -actin in the hippocampus (c) and in the cortex (d) are shown. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey HSD post-hoc. Data expressed as mean \pm S.E.M. N = 4 - 6 per group. Differences between Sorb-Veh vs. other groups are indicated as ** p <0.01; difference between Iron-Veh vs. Iron-CBD is indicated as ++ p <0.01.

Fig. 8 Relative caspase 3 gene expression in the hippocampus (a) and cortex (b) of 3-month-old rats treated with sorbitol (Sorb) or iron neonatally and treated with vehicle (Veh) or cannabidiol (CBD) chronically. Samples obtained from six animals in each group were normalized to three reference genes (*GAPDH*, *HPRT1*, and *RPL13A*) and run in quadruplicate. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by LSD post-hoc. Data expressed as mean \pm S.E.M. Differences between Sorb-Veh vs. Iron-Veh are indicated as * p <0.05.

Figure 1

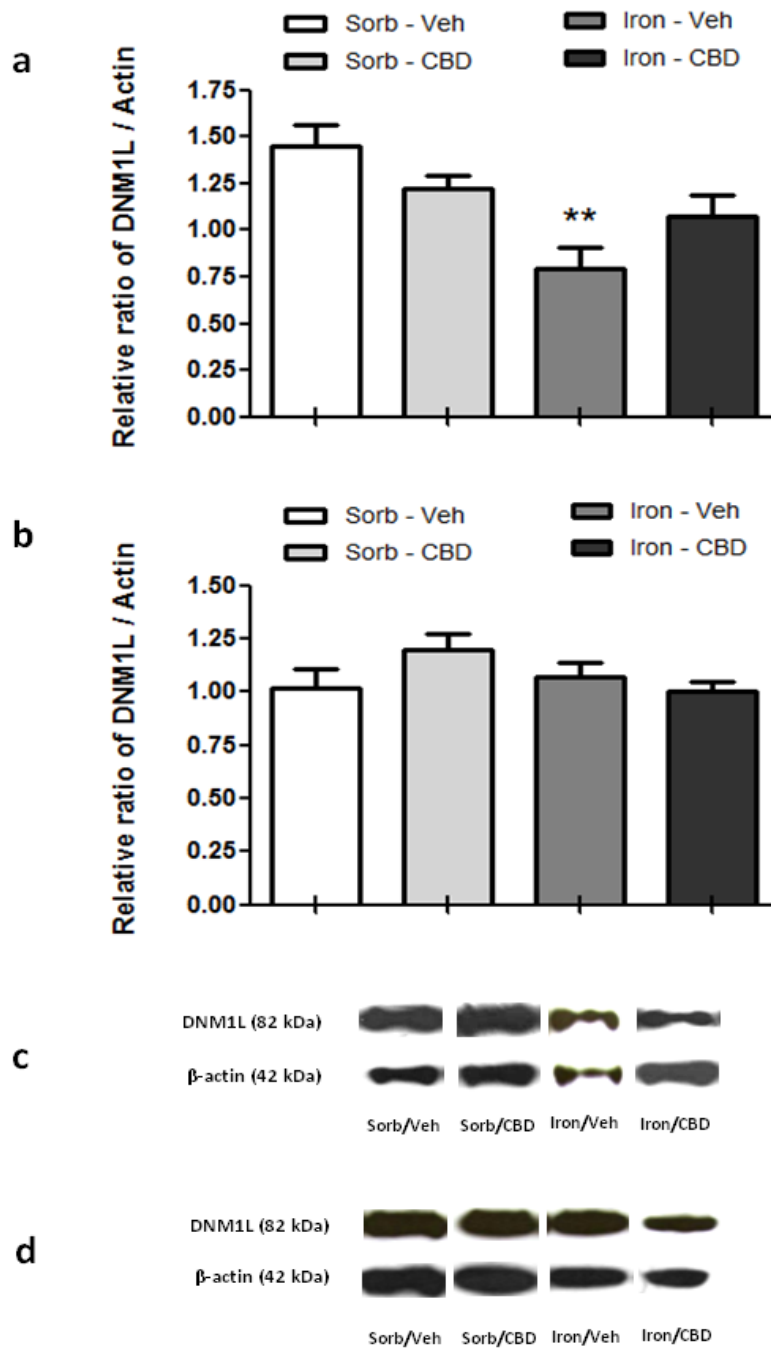


Figure 2

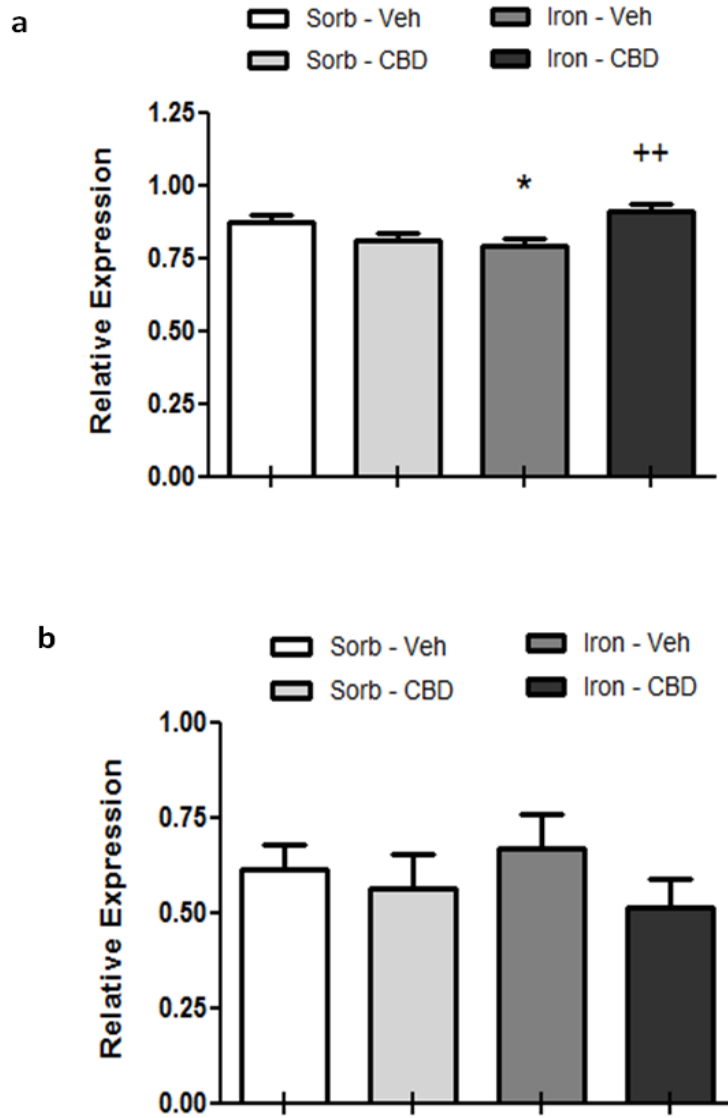


