



**Evaluación del efecto del Cannabidiol en células tipo neuronales dopaminérgicas intoxicadas con Paraquat y Maneb como modelo *in vitro* de la Enfermedad de Parkinson**

Andrea Alexandra Felizardo Otálvaro

Trabajo de grado presentado para optar al título de Bióloga

Asesor

Miguel Ángel Mendivil Pérez, MSc., PhD.

Universidad de Antioquia  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Instituto de Biología  
El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia  
2022

<b>Cita</b>	(Felizardo-Otálvaro et al., 2022)
<b>Referencia</b>	Felizardo-Otálvaro, A. A., Mendivil-Pérez, M. A., Vélez-Pardo, C & Jiménez-Del-Río, M. (2022). <i>Evaluación del efecto del Cannabidiol en células tipo neuronales dopaminérgicas intoxicadas con Paraquat y Maneb como modelo in vitro de la Enfermedad de Parkinson</i> [Trabajo de grado profesional]. Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, Colombia.
<b>Estilo APA 7 (2020)</b>	



Grupo de Investigación Grupo de Neurociencias de Antioquia (GNA).

Sede de Investigación Universitaria (SIU).



Biblioteca Seccional Oriente (El Carmen de Viboral)

**Repositorio Institucional:** <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - [www.udea.edu.co](http://www.udea.edu.co)

**Rector:** John Jairo Arboleda Céspedes.

**Decano/Director:** Adriana Echeverry Isaza.

**Jefe departamento:** Ana Esperanza Franco.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

## **Evaluación del efecto del Cannabidiol en células tipo neuronales dopaminérgicas intoxicadas con Paraquat y Maneb como modelo *in vitro* de la Enfermedad de Parkinson**

Andrea Alexandra Felizardo Otálvaro<sup>1,2</sup>, Miguel Ángel Mendivil Pérez<sup>1</sup>, Carlos Vélez Pardo<sup>1\*</sup>, Marlene Jiménez Del Río<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Neurodegenerativas, Grupo de Neurociencias de Antioquia, Universidad de Antioquia.

<sup>2</sup>Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Seccional Oriente.

\* Autor correspondencia: Marlene Jiménez-Del-Río (marlene.jimenez@udea.edu.co). Calle 62 #52-59, Torre 1, laboratorio 412, Grupo de Neurociencias, SIU, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Número de páginas: 18; Número de figuras: 6; Número de figuras suplementarias: 0; Número de tablas: 0; Número de palabras: 7032; Resumen: 238; Introducción: 1210; Discusión: 664.

**Abreviaciones:** EP, Enfermedad de Parkinson; EO, estrés oxidativo; ROS, especies reactivas de oxígeno; CME-SM, células estromales mesenquimales de sangre menstrual; nDA, neuronas dopaminérgicas;  $\Delta\Psi_m$ , potencial de membrana mitocondrial; MB, manebl; PQ, paraquat; CBD, cannabidiol; D9-THC, tetrahidrocannabinol; DJ-1, proteína deglicasa DJ-1; CAS-3, proteína caspasa 3; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; DAT, proteína transportadora de dopamina; TH, proteína tiroxina hidroxilasa; ROI, región de interés; MFI, intensidad de fluorescencia media.

**Declaración de significancia:** Este trabajo evidencia que el CBD es un metabolito prometedor como terapia sintomática y retardante para la Enfermedad de Parkinson. Estos hallazgos aportan conocimiento acerca de los efectos antioxidantes, antiapoptóticos y neuroprotectores del CBD sobre el estrés oxidativo y daño mitocondrial propio de la EP. Se propone una nueva visión en el modelo *in vitro* de EP con el uso combinado de PQ y MB en una línea de transdiferenciación neuronal a partir de células estromales mesenquimales derivadas de sangre menstrual.

### **Resumen**

Las neuronas dopaminérgicas son las células neuronales responsables de la síntesis y liberación del neurotransmisor Dopamina y de múltiples funciones motoras del organismo. Cuando estas se degeneran, se producen síndromes parkinsonianos, entre ellos la Enfermedad de Parkinson (EP),

cuyo trastorno se caracteriza por la pérdida de la mayoría de este tipo de neuronas en la sustancia negra *pars compacta* del sistema nervioso central, desencadenando múltiples síntomas motores y no motores muy característicos. Patológicamente la EP presenta neuroinflamación, daño mitocondrial y estrés oxidativo debido a la producción exacerbada de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los cannabinoides son candidatos para modular estos procesos y aumentar la neurogénesis. El conocimiento de los efectos de estos compuestos puede ayudar en la construcción de estrategias terapéuticas alternativas para la EP. Por esta razón, en el presente trabajo se evaluó el efecto de un fitometabolito cannábico prometedor (Cannabidiol) sobre diferentes marcadores neuropatológicos de la EP. Para llevar a cabo este estudio, se compararon los niveles de dichos marcadores en neuronas tipo dopaminérgicas transdiferenciadas a partir de células estromales mesenquimales intoxicadas con una combinación de Paraquat y Maneb, mediante las técnicas de fluorescencia, inmunofluorescencia y citometría de flujo. El CBD reduce las ROS, incrementa el potencial de membrana mitocondrial, inhibe la muerte celular por apoptosis, además de incrementar el calcio intracelular en respuesta a la dopamina. Tomando todos estos hallazgos, se puede proponer el CBD como un candidato idóneo farmacológico a utilizar en la EP.

**Palabras clave:** Enfermedad de Parkinson, neuronas dopaminérgicas, estrés oxidativo, antioxidante, Cannabidiol, neurodegeneración, paraquat, maneb, apoptosis, células estromales mesenquimales.

## **Abstract**

Dopaminergic neurons are the neuronal cells responsible for the synthesis and release of the neurotransmitter Dopamine and multiple motor functions of the organism. When these degenerate, parkinsonian syndromes occur, among them Parkinson's disease (PD), whose disorder is characterized by the loss of most of these neurons in the substantia nigra pars compacta of the central nervous system, triggering multiple characteristic motor and non-motor symptoms. Pathologically, PD presents with neuroinflammation, mitochondrial damage and oxidative stress due to exacerbated production of reactive oxygen species (ROS). Cannabinoids are candidates for modulating these processes and enhancing neurogenesis. Knowledge of the effects of these compounds may help in the construction of alternative therapeutic strategies for PD. For this reason, in the present work we evaluated the effect of a promising cannabinoid phytometabolite (Cannabidiol) on different neuropathological markers of PD. To carry out this study, the levels of these markers were compared in transdifferentiated dopaminergic neurons from mesenchymal stromal cells intoxicated with a combination of Paraquat and Maneb, using fluorescence, immunofluorescence and flow cytometry techniques. CBD bolished ROS, increases mitochondrial membrane potential, inhibits cell death by apoptosis, and increases intracellular calcium in response to dopamine. Taking all these findings, CBD can be proposed as a suitable pharmacological candidate for use in PD.

