BEATRIZ SAKASHITA LOGATTO DE SOUZA

Efeitos bioquímicos e comportamentais do pré-tratamento com agonista inverso CB1 na sinalização inflamatória desencadeada por LPS em camundongos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Profa. Dra. Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe

Coorientador: Prof. Dr. Cristoforo Scavone

Versão original.

São Paulo
2017

RESUMO

Souza, BSL. Efeitos bioquímicos e comportamentais do pré-tratamento com agonista inverso CB₁ na sinalização inflamatória desencadeada por LPS em camundongos. [Dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2017.

O sistema canabinóide endógeno tem uma importante função modulatória em muitos processos neurobiológicos, incluindo a neuroproteção, a plasticidade neuronal e a neuroinflamação. A maioria da literatura desta área tem o foco nas ações anti-inflamatórias e neuroprotetoras deste sistema, utilizando-se de agonistas dos receptores canabinóides CB₁ e CB₂. Porém os efeitos de um pré-tratamento com componentes canabinóides na resposta inflamatória não são tão presentes na literatura. Neste contexto, utilizamos uma nova abordagem para promover a neuroproteção, ativando vias de sinalização que modulam resposta adaptativa. Neste estudo nós pré-tratamos os camundongos com um agonista inverso do receptor CB₁, para avaliarmos se ocorria a neuroproteção através de respostas horméticas. Hormese é uma resposta adaptativa das células e dos organismos a um estresse moderado, normalmente intermitente, que pode apresentar muitos efeitos benéficos ao sistema biológico. Portanto, dentro desta hipótese, que o pré-tratamento com o agonista inverso de CB₁ funcionaria como um estressor moderado, levando a uma neuroadaptação. Entretanto, os dados sugerem que o agonista inverso de CB₁ não desencadeia via de sinalização neuroprotetoras, mas sim atua reforçando a sinalização inflamatória no SNC.

Esse estudo teve como objetivo caracterizar efeitos bioquímicos e comportamentais do pré-tratamento com o agonista inverso do receptor CB₁ na via de sinalização inflamatória desencadeada pelo lipopolissacarídeo (LPS).

Camundongos machos adultos (C57BL/6J) de 3 meses de idade foram pré-tratados durante 4 dias com injeções diárias de 3 mg/Kg de AM251 (agonista inverso CB₁) ou com veículo, intraperitonealmente (i.p.). Vinte e quatro horas depois da última injeção de AM251/Veículo, os animais foram injetados com LPS i.p. (500 µg/kg) ou salina. Vinte e quatro horas após a injeção de LPS/salina, os animais foram submetidos aos testes comportamentais: Labirinto aquático de Morris, esQUIVA inibitória, reconhecimento do objeto novo e campo aberto. Em um outro grupo, animais foram eutanasiados quatro horas depois da injeção de LPS/Salina, para realizarmos os testes bioquímicos com as seguintes estruturas: Hipocampo e córtex pré-frontal. Alguns testes foram realizados também no cerebelo.

Nós observamos que o pré-tratamento com o agonista inverso de receptor CB₁ parece potencializar ou sensibilizar a resposta inflamatória induzida pelo LPS, dependendo do ponto da sinalização inflamatória analisado. Animais pré-tratados com AM251 e expostos ao LPS apresentaram maiores déficits de locomoção e de memória nos testes comportamentais, e bioquimicamente maiores concentrações de Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1β), e intÉrferon gama (IFN-γ), indicando potencialização/sensibilização da resposta inflamatória desencadeada pelo LPS. O agonista inverso de CB₁ por si só não apresenta nenhum efeito pró-inflamatório ou comportamental diferente dos animais controle. Animais tratados apenas com LPS, apresentaram déficit de memória e de locomoção nos testes comportamentais, como

esperado pela literatura, no entanto os efeitos foram menores quando comparados com o grupo pré-tratado com AM251 seguido de LPS.