Figure 3

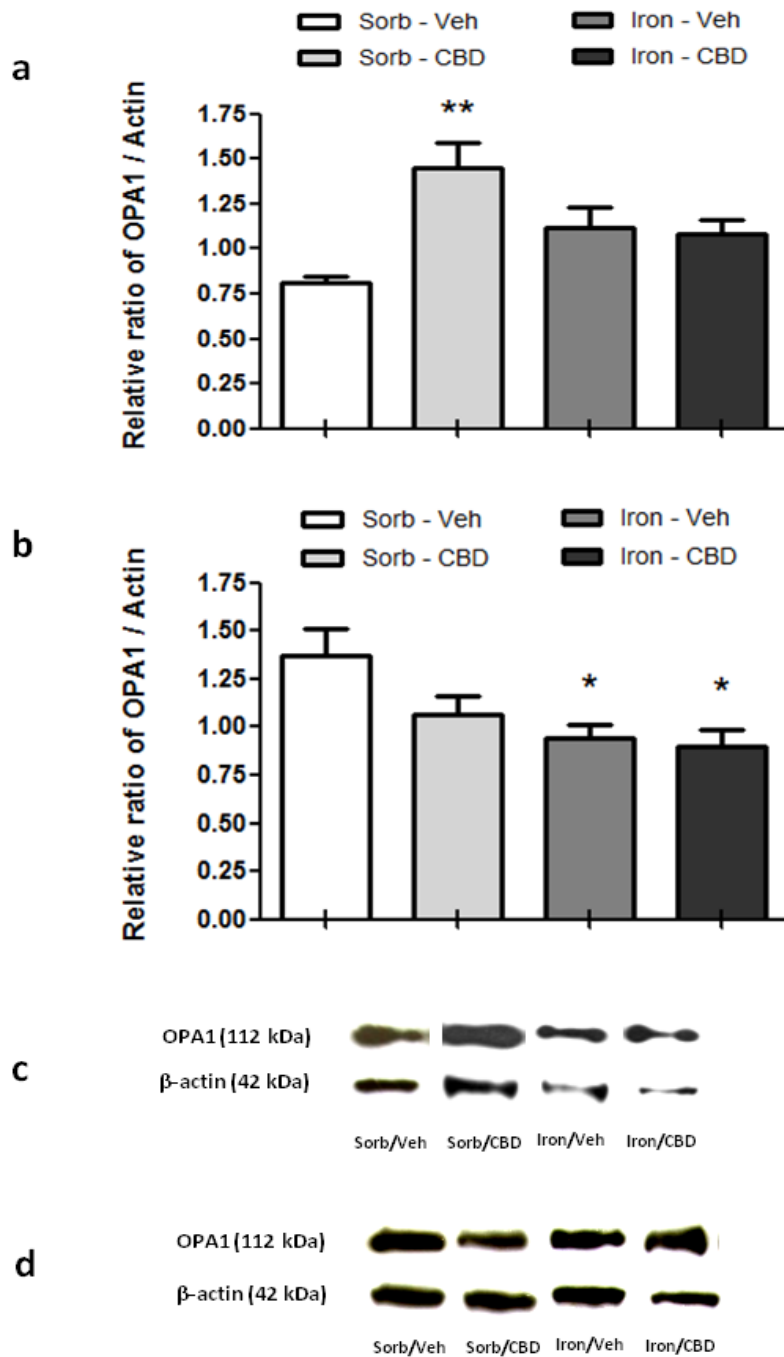


Figure 4

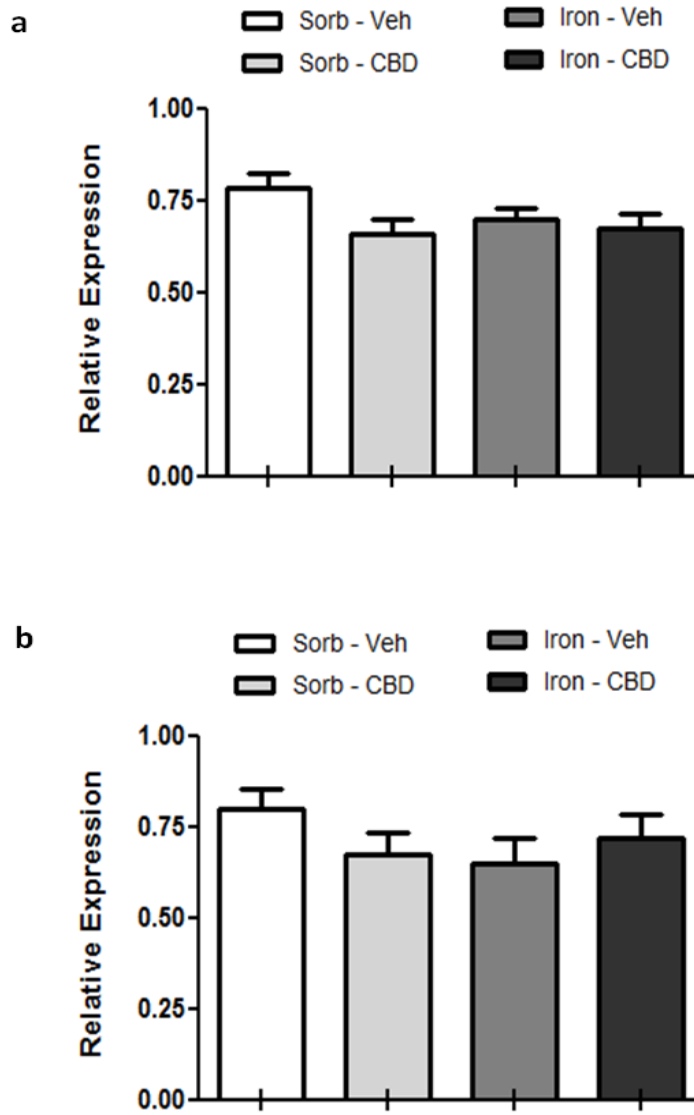


Figure 5

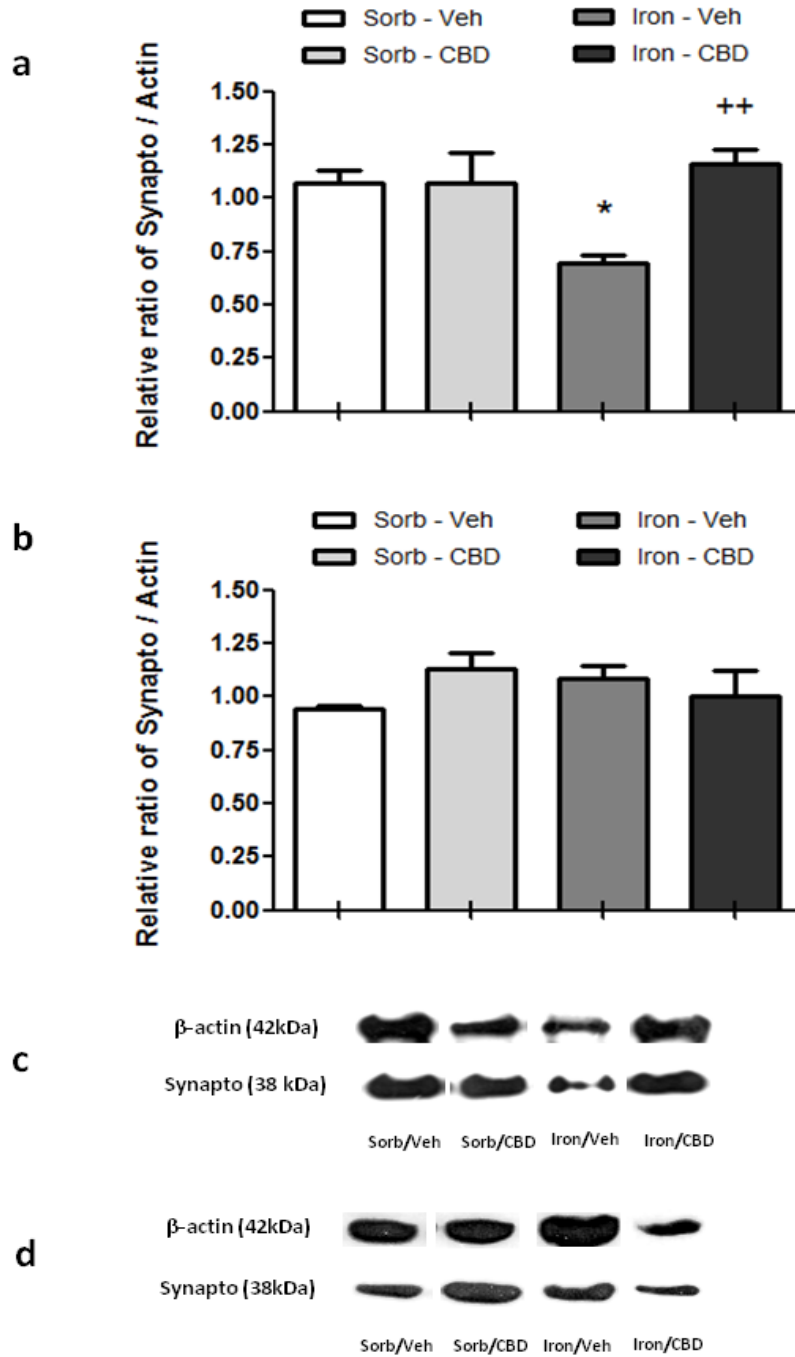


Figure 6

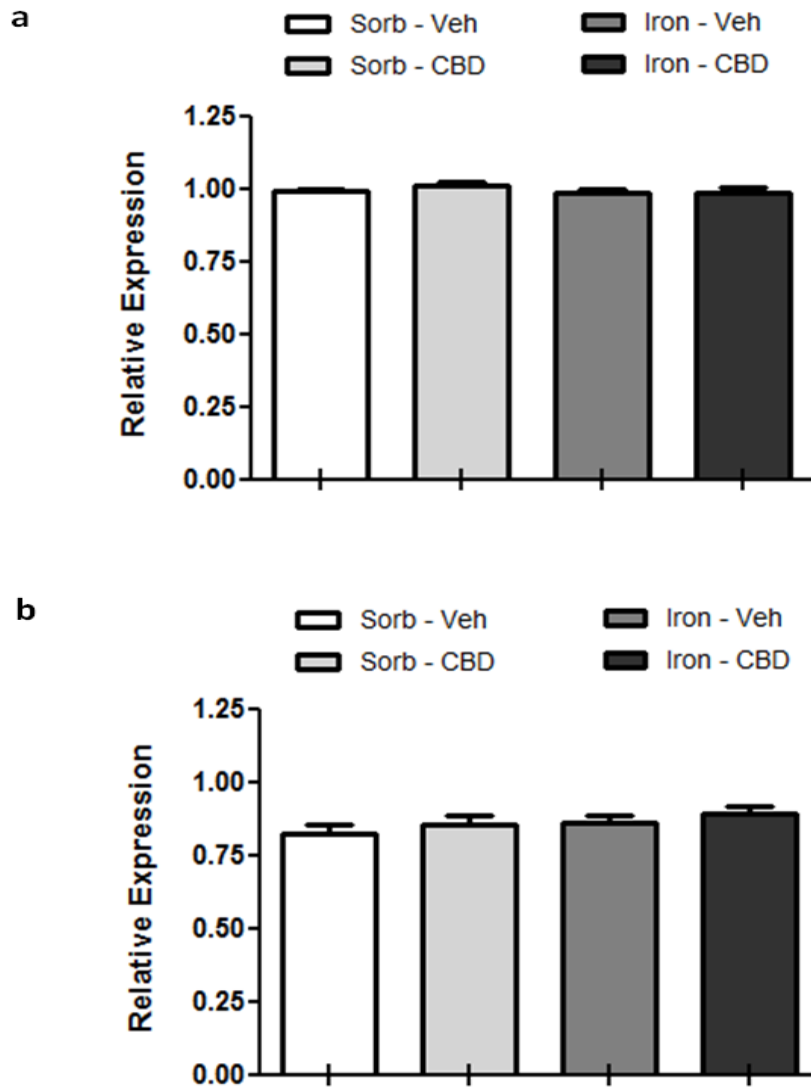


Figure 7

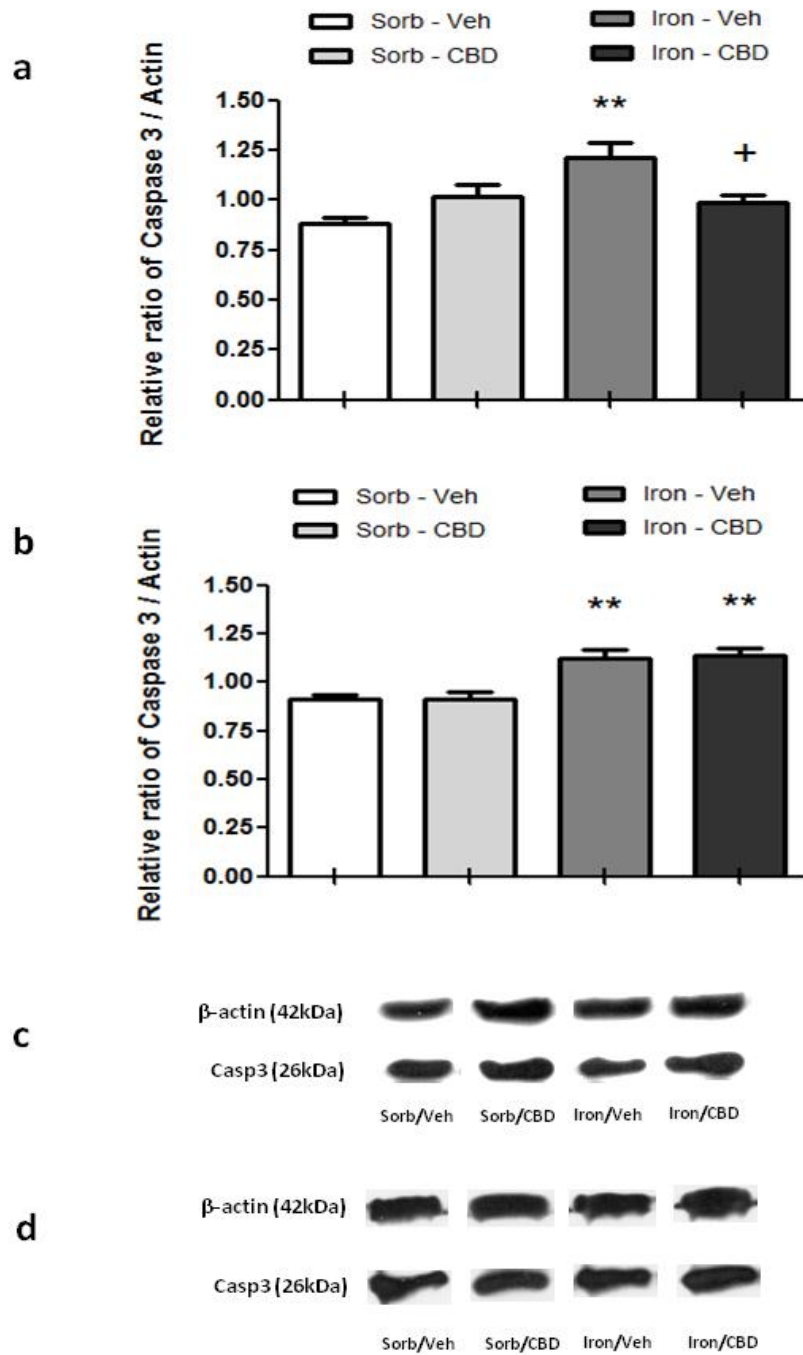
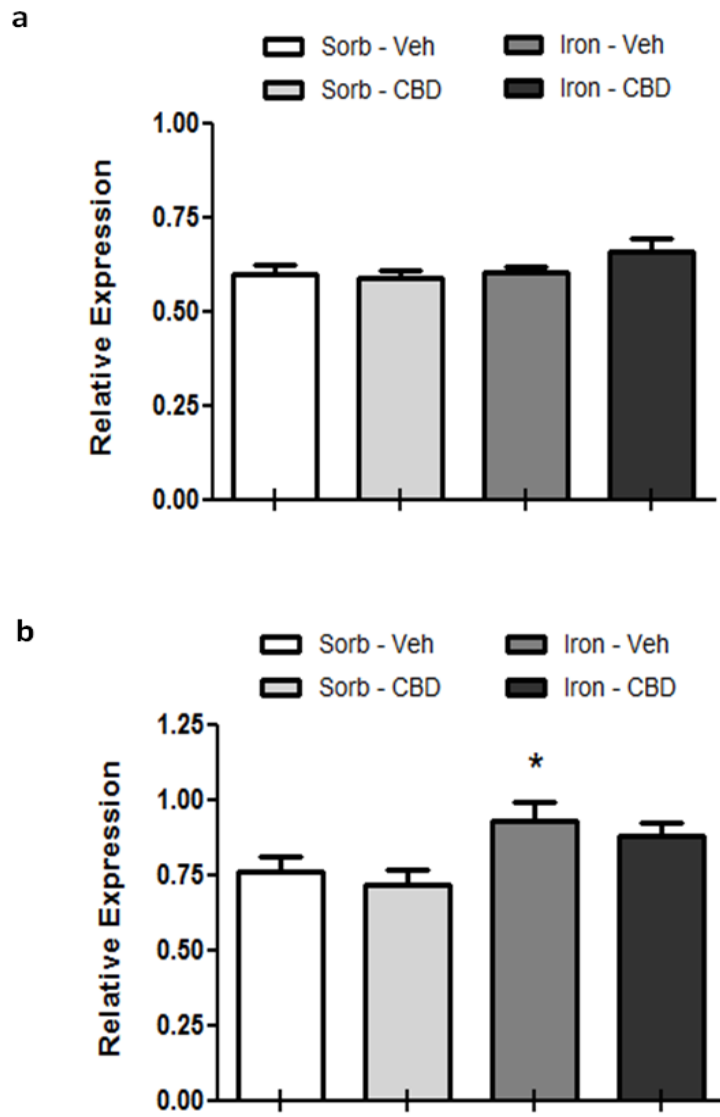