**Keywords:** Parkinson's disease, dopaminergic neurons, oxidative stress, antioxidant, Cannabidiol, neurodegeneration, paraquat, maneb, apoptosis, mesenchymal stromal cells.

## 1. Introducción

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad crónica neurodegenerativa, y progresiva caracterizada por la presencia de cuerpos de Lewy en el mesencéfalo y la pérdida de la actividad de al menos el 60% de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra *pars compacta*, la cual presenta manifestaciones clínicas muy notables de parkinsonismo como bradicinesia, temblores, rigidez e inestabilidad postural (Bandres-Ciga et al., 2020; Bonilla-Porras et al., 2018; Dickson, 2012). Se estima que esta enfermedad afecta aproximadamente a más del 1% de la población mayor de 65 años y a más del 4% de la población mayor de 85, siendo la EP la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente del mundo después de la Enfermedad de Alzheimer. Si bien la mayoría de los casos son esporádicos, alrededor del 5% al 10% corresponden a casos de EP hereditario (Lau & Breteler, 2006 como fue citado en Burbulla & Krainc, 2019).

La incidencia de la EP en Antioquia oscila alrededor de 30,7 individuos por cada 100.000 habitantes, mientras que la incidencia del Parkinsonismo (es de 42,1 individuos por cada 100.000 habitantes (Sánchez et al., 2004). Esto se traduce en un estimativo total de aproximadamente 180.000 pacientes en Colombia, por lo que la EP se convierte en un grave problema de salud pública en nuestro país, que requiere de la intervención investigativa para la búsqueda de estrategias que ayuden a disminuir su impacto en la población (Diazgranados Sánchez et al., 2011).

Aunque los síntomas de la EP varían mucho entre los pacientes, clínicamente esta enfermedad se caracteriza por el temblor, el cual es el síntoma más importante con el 75% de los casos; la bradicinesia, es un síntoma muy discapacitante y es el responsable de la dificultad y bloqueo para realizar movimientos; así como la rigidez, la cual es provocada por el aumento del tono muscular, produciendo una mayor resistencia a la ejecución de los movimientos pasivos en las extremidades afectadas (Diazgranados Sánchez et al., 2011).

A pesar de que los procesos subyacentes a las causas de la EP no han sido completamente establecidos y claros, investigaciones recientes sugieren que podría ser originada por varios mecanismos entre los que se pueden destacar el estrés oxidativo (EO) y la predisposición genética que da lugar a la EP familiar (o hereditaria) (Lill, 2016; Papa & De Rasmio, 2013). En el desarrollo de la EP familiar, se han podido describir más de 7 alteraciones genéticas involucradas en su causalidad, entre ellas las de los genes: SNCA, LRRK2, VPS35, PINK1, DJ-1, DNAJC6, PARK2 y GBA (Lill, 2016).

Recientes estudios sugieren que proteínas como DJ-1 están asociadas al control del EO y juegan un rol importante en el control celular y homeostasis, destacándose que DJ-1 Cys-106 se modifica en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resaltando así el papel de DJ-1 en la modulación de la respuesta mitocondrial

contra EO (Bonilla-Porras et al., 2018). Esto indica que las mutaciones en algunos genes específicos presentes en las neuronas dopaminérgicas son particularmente vulnerables a la neurodegeneración por la hiper producción de ROS que inducen la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra de forma temprana, trayendo como consecuencia que los pacientes manifiesten una presentación clínica temprana de la EP, incluso desde los 13 años. Hecho que remarca la importancia de establecer un tratamiento de reposición de la población neuronal o de control del estrés oxidativo en pacientes con EP.

Basados en la importancia que tiene el EO en el desarrollo de la EP, algunos investigadores colombianos han logrado caracterizar el mecanismo molecular de acción de neurotoxinas utilizadas ampliamente como modelo de estudio de esta enfermedad, como son el paraquat y la rotenona, por medio de las cuales se puede simular el parkinsonismo *in vitro* (Mendivil-Perez et al., 2014; Quintero-Espinosa et al., 2017). Tomados en conjunto estos hallazgos, se ha establecido que estas neurotoxinas inducen muerte celular por apoptosis mediada por la producción de aniones de superóxido y  $H_2O_2$ , activando factores de transcripción, induciendo la despolarización de la membrana mitocondrial, con la consecuente activación de la proteasa caspasa-3, fragmentación nuclear y morfología apoptótica (Mendivil-Perez et al., 2014, 2016).

No obstante, a pesar de que se ha documentado la participación del EO mitocondrial como uno de los principales factores asociados al desarrollo de la EP y la actividad de factores de transcripción y efectores de muerte celular en los modelos celulares (Lotankar et al., 2017), infortunadamente, hasta el presente no existen terapias efectivas tanto que disminuyan o detengan el daño oxidativo, como que eviten la activación de las vías de muerte celular por apoptosis y la progresión de la EP.

En este sentido, es razonable pensar que el aumento del sistema de defensa celular no-enzimático, como es el caso de los antioxidantes y el aumento de la protección mitocondrial, podría en condiciones apropiadas disminuir el impacto del daño neuronal causado por el EO generado por factores ambientales o genéticos en los pacientes con la EP. A pesar de ello, la carencia de una terapia combinada y efectiva contra el daño causado por el continuo, prolongado y excesivo EO, al cual están sometidas las células nerviosas en pacientes EP, constituye un grave problema que trae consecuencias no solo para los estamentos de prestación de salud, sino también para el pronóstico, prevención y mejora de la calidad de vida de los pacientes con la EP. Por lo anterior, es urgente y necesario investigar y explorar una terapia alternativa que proteja las neuronas del constante EO al que están sometidas los pacientes con la EP.