Inicialmente segundo nossa hipótese, achávamos que o pré-tratamento com o agonista inverso de CB₁ funcionaria como um estressor moderado, levando a uma neuroadaptação (possivelmente por vias glutamatérgicas). Contudo, exatamente o oposto aconteceu. Nosso pré-tratamento agiu não como um estressor moderado que ativa vias neuroprotetoras, e sim como um estresse deletério.

Palavras-chaves: Canabinóide. Neuroinflamação. Memória. Hormese. LPS.

ABSTRACT

Souza, BSL. Biochemical and Behavioural effects of the pretreatment with the inverse agonist of CB₁ in the inflammatory signaling triggered by LPS in mice. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

The endogenous cannabinoid system seems to play a modulatory function in many neurobiological processes, including neuroprotection, neuronal plasticity and neuroinflammation. Most of the literature of this area has a focus in the anti-inflammatory and neuroprotective actions of this system, using agonists of the receptors CB₁ and CB₂. However the effects of the pretreatment with cannabinoid compounds in the inflammatory response are scarce in the literature. In this context, we used a new approach to promote the neuroprotection, activating signaling pathways that modulate adaptive responses. In this study we pretreated the mice with an inverse agonist of the receptor CB₁, in order to evaluate this neuroprotection through adaptive, hormetic responses. Hormesis is an adaptive response of cells and bodies against a moderate stress, normally intermittent, which could present several beneficial effects to the biological system. Based on this, our pre-treatment with inverse agonist CB₁ would work as a mild stress promoting a neuroadaptation. However, our data suggest that the inverse agonist CB₁ did not promote neuroprotective, adaptive signaling pathways as we thought; besides it acted reinforcing inflammatory signaling in central nervous system.

This study aimed to characterize the behavioural and biochemical effects of the pretreatment with the inverse agonist of the receptor CB₁ in the inflammatory signaling triggered by lipopolysaccharide (LPS).

Three months-old male mice (C57BL/6J) were pretreated during 4 days with daily injections of 3mg/Kg of AM251 (CB₁ inverse agonist) or with vehicle, intraperitoneally (i.p.). Twenty-four hours after the last AM251/Vehicle injection, animals were injected i.p. with LPS (500 µg/kg) or saline. Twenty-four hour after LPS/Saline injection, animals were submitted to behavioural tests: Morris Water maze, inhibitory avoidance task, novel-object recognition and open field. In another batch, animals were euthanized 4 hours after LPS injection, to accomplish the biochemical tests with the dissected structures: hippocampus and prefrontal cortex. Some of the experiments were made also with the cerebellum.

We found that the pretreatment with the CB₁ inverse agonist seems to be potentiating or sensitizing the inflammatory response, depending on analyzed data. AM251 pretreated animals exposed to LPS showed a higher memory and locomotion deficits in the behavioural tests, and biochemically higher concentrations of Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), Interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 beta (IL-1β), and interferon gama (IFN-γ), indicating the potentiation of the inflammatory response triggered by LPS. The inverse agonist of CB₁ by itself did not present any pro-inflammatory effects or behavioural effects. Animals treated only with LPS present a memory deficit in the behavioural tests, as expected by literature, but less than the group pretreated with AM251 and followed by LPS.

Our hypothesis was that the pretreatment with the inverse agonist of CB₁ would act as a moderate stressor, leading to a neuroadaptation (probably by glutamatergic pathways). However exactly the opposite happened; CB₁ pretreatment potentiated or sensitized the pro-inflammatory signaling pathway. Our pre-treatment worked not as a moderate stressor

but as a deleterious stressor.

Keywords: Cannabinoid. Neuroinflammation. Memory. Hormesis. LPS.