Figure 8



CAPÍTULO 3

3.1 CONCLUSÕES

- O tratamento neonatal com ferro ocasiona uma redução da expressão gênica e proteica de DNM1L no hipocampo.
- O tratamento neonatal com ferro ocasiona uma redução da expressão protéica de OPA1 no córtex.
- O tratamento neonatal com ferro ocasiona um aumento da expressão proteica de Caspase 3 tanto no hipocampo quanto no córtex, acompanhado de aumento da expressão gênica no córtex.
- O tratamento neonatal com ferro ocasiona uma redução da expressão proteica de Sinaptofisina no hipocampo.
- O tratamento crônico com CBD restaura a expressão gênica e protéica de DNM1L no hipocampo após a redução ocasionada pela administração de ferro no período neonatal.
- O tratamento crônico com CBD ocasiona um aumento da expressão proteica de OPA1 no hipocampo em ratos tratados com sorbitol no período neonatal.
- O tratamento crônico com CBD restaura a expressão proteica de Caspase 3 no hipocampo após aumento ocasionado pela administração de ferro no período neonatal.
- O tratamento crônico com CBD restaura a expressão gênica de Caspase 3 no córtex após aumento ocasionado pela administração de ferro no período neonatal.
- O tratamento crônico com CBD restaura a expressão proteica de Sinaptofisina no hipocampo após redução ocasionada pela administração de ferro no período neonatal.

3.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando em homeostasia, o ferro é um metal essencial para muitos processos biológicos no organismo (Stankiewicz e Brass, 2009). No entanto, um desequilíbrio na quantidade desse metal, com um consequente acúmulo do mesmo, pode ocasionar diversos prejuízos, podendo ser um fator contribuinte para algumas doenças neurodegenerativas, tais como a DA e DP (Salvador *et al.*, 2010). A etiologia dessas doenças ainda não é muito conhecida, mas levando em consideração a facilidade do ferro em doar elétrons para o oxigênio, podendo levar à formação de radicais livres através da Reação de Fenton, acredita-se que o estresse oxidativo tenha um significativo papel na neurodegeneração (Mills *et al.*, 2010).

As mitocôndrias possuem um papel essencial na produção de ATP para os processos metabólicos celulares, sendo que o sistema nervoso, devido a sua alta taxa metabólica, é bastante dependente dessas organelas (Kann e Kovács, 2007; Oettinghaus *et al.*, 2012). Por causa disso, quaisquer disfunções no metabolismo das mitocôndrias podem culminar em conseqüências nas células nervosas (Wang *et al.*, 2009a). A perda de suplementação energética nas sinapses pode modificar a viabilidade e funcionalidade dos circuitos neuronais (Harris *et al.*, 2012) e uma vez a sinalização sináptica reduzida, essas células podem ativar processos de morte celular, como a apoptose (Shimada *et al.*, 2003). Além disso, a própria mitocôndria também exerce um papel na iniciação e execução de apoptose e outros tipos de morte celular (Bossy-Wetzel *et al.*, 2003).

Tendo em vista já existir um modelo animal de ratos bem estabelecido de sobrecarga de ferro no período neonatal, resultando no acúmulo desse metal e em danos oxidativos em regiões sabidamente mais afetadas em doenças neurodegenerativas e consequente déficit de memória (Fredriksson *et al.*, 1999; Schröder *et al.*, 2001; de Lima *et al.*, 2005), esse trabalho teve como objetivo analisar os mecanismos de ação do ferro nesse modelo.