Precisamente, en los últimos años se ha comprobado que los cannabinoides previenen la disfunción mitocondrial y el proceso neurodegenerativo en modelos de EP (Bonini et al., 2018; Fonseca et al., 2017), describiendo que el efecto de estos compuestos es múltiple, debido a que tiene acciones antioxidantes y antiinflamatorias, que conllevan a una reducción del EO mitocondrial y normaliza la actividad de los complejos mitocondriales. Por lo tanto, estos hallazgos que relacionan a los cannabinoides con la regulación del EO y la apoptosis en las células neuronales, hacen necesario

explorar la función de estas moléculas en modelos *in vitro* de la EP, así como la resistencia al efecto tóxico del EO.

Aunque se han demostrado los efectos de los cannabinoides como antioxidantes en el control del estado redox celular, se tienen aún dudas sobre su real aplicación clínica y su seguridad, debido a las consideraciones legales, éticas y médicas asociadas a su uso y su cultivo. Sin embargo, un hallazgo importante que brinda nuevas esperanzas para la utilización de estos compuestos cannabinoides es que posiblemente su efecto antioxidante ocurre de manera independiente del acoplamiento a los receptores en el sistema nervioso central. Pero, para ello, es necesario seguir explorando formulaciones farmacéuticas que involucren el uso de cannabinoides no psicotrópicos como es el caso del cannabidiol (CBD) en altas dosis y evitar los psicotrópicos (Tetrahidrocannabinol, D9-THC) con el fin de conseguir su efecto antioxidante y protector de la mitocondria y a su vez, no generar un efecto psicotrópico.

Es por ello que el objetivo de este trabajo fue el determinar el efecto del CBD en un modelo *in vitro* de disfunción mitocondrial en neuronas tipo dopaminérgicas tratadas con la combinación de las neurotoxinas paraquat/maneb. Los resultados muestran un panorama alentador para el uso del CBD como terapia complementaria para el tratamiento de la EP.

## **2. Materiales y métodos**

### *2.1. Cultivo celular y transdiferenciación de neuronas tipo dopaminérgicas (nDA)*

Se obtuvieron células tipo neuronales dopaminérgicas por transdiferenciación de células estromales mesenquimales de sangre menstrual (CME-SM) de acuerdo con los protocolos de obtención y transdiferenciación establecidos por el grupo Neurociencias de Antioquia (GNA), en la línea de investigación Neurodegenerativas, de la siguiente manera: líneas de CME-SM almacenadas en el biobanco del GNA, fueron descongeladas y cultivadas en medio DMEM bajo en glucosa, suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% y expandidas en monocapa adherente hasta alcanzar una confluencia superior al 90%. Posteriormente fueron desprendidas y diferenciadas durante 7 días hacia células neuronales tipo dopaminérgicas en medio de cultivo DMEM bajo en glucosa, suplementado con 10 $\mu$ M de Forskolin y SBF al 1% (Quintero-Espinosa et al., 2021).

### *2.2. Caracterización inmuno-fenotípica*

La determinación fenotípica de las células tipo neuronales dopaminérgicas se llevó a cabo según protocolos del GNA (Quintero-Espinosa et al., 2021). Los marcadores de proteínas de linaje neuronal (GFAP de conejo y  $\beta$ III-tubulina de ratón) y de tipo dopaminérgicas (DAT de ratón y TH de conejo), mediante el uso de microscopía de inmunofluorescencia. En este sentido, las células (5x10<sup>3</sup>) ya diferenciadas en nDA, sin tratamiento de CBD y en ausencia de PQ y MB, fueron

fijadas e incubadas con los respectivos anticuerpos monoclonales específicos para cada proteína en la determinación de los parámetros señalados (anti-DAT de ratón, anti-TH de conejo, anti-GFAP de conejo y  $\beta$ III-tubulina de ratón). La fluorescencia indicativa de la presencia de dichas proteínas se determinó mediante la evaluación por microscopía de inmunofluorescencia de anticuerpos secundarios específicos para el isotipo de los anticuerpos primarios empleados (Alexa Fluor 594 y Alexa Fluor 488 respectivamente), los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Las fluorescencias fueron medidas en las  $\lambda=380$ ,  $\lambda=480$  y  $\lambda=590$  nm. El análisis de fluorescencia se realizó mediante la cuantificación de la señal fluorescente (MFI) de regiones de interés (ROI) determinadas con el software ImageJ.

### 2.3. *Modelamiento in vitro de Parkinsonismo*

Para modelar *in vitro* los efectos oxidantes ocurridos en las mitocondrias por efecto de la EP, se utilizaron las neurotoxinas Paraquat (PQ, metil viologen) y Maneb (MB, bisditiocarbamato etileno de manganeso), este último diluido en DMSO como vehículo (Quintero-Espinosa et al., 2022).

### 2.4. *Tratamientos con CBD*

#### 2.4.1. *Curva de toxicidad del CBD*

Se evaluaron el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y las especies reactivas de oxígeno (ROS) como medidas de daño mitocondrial del CBD de acuerdo a los protocolos establecidos por el GNA (Mendivil-Perez et al., 2016, 2017; Soto-Mercado et al., 2019, 2020) mediante el uso de microscopía de fluorescencia. En breve, las células ( $5 \times 10^3$ ) ya diferenciadas en nDA, se incubaron con concentraciones incrementales logarítmicas (1, 10, 100, 1000, 10000 nM) de CBD. Cada una de las concentraciones fueron diluidas en DMSO 200 $\mu$ M al 0,001% en ausencia de PQ y MB durante 24 horas (Duvigneau et al., 2020; Santos et al., 2015; Soto-Mercado et al., 2020). Posteriormente, fueron incubadas con las sondas fluorescentes DCF-DA, Hoechst y MitoTracker rojo durante 30 min a 37°C, para los parámetros señalados. La fluorescencia de las sondas se determinó mediante la evaluación microscópica en las  $\lambda=380$ ,  $\lambda=480$  y  $\lambda=590$  nm respectivamente. El análisis de fluorescencia se realizó mediante la cuantificación de la señal fluorescente (MFI) de regiones de interés (ROI) determinadas con el software ImageJ.

#### 2.4.2. *Análisis de Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y evaluación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular con Microscopía de Fluorescencia*

La evaluación del  $\Delta\psi_m$  y ROS se realizaron de acuerdo a los protocolos establecidos en el GNA (Mendivil-Perez et al., 2016, 2017; Soto-Mercado et al., 2019, 2020) mediante el uso de microscopía de fluorescencia. En este sentido, las células ( $5 \times 10^3$ ) ya diferenciadas en nDA, se incubaron con la concentración óptima de CBD arrojada por la curva de toxicidad en presencia de PQ y MB por 24 horas. Luego, se incubaron con las sondas fluorescentes DCF-DA, Hoechst y

MitoTracker rojo durante 30 min a 37°C, para la determinación respectiva de los parámetros señalados. La fluorescencia de las sondas se determinó mediante la evaluación microscópica en las  $\lambda=380$ ,  $\lambda=480$  y  $\lambda=590$  nm respectivamente. El análisis de fluorescencia se realizó mediante la cuantificación de la señal fluorescente (MFI) de regiones de interés (ROI) determinadas con el software ImageJ.