1 INTRODUÇÃO

Muitos trabalhos atualmente estudam as ações anti-inflamatórias e/ou neuroprotetoras do sistema canabinóide, utilizando tratamentos com agonistas dos receptores CB₁ e CB₂ (Baker et al., 2005; Lutz et al., 2006; Merchoulan et al., 2007; Kozela et al., 2007; Klegers et al., 2011; Panikashvili 2011) No entanto, existem poucos trabalhos que mostram os efeitos do pré-tratamento com compostos canabinóides na resposta inflamatória. Justamente pela falta de trabalhos explorando o que foi mencionado anteriormente, nossa abordagem foi avaliar os possíveis efeitos do pré-tratamento (de quatro dias) com o agonista inverso do receptor CB₁, AM251, em um modelo de neuroinflamação induzido pela administração de LPS em camundongos.

Figura 1 - Ação do receptor CB₁ em um neurônio glutamatérgico. No terminal pré-sináptico o 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) ativa os receptores CB₁ acoplados à proteína G modulando a permeabilidade da membrana neuronal ao íon Ca^{2+} afetando assim a liberação dos neurotransmissores. No caso do neurônio glutamatérgico, agonistas CB₁ diminuem a liberação de glutamato, portanto o agonista inverso de CB₁ aumenta a liberação de glutamato. (Gúzman, 2003)

A hipótese era que o agonista inverso de CB₁ funcionasse como um estressor moderado, e que o pré-tratamento com este estressor moderado levasse a uma

neuroadaptação. A ação do agonista inverso de CB₁ ocasiona em uma ativação de neurônios glutamatérgicos, e essas pequenas doses de glutamato levariam a uma neuroadaptação frente a um estresse maior (neste caso causado pelo LPS) como explicitaremos melhor no tópico “revisão da literatura”.

Como tínhamos como objetivo avaliar os efeitos bioquímicos e comportamentais do pré-tratamento com agonista inverso do receptor CB₁, AM251, nas respostas inflamatórias em modelo de neuroinflamação aguda causada pelo LPS em camundongos, avaliamos os animais bioquimicamente (eutanásia quatro horas após a exposição ao LPS), realizando ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida (EMSA), Ensaio imuno enzimático para detecção de citocinas (ELISA), atividade da óxido nítrico sintase (NOS) e *Western blotting*, e os ensaios comportamentais (dependendo do ensaio o tempo após a injeção de LPS varia) de Labirinto aquático de Morris, Esquiva inibitória, Reconhecimento do objeto novo e Campo aberto. Como dito anteriormente, nossa hipótese era que o pré-tratamento poderia ocasionar uma possível reversão dos efeitos bioquímicos e comportamentais causados pela injeção de LPS. Porém, os resultados apontam que este pré-tratamento com o agonista inverso de CB₁ sensibilizou e em alguns aspectos até potencializou a resposta inflamatória. Os animais pré-tratados ao agonista inverso do receptor CB₁ e expostos ao LPS apresentaram maior déficit de memória e de mobilidade nos ensaios comportamentais, e bioquimicamente maior concentração de TNF- α , IL-6, IL-1 β e IFN- γ , sugerindo uma potencialização da resposta inflamatória desencadeada pelo LPS.

5 CONCLUSÃO

Figura 2 - Figura representativa da sinalização inflamatória desencadeada pelo LPS. Temos representado na imagem a via do TLR4 e a via glutamatérgica, que foram exploradas neste projeto. O LPS liga-se ao TLR4, desencadeando a sinalização inflamatória, fosforilando o IκB, o que leva a liberação do fator de transcrição NF-κB, que migra para o núcleo. No núcleo, o NF-κB liga-se ao DNA, e inicia-se a transcrição de fatores como citocinas pró-inflamatórias e a NOS induzida. A iNOS leva a produção de NO, e esta por sua vez inibe a atividade de ligação do NF-κB ao DNA, atuando como um *feedback* negativo da sinalização inflamatória. Como o próprio LPS aumenta a liberação de glutamato, este glutamato ativa os receptores NMDA, que por sua vez aumentam o influxo de cálcio, que podem ativar a nNOS. Com o aumento da ativação da nNOS, ocorre um aumento de produção de NO, que como dito anteriormente, inibe a atividade de ligação do DNA ao NF-κB. (LPS: Lipopolisacarídeo; TLR4: receptor do tipo toll 4; IRAK Cinase associada ao receptor de interleucina-1 ; MyD88: molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88; TRAF6: Receptor associad ao TNF fator 6; IKK: Inibidor da Quinase KappaB I; IκB: I-kappaB; P:Fosforilação; NF-KB: Fator nuclear KappaB; IL-6: interleucina - 6;IL-1β: Interleucina-1Beta;TNF-α: Fator de necrose tumoral -Alpha; nNOS: óxido nítrico sintase neuronal; NO: óxido nítrico.NMDA: N-Metil-D-aspartato.)