Os nossos resultados demonstraram que o ferro foi capaz de provocar uma alteração na dinâmica mitocondrial, reduzindo os níveis de DNM1L e OPA1 no hipocampo e córtex, respectivamente. Combinado a isso, pudemos observar que o ferro foi capaz de aumentar os níveis de caspase 3 no hipocampo e córtex, sendo acompanhado da redução de sinaptofisina no hipocampo. Isso nos leva a sugerir e propor um modelo no qual o estresse oxidativo ocasionado pelo ferro provoca uma disfunção mitocondrial, desencadeando uma modificação na funcionalidade dessa organela. Disfunções nessas organelas responsáveis pela produção de

ATP podem levar a um declínio da viabilidade sináptica e essas duas situações, em conjunto, podem desencadear aumento de morte neuronal, entre outros mecanismos, pelo aumento de processos apoptóticos.

À necessidade de compreensão da etiologia das doenças neurodegenerativas, soma-se a busca por estratégias de prevenção e tratamento dessas doenças. Nesse trabalho, objetivamos investigar o potencial terapêutico do CBD, uma vez que, apesar de já terem sido descritas propriedades antioxidantes (Hampson *et al.*, 1998; García-Arencibia *et al.*, 2007) e antiapoptóticas (Castillo *et al.*, 2010; Iuvone *et al.* 2004), os mecanismos de ação do CBD ainda não foram muito bem estudados. Prévios estudos realizados pelo nosso grupo já haviam demonstrado que o CBD possui um potencial papel como agente restaurador de prejuízos cognitivos provocados pelo ferro (Fagherazzi *et al.*, 2012) e nossas recentes análises mostraram que o CBD foi capaz de recuperar os danos causados na DNM1L, sinaptofisina e caspase 3 hipocampais, corroborando com um possível papel neuroprotetor para essa droga.

Em conclusão, esse trabalho demonstra que uma sobrecarga de ferro pode afetar a dinâmica mitocondrial e possivelmente desencadear redução sináptica e morte celular por apoptose, podendo o CBD ser uma droga de proteção para o sistema nervoso. Espera-se que esse estudo possa contribuir a outras pesquisas na busca de um melhor entendimento do estresse oxidativo ocasionado pelo ferro, da contribuição mitocondrial nesse processo e da possível estratégia terapêutica utilizando CBD.

REFERÊNCIAS

- ALBERGHINA, L.; COLANGELO, A. M. The modular systems biology approach to investigate the control of apoptosis in Alzheimer's disease neurodegeneration. **BMC Neuroscience**, v. 7, supl 1:S2, 2006.
- ASHRAF, Q. M.; MISHRA, O. P.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. Mechanisms of expression of apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) in nuclear, mitochondrial and cytosolic fractions of the cerebral cortex of newborn piglets. **Neuroscience Letters**, v. 415, n. 3, p. 253–258, 2007.
- BISOGNO, T.; DI MARZO, V. The role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: facts and hypotheses. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 23, p. 2299-3305, 2008.
- BISOGNO, T.; HANUS, L.; DE PETROCELLIS, L.; TCHILIBON, S.; PONDE, D. E.; BRANDI, I.; MORIELLO, A. S.; DAVIS, J. B.; MECHOULAM, R.; DI MARZO, V. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 4, p. 845 – 852, 2001.
- BOSSY-WETZEL, E.; BARSOUM, M. J.; GODZIK, A.; SCHWARZENBACHER, R.; LIPTON, S. A. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 706-716, 2003.
- CAMPIONI, M.; SANTINI, D.; TONINI, G.; MURACE, R.; DRAGONETTI, E.; SPUGNINI, E. P.; BALDI, A. Role of Apaf-1, a key regulator of apoptosis, in melanoma progression and chemoresistance. **Experimental Dermatology**, v. 14, n. 11, p. 811–818, 2005.
- CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 199, n. 2, p. 223-30, 2008.
- CASTILLO, A.; TOLÓN, M. R.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J.; ROMERO, J.; MARTINEZ-ORGADO, J. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 2, p. 434-440, 2010.
- CERVENY, K. L.; TAMURA, Y.; ZHANG, Z.; JENSEN, R. E.; SESAKI, H. Regulation of mitochondrial fusion and division. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 11, p. 563-569, 2007.
- CHAN, D. C. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. **Cell**, v. 125, n. 7, p. 1241-1252, 2006.
- CHEN, H.; CHAN, D. C. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 2, p. R283-R289, 2005.

CHO, D. H.; NAKAMURA, T.; LIPTON, S. A. Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 67, n. 20, p. 3435-3447, 2010.

COLLARD, K. J. Iron homeostasis in the neonate. **Pediatrics**, v. 123, n. 4, p. 1208-1216, 2009.

DE LIMA, M. N.; POLYDORO, M.; LARANJA, D. C.; BONATTO, F.; BROMBERG, E.; MOREIRA, J. C.; DAL-PIZZOL, F.; SCHRÖDER, N. Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. **The European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 9, p. 2521-2528, 2005.

DE MAGALHÃES, J. P.; SANDBERG, A. Cognitive aging as an extension of brain development: a model linking learning, brain plasticity and neurodegeneration. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 10, p. 1026-1033, 2005.

DOWNES, E. C. Loss of synaptophysin and synaptosomal-associated protein 25-kDa (SNAP-25) in elderly Down syndrome individuals. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 34, n. 1, p. 12-22, 2008.

DWORK, A. J.; LAWLER, G.; ZYBERT, P. A.; DURKIN, M.; OSMAN, M.; WILLSON, N.; BARKAI, A. I. An autoradiographic study of the uptake and distribution of iron by the brain of the young rat. **Brain research**, v. 518, n. 1-2, p. 31-39, 1990.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FAGHERAZZI, E. V.; GARCIA, V. A.; MAURMANN, N.; BERVANGER, T.; HALMENSCHLAGER, L. H.; BUSATO, S. B.; HALLAK, J. E.; ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A.; SCHRÖDER, N. Memory-rescuing effects of cannabidiol in an animal model of cognitive impairment relevant to neurodegenerative disorders. **Psychopharmacology**, v. 219, n. 4, p. 1133-1140, 2012.