#### 2.4.3. *Evaluación de calcio intracelular con microscopía de fluorescencia*

Los cambios en la concentración de calcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) señalan actividad neuronal dopaminérgica y se llevó a cabo según protocolos del GNA (Mendivil-Perez et al., 2019; Quintero-Espinosa et al., 2021; Soto-Mercado et al., 2019, 2020). En breve, las células ( $5 \times 10^3$ ) ya diferenciadas en nDA, se incubaron con la concentración óptima de CBD arrojada por la curva de toxicidad en presencia de PQ y MB por 24 horas y posteriormente, se incubaron con el marcador fluorescente Fluo-3 por 30 minutos a 37°C. A continuación, se hizo la lectura en microscopía de fluorescencia añadiendo 20  $\mu\text{L}$  de solución de dopamina en cada pozo y se tomaron 5 capturas con intervalos de tiempo de 10 s desde 0 s hasta alcanzar 40 s. El análisis de fluorescencia se realizó mediante la cuantificación de la señal fluorescente (MFI) de regiones de interés (ROI) determinadas con el software Zen Lite 3.6 (Zeiss) e ImageJ.

#### 2.4.4. *Análisis de muerte celular con Microscopía de Inmunofluorescencia*

La determinación de marcadores de proteínas sensores de estrés oxidativo (ox-DJ-1) y muerte celular por apoptosis (CASP-3) fue realizada de acuerdo a los protocolos establecidos en el GNA (Mendivil-Perez et al., 2016; Sánchez-Giraldo et al., 2020) mediante el uso de microscopía de inmunofluorescencia. En breve, las células ( $5 \times 10^3$ ) ya diferenciadas en nDA, se incubaron con la concentración óptima de CBD arrojada por la curva de toxicidad en presencia de PQ y MB por 24 horas y posteriormente, fueron fijadas e incubadas con los respectivos anticuerpos monoclonales específicos para cada proteína en la determinación de los parámetros señalados, anti-ox-DJ-1 de ratón y anti-CASP-3 de conejo. La fluorescencia indicativa de la presencia de dichas proteínas se determinó mediante la evaluación por microscopía de inmunofluorescencia de anticuerpos secundarios específicos para el isotipo de los anticuerpos primarios empleados, Alexa Fluor 594 y Alexa Fluor 488, respectivamente y los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Las fluorescencias fueron medidas en las  $\lambda=380$ ,  $\lambda=480$  y  $\lambda=590$  nm. El análisis de fluorescencia se realizó mediante la cuantificación de la señal fluorescente (MFI) de regiones de interés (ROI) determinadas con el software ImageJ.

#### 2.4.5. *Análisis de muerte celular con Citometría de Flujo*

La determinación de marcadores de proteínas sensores de estrés oxidativo (ox-DJ-1) y muerte celular por apoptosis (CASP-3) se realizó de acuerdo con los protocolos establecidos en el GNA

(Soto-Mercado, Mendivil-Perez, Jimenez-Del-Rio, et al., 2021; Soto-Mercado, Mendivil-Perez, Velez-Pardo, et al., 2021) mediante el uso de citometría de flujo. En este sentido, las células ya diferenciadas en nDA, se incubaron con la concentración óptima de CBD arrojada por la curva de toxicidad en presencia de PQ y MB por 24 horas y posteriormente, fueron suspendidas e incubadas con sus anticuerpos monoclonales específicos para cada proteína en la determinación respectiva de los parámetros señalados (anti-ox-DJ-1 de ratón y anti-CASP-3 de conejo). La fluorescencia indicativa de la presencia de dichas proteínas se determinó mediante la evaluación por citometría de flujo Epics XL con los anticuerpos secundarios específicos para el isotipo de los anticuerpos primarios empleados (Alexa Fluor 458 de conejo y DY light rojo 2598 de ratón). El análisis cuantitativo y de las figuras se realizó mediante el software FlowJo 7.6.2.

## 2.5. *Análisis de imágenes y fotografías*

Las fotografías de microscopía de fluorescencia se tomaron utilizando un microscopio Floyd cells imaging station. Las imágenes adquiridas por la estación de Floyd se analizaron con el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Las figuras se transformaron en imágenes de 8 bits y se suprimió el fondo. Las regiones de interés (ROI) de las mediciones celulares se dibujaron alrededor del núcleo (para el caso de los efectores de apoptosis) o sobre todas las células (para las sondas citoplasmáticas) y la intensidad de fluorescencia se determinó posteriormente aplicando el mismo umbral para los controles y los tratamientos. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se obtuvo normalizando la fluorescencia total al número de núcleos. Las fotografías de la microscopía de fluorescencia en el ensayo de funcionalidad dopaminérgica se tomaron utilizando el microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 50. Las imágenes adquiridas por este microscopio se analizaron con el software Zen Lite 3.6 (Zeiss). Para calcular los cambios del promedio de las intensidades de fluorescencia relacionadas con el  $Ca^{2+}$ , se determinó el valor de fluorescencia de fondo (Fbg) a partir de la ROI libre de células y, a continuación, se obtuvieron las intensidades de fluorescencia en reposo (Frest) de las ROI que contenían células como el promedio de los puntos registrados durante un período de 10 s antes de la adición de dopamina. Los picos de los transitorios de fluorescencia se encontraron calculando la media de cuatro puntos consecutivos e identificando los puntos que daban el valor medio más alto (Fmax). Las amplitudes de los transitorios de fluorescencia relacionados con el  $Ca^{2+}$  se expresaron en relación con la fluorescencia en reposo ( $\frac{\Delta F}{F}$ ) y se calcularon mediante la siguiente fórmula:  $\frac{\Delta F}{F} = \frac{F_{max} - F_{rest}}{F_{rest} - F_{bg}}$ . Para el cálculo de las intensidades de fluorescencia se utilizó ImageJ. Los términos de intensidad de fluorescencia se utilizaron como un indicador indirecto de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular. La evaluación se repitió tres veces en experimentos independientes.

## 2.6. *Análisis de datos*

Todos los experimentos se realizaron por triplicado de manera independiente y los datos fueron reportados como media  $\pm$  desviación estándar (SD). Los análisis estadísticos se realizaron

mediante un ANOVA de una vía y test post hoc de Tukey para comparar las diferencias entre los grupos experimentales, calculados con el software GraphPad Prism. La significancia estadística se aceptó con los valores  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

### 3. Resultados

#### 3.1. Caracterización inmuno-fenotípica

Después de 7 días de incubación con Forskolin, se transfirieron las células tipo neuronales dopaminérgicas (nDA) a partir de CME-SM de acuerdo con los protocolos establecidos por el GNA. Como se muestra en la Fig. 1, las células expresan marcadores típicos de las neuronas dopaminérgicas como TH (Fig. 1A'') y DAT (Fig. 1A'). Asimismo, expresan marcadores proteicos presentes en los microtúbulos de las neuronas como  $\beta$ III-tubulina (Fig. 1B') y marcadores de células gliales como GFAP (Fig. 1B'').

#### 3.2. Análisis de toxicidad del Cannabidiol

Las nDA fueron tratadas con diferentes concentraciones incrementales logarítmicas de CBD (0, 10, 100, 1000, 10000 nM) por 24 h para evaluar por microscopía de fluorescencia, el  $\Delta\psi_m$  y la presencia de ROS. Como se muestra en la Fig. 2, ninguna de las concentraciones de CBD afecta el potencial de la membrana mitocondrial (Fig. 2A'-F'). Por otro lado, se observó una presencia basal de ROS en las células no tratadas (Fig. 2A''), mientras que, las células tratadas con todas las concentraciones de CBD se encuentran casi ausentes (Fig. 2B''-F''). Basados en estos resultados, decidimos tomar como concentración óptima de CBD la de 1.000 nM para posteriores ensayos.

#### 3.3. Efecto del CBD sobre el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y la producción de ROS en células tratadas con la combinación paraquat/maneb.

Como modelo neuronal *in vitro* de EP, las nDA fueron expuestas a toxinas simuladoras de parkinsonismo (PQ y MB) que inhiben el complejo I mitocondrial. Paralelamente, las células fueron tratadas con la concentración de CBD 1000 nM con el fin de evaluar su potencial efecto protector. En la Fig. 3 se muestra que mientras que en las células control (UNT) y las células tratadas con CBD no hay afectación del potencial de membrana mitocondrial (Fig. 3A'-B'), ni producción de ROS (Fig. 3A''-B''), se evidencia el daño mitocondrial causado por PQ+MB al disminuir el  $\Delta\psi_m$  y aumentar la presencia de ROS (Fig. 3C' y 3C'' respectivamente). Finalmente, las neuronas tratadas con las toxinas PQ+MB, en presencia de CBD 1000 nM, muestran un incremento significativo en el  $\Delta\psi_m$  (Fig. 3D' vs 3C'), con respecto a las intoxicadas sin CBD y disminuye significativamente la presencia de ROS (Fig. 3D'' vs 3C'') con respecto a las no tratadas con CBD (Fig. 3F).

### 3.4. Efecto del CBD sobre la oxidación del sensor DJ-1 y la activación del ejecutor de apoptosis, Caspasa-3.

Las nDA fueron dejadas sin tratar (UNT) o tratadas con CBD, PQ+MB y CBD+PQ+MB. Después de 24 h las células UNT o tratadas solo con CBD no mostraron reactividad para la activación de caspasa-3 (Fig. 4A", B" y E) ni la oxidación de DJ-1 (Fig. 4A', B' y F). No obstante, las células tratadas con PQ+MB mostraron niveles elevados de Caspasa-3 activa (Fig. 4C'' y E) y de la proteína DJ-1 oxidada (Fig. 4C' y F). De manera interesante, cuando las células fueron tratadas con CBD y PQ+MB los niveles de caspasa-3 activa (Fig. 4D'' y E) y de DJ-1 oxidada (Fig. 4D' y F) disminuyeron a niveles similares a las células UNT.

Los resultados de caspasa-3 y DJ-1 oxidado fueron confirmados por citometría de flujo, en ese sentido se pudo determinar que las células UNT y tratadas con CBD exhiben niveles de activación de Caspasa-3 (Fig. 4A) y DJ-1 oxidado (Fig. 4B) inferiores al 3%. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con PQ+MB los niveles de Caspasa-3 activa y de DJ-1 oxidado ascendieron significativamente a ~46% y ~43%, respectivamente. De manera interesante, los niveles de ambos marcadores patológicos permanecieron en niveles similares a las células UNT cuando fueron tratadas con CB y PQ+MB.

### 3.5. Análisis de calcio intracelular en microscopía de fluorescencia como prueba de funcionalidad dopaminérgica

Las nDA fueron dejadas sin tratar (UNT) o tratadas con CBD, PQ+MB y CBD+PQ+MB. Después de 24 h las células UNT mostraron señales intracelulares de  $Ca^{2+}$  altas y constantes en función del tiempo después de ser estimuladas con dopamina ( $\Delta F/F$   $0,96 \pm 0,07$  a los 10s; Fig. 6Ay E). De manera interesante, las células tratadas solo con CBD mostraron niveles de estimulación mayor ( $\Delta F/F$   $1,09 \pm 0,2$  a los 10s; Fig. 6B y E). Así mismo, las células tratadas con PQ+MB mostraron niveles de estimulación negativos ( $\Delta F/F$   $-0,01 \pm 0,07$  a los 10s; Fig. 6C y E). De manera interesante, cuando las células fueron tratadas con CBD y PQ+MB los niveles de estimulación se normalizaron a valores similares a las células UNT ( $\Delta F/F$   $0,94 \pm 0,08$  a los 10s; Fig. 6D y E).

## 4. Discusión y conclusiones

En el presente trabajo, se demostró que las células tipo neuronales dopaminérgicas obtenidas por transdiferenciación de CME-SM fue un modelo idóneo para ensayos *in vitro* de EP puesto que expresa los marcadores típicos de neuronas como  $\beta$ III-tubulina, de astrocitos como GFAP y de neuronas dopaminérgicas como TH y DAT.