FERNANDEZ, L. L.; DE LIMA, M. N.; SCALCO, F.; VEDANA, G.; MIWA, C.; HILBIG, A.; VIANNA, M.; SCHRÖDER, N. Early post-natal iron administration induces astroglial response in the brain of adult and aged rats. **Neurotoxicity Research**, v. 20, n. 2, p. 193-199, 2011.

FREDRIKSSON, A.; SCHRÖDER, N.; ERIKSSON, P.; IZQUIERDO, I.; ARCHER, T. Neonatal iron exposure induces neurobehavioural dysfunctions in adult mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 159, n. 1, p. 25-30, 1999.

GARCÍA-ARENCIBIA, M.; GONZÁLEZ, S.; DE LAGO, E.; RAMOS, J. A.; MECHOULAM, R.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: Importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. **Brain Research**, v. 1134, n. 1, p. 162-170, 2007.

GROTENHERMEN, F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 4, p. 327-360, 2003.

HAMPSON, A. J.; GRIMALDI, M.; AXELROD, J.; WINK, D. Cannabidiol and (-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 14, p. 8268–8273, 1998.

HARLAN, J.; CHEN, Y.; GUBBINS, E.; MUELLER, R.; ROCH, J. M.; WALTER, K.; LAKE, M.; OLSEN, T.; METZGER, P.; DORWIN, S.; LADROR, U.; EGAN, D. A.; SEVERIN, J.; JOHNSON, R. W.; HOLZMAN, T. F.; VOELP, K.; DAVENPORT, C.; BECK, A.; POTTER, J.; GOPALAKRISHNAN, M.; HAHN, A.; SPEAR, B. B.; HALBERT, D. N.; SULLIVAN, J. P.; ABKEVICH, V.; NEFF, C. D.; SKOLNICK, M. H.; SHATTUCK, D.; KATZ, D. A. Variants in Apaf-1 segregating with major depression promote apoptosome function. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 76–85, 2006.

HARRIS, J. J.; JOLIVET, R.; ATTWELL, D. Synaptic energy use and supply. **Neuron**, v. 75, n. 5, p. 762-777, 2012.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

IUVONE, T.; ESPOSITO, G.; ESPOSITO, R.; SANTAMARIA, R.; DI ROSA, M.; IZZO, A. A. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on β -amyloid-induced toxicity in PC12 cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, n. 1, p. 134–141, 2004.

JELLINGER, K. A. Cell death mechanisms in neurodegeneration. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2001.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W. S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biology & Therapy**, v. 4, n. 2, p. 139-163, 2005.

JOHNSTONE, D.; MILWARD, E. A. Molecular genetics approaches to understanding the rules and regulation of iron in brain health and disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, n. 6, p. 1387-1402, 2010.

JOSEPH, J.; COLE, G.; HEAD, E.; INGRAM, D. Nutrition, brain and neurodegeneration. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 41, p. 12795-12801, 2009.

KAJTA, M. Apoptosis in the central nervous system: mechanisms and protective strategies. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 689–700, 2004.

KANN, O.; KOVÁCS, R. Mitochondria and neuronal activity. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 292, n. 2, p. C641-C657, 2007.

KING, D. L.; ARENDASH, G. W. Maintained synaptophysin immunoreactivity in Tg2576 transgenic mice during aging: correlations with cognitive impairment. **Brain Research**, v. 926, n. 1-2, p. 58–68, 2002.

LIU, W.; TIAN, F.; KURATA, T.; MORIMOTO, N.; ABE, K. Dynamic changes of mitochondrial fusion and fission proteins after transient cerebral ischemia in mice. **Journal of Neuroscience Research**, v. 90, n. 6, p. 1183-1189, 2012.

MANCZAK, M.; CALKINS, M. J.; REDDY, P. H. Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 13, p. 2495-2509, 2011.

MANCZAK, M.; REDDY, P. H. Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 11, p. 2538-2547, 2012.

MATTSON, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 1, n. 2, p. 120-129, 2000.

MILLS, E.; DONG, X. P.; WANG, F.; XU, H. Mechanisms of Brain Iron Transport: Insight into Neurodegeneration and CNS Disorders. **Future Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 51-64, 2010.

MISHIMA, K.; HAYAKAWA, K.; ABE, K.; IKEDA, T.; EGASHIRA, N.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M. Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-hydroxytryptamine 1A receptor-dependent mechanism. **Stroke**, v. 36, n. 5, p. 1077-1082, 2005.

MIWA, C. P.; DE LIMA, M. N.; SCALCO, F.; VEDANA, G.; MATTOS, R.; FERNANDEZ, L. L.; HILBIG, A.; SCHRÖDER, N.; VIANNA, M. R. Neonatal iron treatment increases apoptotic markers in hippocampal and cortical areas of adult rats. **Neurotoxicity Research**, v. 19, n. 4, p. 527-535, 2011.

OETTINGHAUS, B.; LICCI, M.; SCORRANO, L.; FRANK, S. Less than perfect divorces: dysregulated mitochondrial fission and neurodegeneration. **Acta Neuropathologica**, v. 123, n. 2, p. 189-203, 2012.

OKOUCHI, M.; EKSHYYAN, O.; MARACINE, M.; AW, T. Y. Neuronal apoptosis in neurodegeneration. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 8, p. 1059-96, 2007.

PERTWEE, R. G. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. **International Journal of Obesity**, v. 30, p. S13-S18, 2006.

RYBERG, E.; LARSSON, N.; SJÖGREN, S.; HJORTH, S.; HERMANSSON, N. O.; LEONOVA, J.; ELEBRING, T.; NILSSON, K.; DRMOTA, T.; GREASLEY, P. J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 7, p. 1092-1101, 2007.

SALVADOR, G. A.; URANGA, R. M.; GIUSTO, N. M. Iron and mechanisms of neurotoxicity. **International Journal of Alzheimer Disease**, v. 2011, 2010.