Asimismo, se demostró que el CBD a la concentración de 1000 nM fue un buen candidato como antioxidante en el modelo *in vitro* de EP, al no generar daño mitocondrial en las nDA, conservando

el  $\Delta\Psi_m$  y disminuyendo significativamente la producción de ROS y, por lo tanto, la pérdida neuronal dopaminérgica. Estos resultados contrastan con investigaciones previas que sugieren que el CBD disminuye la viabilidad de neuronas dopaminérgicas (Moldzio et al., 2012).

Además, el CBD reveló un efecto anti apoptótico, al disminuir la expresión de marcadores de muerte celular y oxidación en concordancia con previos estudios (Gugliandolo et al., 2020), y en contraposición con las células no tratadas con CBD, donde se evidenció muerte celular tanto en los ensayos de citometría de flujo como los de microscopía de inmunofluorescencia.

Finalmente, en los ensayos de funcionalidad dopaminérgica hay un aumento de calcio intracelular en las células tratadas con CBD muy significativo en respuesta a la adición de dopamina, no solo restableciendo el daño causado por la simulación *in vitro* de EP con PQ y MB, sino que su respuesta basal es aún mayor a las no tratadas ni expuestas a las toxinas, evidenciando un efecto neuroprotector. Esto podría deberse a que las neuronas disminuyen su tamaño en presencia de PQ y MB, pero con CBD se evita el daño funcional o muerte celular, mostrando una relación fluorescencia-área mayor que los demás tratamientos. Estos resultados confirman otras investigaciones sobre la prevención que ejerce el CBD en cuanto al daño inducido por neurotoxinas como la rotenona o MPP+ (Echeverry et al., 2020; Santos et al., 2015).

El Cannabidiol es un excelente candidato al manejo de síntomas de la EP, debido a su capacidad antioxidante, anti apoptótica y neuroprotectora como se mostró en este estudio *in vitro*. El CBD ejerce un efecto antioxidante al aumentar el potencial de membrana mitocondrial y al disminuir la presencia y liberación de ROS, de manera que evita un constante EO que con el tiempo deterioren las neuronas dopaminérgicas. Esto es muy importante, puesto que en la EP hay un alto EO y pérdida neuronal dopaminérgica (Bandres-Ciga et al., 2020; Booth et al., 2017; Cacabelos, 2017). Sabiendo que el CBD a una concentración idónea, no es tóxica y puede evitar este ambiente oxidativo, lo hace prometedor.

Por otra parte, el CBD ejerce un efecto anti apoptótico al evitar la muerte celular por apoptosis y neuroprotector al evitar la muerte celular por pinocitosis y fagocitosis (baja expresión de CASP-3 y de DJ-1 oxidado respectivamente). Es importante este resultado, porque en la EP otra causa es la muerte masiva de neuronas dopaminérgicas en respuesta a la inflamación. El CBD a una concentración idónea, puede evitar la muerte celular, probablemente se deba a que el CBD ejerce un efecto antiinflamatorio, como ya ha sido documentado previamente (Gugliandolo et al., 2020).

Del mismo modo, el CBD ejerce un efecto neuroprotector al restablecer o mantener la funcionalidad dopaminérgica, aumentando el calcio intracelular en respuesta a la dopamina, lo que permite no solo que las neuronas dopaminérgicas no se deterioren y mueran, sino que sean totalmente funcionales. Este hallazgo es importante, porque en la EP, hay bajas concentraciones de dopamina debido a la pérdida neuronal dopaminérgica, y, por ende, la aparición y constancia de

signos motores no controlables (Radad et al., 2008). Si el CBD protege las neuronas dopaminérgicas, entonces puede controlar también los signos motores involuntarios.

En conclusión, el CBD es un candidato prometedor para la EP, porque puede ejercer diferentes acciones a la vez en las neuronas dopaminérgicas, tales como anti-oxidación, anti-apoptosis y neuroprotección, acciones farmacológicas fundamentales que se debe tener en cuenta para lograr un buen manejo de síntomas de la EP, así como evitar su avance.

## Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto 2019-28619 Regionalización CODI, Universidad de Antioquia. Andrea Felizardo es estudiante de Biología financiada por el proyecto Joven Investigador UdeA, contrato 2026002/1541/2021. Miguel Mendivil Pérez es profesor de la universidad de Antioquia, Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología/Grupo de Neurociencias de Antioquia. Los procedimientos experimentales se realizaron en las instalaciones del Grupo de Neurociencias de Antioquia, área de Neuroquímica y Neurodegenerativas.

## Referencias

- Bandres-Ciga, S., Diez-Fairen, M., Kim, J. J., & Singleton, A. B. (2020). Genetics of Parkinson's disease: An introspection of its journey towards precision medicine. *Neurobiology of Disease*, 137(November 2019), 104782. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104782>
- Bonilla-Porras, A. R., Arevalo-Arbelaez, A., Alzate-Restrepo, J. F., Velez-Pardo, C., & Jimenez-Del-Rio, M. (2018). PARKIN overexpression in human mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly suppresses 6-hydroxydopamine-induced apoptosis: Potential therapeutic strategy in Parkinson's disease. *Cytotherapy*, 20(1), 45–61. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.09.011>
- Bonini, S. A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., & Mastinu, A. (2018). Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology*, 227(September), 300–315. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.004>
- Booth, H. D. E., Hirst, W. D., & Wade-Martins, R. (2017). The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends in Neurosciences*, 40(6), 358–370. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.001>
- Burbulla, L. F., & Krainc, D. (2019). The role of dopamine in the pathogenesis of GBA1-linked Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 132(May), 104545. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104545>
- Cacabelos, R. (2017). Parkinson's disease: From pathogenesis to pharmacogenomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030551>
- Diazgranados Sánchez, J. A., Chan Guevara, L., Gómez Betancourt, L. F., Lozano Arango, A. F., & Ramirez, M. (2011). Descripción de la población de pacientes con enfermedad de Parkinson en un centro médico neurológico en la ciudad de Cali, Colombia. *Acta Neurológica Colombiana*, 27(4), 205–210.
- Dickson, D. W. (2012). Parkinson's disease and parkinsonism in. *Cold Spring, Med, Harb*

*Perspect*, 2(8), 1–15.

- Duvigneau, J. C., Trovato, A., Müllebner, A., Miller, I., Krewenka, C., Krenn, K., Zich, W., & Moldzio, R. (2020). Cannabidiol protects dopaminergic neurons in mesencephalic cultures against the complex I inhibitor rotenone via modulation of heme oxygenase activity and bilirubin. *Antioxidants*, 9(2), 1–24. <https://doi.org/10.3390/antiox9020135>
- Echeverry, C., Prunell, G., Narbondo, C., de Medina, V. S., Nadal, X., Reyes-Parada, M., & Scorza, C. (2020). A Comparative In Vitro Study of the Neuroprotective Effect Induced by Cannabidiol, Cannabigerol, and Their Respective Acid Forms: Relevance of the 5-HT1A Receptors. *Neurotoxicity Research*. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00277-y>
- Fonseca, B. M., Teixeira, N. A., & Correia-da-Silva, G. (2017). Cannabinoids as modulators of cell death: Clinical applications and future directions. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 173, 63–88. [https://doi.org/10.1007/112\\_2017\\_3](https://doi.org/10.1007/112_2017_3)
- Gugliandolo, A., Pollastro, F., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2020). Cannabidiol exerts protective effects in an in vitro model of Parkinson's disease activating AKT/mTOR pathway. *Fitoterapia*, 143(March), 104553. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104553>
- Lill, C. M. (2016). Genetics of Parkinson's disease. *Molecular and Cellular Probes*, 30(6), 386–396. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.11.001>
- Lotankar, S., Prabhavalkar, K. S., & Bhatt, L. K. (2017). Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. *Neuroscience Bulletin*, 33(5), 585–597. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0183-5>
- Mendivil-Perez, M., Jimenez-Del-Rio, M., & Velez-Pardo, C. (2014). Response to rotenone is glucose-sensitive in a model of human acute lymphoblastic leukemia: Involvement of oxidative stress mechanism, DJ-1, Parkin, and PINK-1 proteins. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/457154>
- Mendivil-Perez, M., Soto-Mercado, V., Guerra-Librero, A., Fernandez-Gil, B. I., Florido, J., Shen, Y. Q., Tejada, M. A., Capilla-Gonzalez, V., Rusanova, I., Garcia-Verdugo, J. M., Acuña-Castroviejo, D., López, L. C., Velez-Pardo, C., Jimenez-Del-Rio, M., Ferrer, J. M., & Escames, G. (2017). Melatonin enhances neural stem cell differentiation and engraftment by increasing mitochondrial function. *Journal of Pineal Research*, 63(2), 1–18. <https://doi.org/10.1111/jpi.12415>
- Mendivil-Perez, M., Velez-Pardo, C., & Jimenez-Del-Rio, M. (2016). Neuroprotective Effect of the LRRK2 Kinase Inhibitor PF-06447475 in Human Nerve-Like Differentiated Cells Exposed to Oxidative Stress Stimuli: Implications for Parkinson's Disease. *Neurochemical Research*, 41(10), 2675–2692. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1982-1>
- Mendivil-Perez, M., Velez-Pardo, C., & Jimenez-Del-Rio, M. (2019). Direct transdifferentiation of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells into cholinergic-like neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 312, 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.11.019>
- Moldzio, R., Pacher, T., Krewenka, C., Kranner, B., Novak, J., Duvigneau, J. C., & Rausch, W. D. (2012). Effects of cannabinoids  $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol,  $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinolic acid and cannabidiol in MPP+ affected murine mesencephalic cultures. *Phytomedicine*, 19(8–9), 819–824. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.04.002>
- Papa, S., & De Rasmio, D. (2013). Complex I deficiencies in neurological disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 19(1), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.11.005>
- Quintero-Espinosa, D. A., Ortega-Arellano, H. F., Velez-Pardo, C., & Jimenez-Del-Rio, M. (2022). Phenolic-rich extract of avocado *Persea americana* (var. Colindred) peel blunts paraquat/maneb-induced apoptosis through blocking phosphorylation of LRRK2 kinase in human nerve-like cells. *Environmental Toxicology*, 37(3), 660–676.

<https://doi.org/10.1002/tox.23433>

- Quintero-Espinosa, D., Jimenez-Del-Rio, M., & Velez-Pardo, C. (2017). Knockdown transgenic Lrrk *Drosophila* resists paraquat-induced locomotor impairment and neurodegeneration: A therapeutic strategy for Parkinson's disease. *Brain Research*, *1657*, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.12.023>
- Quintero-Espinosa, D., Soto-Mercado, V., Quintero-Quinchia, C., Mendivil-Perez, M., Velez-Pardo, C., & Jimenez-Del-Rio, M. (2021). Latent Tri-lineage Potential of Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Revealed by Specific In Vitro Culture Conditions. *Molecular Neurobiology*, *58*(10), 5194–5209. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02442-6>
- Radad, K., Gille, G., & Rausch, W. D. (2008). Dopaminergic neurons are preferentially sensitive to long-term rotenone toxicity in primary cell culture. *Toxicology in Vitro*, *22*(1), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.08.015>
- Sánchez-Giraldo, V., Monsalve, Y., Palacio, J., Mendivil-Perez, M., Sierra, L., Velez-Pardo, C., López, B. L., & Jiménez-Del-Rio, M. (2020). Role of a novel (–)-epigallocatechin-3-gallate delivery system on the prevention against oxidative stress damage in vitro and in vivo model of Parkinson's disease. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *55*, 101466. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101466>
- Sánchez, J. L., Buriticá, O., Pineda, D., Uribe, C. S., & Palacio, L. G. (2004). Prevalence of Parkinson's disease and Parkinsonism in a Colombian population using the capture-recapture method. *International Journal of Neuroscience*, *114*(2), 175–182. <https://doi.org/10.1080/00207450490269444>
- Santos, N. A. G., Martins, N. M., Sisti, F. M., Fernandes, L. S., Ferreira, R. S., Queiroz, R. H. C., & Santos, A. C. (2015). The neuroprotection of cannabidiol against MPP<sup>+</sup>-induced toxicity in PC12 cells involves trkA receptors, upregulation of axonal and synaptic proteins, neuritogenesis, and might be relevant to Parkinson's disease. *Toxicology in Vitro*, *30*(1), 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.11.004>
- Soto-Mercado, V., Mendivil-Perez, M., Jimenez-Del-Rio, M., & Velez-Pardo, C. (2020). Multi-Target Effects of the Cannabinoid CP55940 on Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A Cholinergic-Like Neurons: Role of CB1 Receptor. *Journal of Alzheimer's Disease*, *0411*, 1–20. <https://doi.org/10.3233/jad-201045>
- Soto-Mercado, V., Mendivil-Perez, M., Jimenez-Del-Rio, M., & Velez-Pardo, C. (2021). Multi-Target Effects of the Cannabinoid CP55940 on Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A Cholinergic-Like Neurons: Role of CB1 Receptor. *Journal of Alzheimer's Disease*, *82*(s1), S359–S378. <https://doi.org/10.3233/JAD-201045>
- Soto-Mercado, V., Mendivil-Perez, M., Velez-Pardo, C., & Jimenez-Del-rio, M. (2021). (–)-epigallocatechin-3-gallate diminishes intra-and extracellular amyloid-induced cytotoxic effects on cholinergic-like neurons from familial Alzheimer's disease PSEN1 E280A. *Biomolecules*, *11*(12). <https://doi.org/10.3390/biom11121845>
- Soto-Mercado, V., Mendivil-Perez, M., Velez-Pardo, C., Lopera, F., & Jimenez-Del-Rio, M. (2019). Cholinergic-like neurons carrying PSEN1 E280A mutation from familial Alzheimer's disease reveal intraneuronal Aβ<sub>42</sub> peptide accumulation, hyperphosphorylation of TAU, oxidative stress, apoptosis and Ca<sup>2+</sup> flux dysregulation: Therapeutic Implications. In *bioRxiv* (Issue 52). <https://doi.org/10.1101/735449>