SARNAT, H. B.; FLORES-SARNAT, L.; TREVENEN, C. L. Synaptophysin immunoreactivity in the human hippocampus and neocortex from 6 to 41 weeks of gestation. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 69, n. 3, p. 234-245, 2010.

SCHRÖDER, N.; FREDRIKSSON, A.; VIANNA, M. R.; ROESLER, R.; IZQUIERDO, I.; ARCHER, T. Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. **Behavioural Brain Research**, v. 124, n. 1, p. 75-85, 2001.

SCUDERI, C.; FILIPPIS, D. D.; IUVONE, T.; BLASIO, A.; STEARDO, A.; ESPOSITO, G. Cannabidiol in medicine: a review of its therapeutic potential in CNS disorders. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 5, p. 597-602, 2009.

SEVCÍK, J.; MASEK, K. Potential role of cannabinoids on parkinson's disease. **Drug & Aging**, v. 16, n. 6, p. 391-395, 2000.

SHIMADA, A.; KEINO, H.; SATOH, M.; KISHIKAWA, M.; HOSOKAWA, M. Age-related loss of synapses in the frontal cortex of SAMP10 mouse: A model of cerebral degeneration. **Synapse**, v. 48, n. 4, p. 198-204, 2003.

SHIRENDEB, U.; REDDY, A. P.; MANCZAK, M.; CALKINS, M. J.; MAO, P.; TAGLE, D. A.; REDDY, P. H. Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: implications for selective neuronal damage. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 7, p. 1438-1455, 2011.

SHOJO, H.; KIBAYASHI, K. Changes in localization of synaptophysin following fluid percussion injury in the rat brain. **Brain Research**, v. 1078, n. 1, p. 198-211, 2006.

STANKIEWICZA, J. M.; BRASS, S. D. Role of iron in neurotoxicity: a cause for concern in the elderly? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 12, n. 1, p. 22-29, 2009.

STAPLE, J. K.; MORGENTHALER, F.; CATSICAS, S. Presynaptic Heterogeneity: Vive la difference. **News in Physiological Science**, v. 15, p. 45-49, 2000.

TAYLOR, E. M.; MORGAN, E. H. Developmental changes in transferring and iron uptake by the brain in the rat. **Brain research. Developmental brain research**, v. 55, n. 1, p. 35-42, 1990.

THOMAS, M.; JANKOVIC, J. Neurodegenerative disease and iron storage in the brain. **Current Opinion in Neurology**, v. 17, n. 4, p. 437-442, 2004.

TROY, C. M.; SALVESEN, G. S. Caspases on the brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 69, n. 2, p. 145-150, 2002.

WANG, X.; SU, B.; LEE, H. G.; LI, X.; PERRY, G.; SMITH, M. A.; ZHU, X. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 28, p. 9090-9103, 2009b.

WANG, X.; SU, B.; ZHENG, L.; PERRY, G.; SMITH, M. A.; ZHU, X. The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, Suppl 1, p. 153-15, 2009a.

WYLLIE, A. H. "Where, o death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. **Molecular Neurobiology**, v. 42, n. 1, p. 4-9, 2010.

YOULE, R. J.; KARBOWSKI, M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 6, n. 8, p. 657-663, 2005.

ZECCA, L.; YOUDIM, M. B.; RIEDERER, P.; CONNOR, J. R.; CRICHTON, R. R. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 5, n. 11, p. 863-873, 2004.

ZUARDI, A. W. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 30, n. 3, p. 271-80, 2008.

ANEXO - Comprovante de submissão do artigo

De: em_moln.0.32ae10.6100fadb@editorialmanager.com
[\[em_moln.0.32ae10.6100fadb@editorialmanager.com\]](mailto:em_moln.0.32ae10.6100fadb@editorialmanager.com) em nome de Molecular Neurobiology
[\[zdavis@lsuhsc.edu\]](mailto:zdavis@lsuhsc.edu)

Enviado: quinta-feira, 25 de abril de 2013 22:30

Para: Nadja Schroder

Assunto: Molecular Neurobiology - Manuscript Number Assigned (#MOLN-D-13-00080)

Apr 25, 2013

Dear Dr. Schröder,

Your submission entitled "Cannabidiol normalizes caspase 3, synaptophysin, and mitochondrial fission protein DNM1L expression levels in rats with brain iron overload: implications for neuroprotection" has been assigned the following manuscript number: MOLN-D-13-00080.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

<http://moln.edmgr.com/>

Thank you for submitting your work to Molecular Neurobiology.

Sincerely,
Zevie Davis , MS for
Nicolas G. Bazan, M.D., Ph.D.
Editor in Chief, Molecular Neurobiology

De: em_moln.0.32ad66.8d7a7a6d@editorialmanager.com
[\[em_moln.0.32ad66.8d7a7a6d@editorialmanager.com\]](mailto:em_moln.0.32ad66.8d7a7a6d@editorialmanager.com) em nome de Molecular Neurobiology
[\[zdavis@lsuhsc.edu\]](mailto:zdavis@lsuhsc.edu)

Enviado: quinta-feira, 25 de abril de 2013 19:40

Para: Nadja Schroder

Assunto: Acknowledgement of Receipt

Apr 25, 2013

Dear Dr. Schröder:

This is to acknowledge receipt of your manuscript titled "Cannabidiol normalizes caspase 3, synaptophysin, and mitochondrial fission protein DNM1L expression levels in rats with brain iron overload: implications for neuroprotection." Your manuscript number will be sent to you in a second email.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://moln.edmgr.com/>

Your username is: Nschroder

Your password is: schröder323345

Thank you very much for your contribution.

Sincerely,
Zevie Davis , MS for
Nicolas G. Bazan, M.D., Ph.D.
Editor in Chief, Molecular Neurobiology

P.S.: If your manuscript is accepted for publication in Molecular Neurobiology, you may wish to have it published with open access in our Open Choice program. For information about the Open Choice program, please access the following URL: <http://www.springer.com/openchoice>.