## Leyendas de las figuras

**Figura 1. Caracterización de células tipo neuronales dopaminérgicas (nDA) a partir de CME-SM.** CME-SM fueron transdiferenciadas por 7 días, luego se reconocieron marcadores neuronales de interés (A'''-B''') tinción de núcleos con Hoechst. (A'') Identificación de la Tirosina Hidroxilasa (TH). (B'') Identificación de la proteína GFAP. (A') Identificación del Transportador de Dopamina (DAT). (B') Identificación de la proteína  $\beta$ III-tubulina. (A) Imagen combinada de la identificación del núcleo, TH y DAT. (B) Imagen combinada de la identificación del núcleo, GFAP y  $\beta$ III-tubulina. Magnificación de las imágenes 20x.

**Figura 2. El Cannabidiol no induce citotoxicidad en el modelo de nDA.** Después de transdiferenciarse, las nDA fueron dejadas sin tratar (A) o tratadas con 1 (B), 10 (C), 100 (D), 1000 (E) y 10000 (F) nM de CBD durante 24h. Posteriormente se determinó el efecto del CBD sobre el núcleo (A'''-F'''), la producción de ROS evaluada con DCF (A''-F'') y el potencial de membrana mitocondrial determinado con MitoTracker (A'-F'). Los datos cuantitativos de MitoTracker (G) y DCF (H) fueron obtenidos y analizados. Los análisis estadísticos se realizaron mediante un ANOVA de una vía y test post hoc de Tukey para comparar las diferencias entre los grupos experimentales; \*\*\*  $p < 0,001$ ; ns: No hay diferencias estadísticas. Magnificación de las imágenes 20x.

**Figura 3. El Cannabidiol protege el potencial de membrana mitocondrial y reduce la producción de ROS en nDA tratadas con PQ+MB.** Después de transdiferenciarse, las nDA fueron dejadas sin tratar (A) o tratadas con CBD solo (B), PQ+MB (C) o CBD + PQ+MB (D) durante 24h. Posteriormente se determinó el efecto los tratamientos sobre el núcleo (A'''-D'''), la producción de ROS evaluada con DCF (A''-D'') y el potencial de membrana mitocondrial determinado con MitoTracker (A'-D'). Los datos cuantitativos de MitoTracker (E) y DCF (F) fueron obtenidos y analizados. Los análisis estadísticos se realizaron mediante un ANOVA de una vía y test post hoc de Tukey para comparar las diferencias entre los grupos experimentales; \*\*\*  $p < 0,001$  comparados con UNT; ###  $p < 0,001$  comparados con PQ+MB. Magnificación de las imágenes 20x.

**Figura 4. El Cannabidiol previene la activación de Caspasa-3 y la oxidación de DJ-1 en nDA tratadas con PQ+MB.** Después de transdiferenciarse, las nDA fueron dejadas sin tratar (A) o tratadas con CBD solo (B), PQ+MB (C) o CBD + PQ+MB (D) durante 24h. Posteriormente se determinó el efecto los tratamientos sobre el núcleo (A'''-D'''), la activación de Caspasa-3 (A''-D'') y la oxidación del sensor de EO, DJ-1 (A'-D'). Los datos cuantitativos de la activación de Caspasa-3 (E) y de oxidación de DJ-1 (F) fueron obtenidos y analizados. Los análisis estadísticos se realizaron mediante un ANOVA de una vía y test post hoc de Tukey para comparar las diferencias entre los grupos experimentales; \*\*\*  $p < 0,001$  comparados con UNT; ###  $p < 0,001$  comparados con PQ+MB. Magnificación de las imágenes 20x.

**Figura 5. El Cannabidiol previene la activación de Caspasa-3 y la oxidación de DJ-1 en nDA tratadas con PQ+MB.** Después de transdiferenciarse, las nDA fueron dejadas sin tratar o tratadas con CBD solo, PQ+MB o CBD + PQ+MB durante 24h. Posteriormente se determinó el efecto los tratamientos sobre la activación de caspasa-3 (A) y la oxidación del sensor de EO, DJ-1 (B). Los análisis estadísticos se realizaron mediante un ANOVA de una vía y test post hoc de Tukey para comparar las diferencias entre los grupos experimentales; \*\*  $p < 0,01$  comparados con UNT; #  $p < 0,01$  comparados con PQ+MB.

**Figura 6. El CBD promueve la respuesta a la dopamina en nDA tratadas con PQ+MB.**

Evaluación de  $Ca^{2+}$  intracelular en respuesta al estímulo con dopamina en nDA. (A) Imágenes de luz y de espectro en células no tratadas (UNT). (B) Imágenes de luz y de espectro en células tratadas con CBD. (C) Imágenes de luz y de espectro en células tratadas con PQ+MB. (D) Imágenes de luz y de espectro en células tratadas con CBD

+ PQ+MB. (E) Cuantificación del  $\Delta F/F$ . Los análisis estadísticos se realizaron mediante un ANOVA de dos vías y test post hoc de Tukey para comparar las diferencias entre los grupos experimentales; \*  $p < 0,05$  comparados con UNT; #  $p < 0,05$  comparados con PQ+MB; \$  $p < 0,05$  a partir de la comparación UNT vs. CBD. Magnificación de las imágenes 20x.