Figura 3 - Figura representativa da modulação da sinalização inflamatória desencadeada pelo LPS causada pelo pré-tratamento de AM251 no córtex pré-frontal. Acima está esquematizado a conclusão do trabalho. O pré-tratamento fez com que a atividade do receptor NMDA diminuísse, por consequência diminuindo a produção de NO via nNOS. Com esse déficit no mecanismo inibitório, ocorreu um aumento de citocinas pró-inflamatórias. Tanto o aumento das citocinas pró-inflamatórias quanto a diminuição da atividade do NMDA resultaram em um maior déficit de memória e um maior déficit locomotor. (LPS: Lipopolisacarídeo; TLR4: receptor do tipo toll 4; IRAK4: Cinase associada ao receptor de interleucina-1 ; MyD88: molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88; TRAF6: Receptor associad ao TNF fator 6; IKK: Inibidor da Quinase KappaB I; IκB: I-kappaB; P: Fosforilação; NF-κB: Fator nuclear KappaB; iNOS: óxido nítrico sintase induzida; IL-6: interleucina -6; IL-1β: Interleucina-1Beta; TNF-α: Fator de necrose tumoral -Alpha; nNOS: óxido nítrico sintase neuronal; NO: óxido nítrico. NMDA: N-Metil-D-aspartato.).

Nosso objetivo com este projeto era encontrar uma espécie de “mimético hormético”. Tentando mimetizar a via glutamatérgica como um processo hormético, visávamos um pré-tratamento com um composto nos apoiando nos conhecimentos do sistema canabinóide. Visávamos uma abordagem diferente da tradicional: ao invés de utilizarmos os agonistas de canabinóides para combater uma inflamação, queríamos criar uma situação de estresse moderado para que organismo estivesse mais preparado na presença de um estresse mais severo. E surpreendentemente nossos resultados apontaram justamente para o contrário: nosso pré-tratamento intensificou a inflamação de nossos animais, o que nos sugere que a hormese possa ser um fenômeno muito mais complexo do que um condicionamento e que diferentes vias de sinalização podem estar envolvidas no processo de adaptação do organismo a estresses moderados.

REFERÊNCIAS*

- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406:782-7
- Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol*. 1999;58:315-48
- Assini FL. et al. Coadministration of cannabinoid CB₁-receptor and adenosine A₁-receptor antagonists improves the acquisition of spatial memory in mice: participation of glutamatergic neurotransmission. *Behav Pharmacol*. 2012;23:292-301
- Auclair N. et al. Cannabinoids Modulate Synaptic Strength and Plasticity at Glutamatergic Synapses of Rat Prefrontal Cortex Pyramidal Neurons. *J Neurophysiol*. 2000;83:3287-93
- Babovic D. et al. Phenotypic characterization of cognition and social behavior in mice with heterozygous versus homozygous deletion of catechol-O-methyltransferase. *Neuroscience*. 2008;155:1021-9
- Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: Ten years after. *Cell*. 1996;87:13-20
- Benito C. et al. Cannabinoid CB₂ receptor in human brain inflammation. *J Pharmacol*. 2008;153:277-85
- Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *TRENDS in Cell Biology*. 2001;11:66-75
- Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 2004;25:280-8.
- Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990;87:682-5
- Broadhurst PL. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. *Fortschr Psychosom Med*. 1960;1:63-9
- Calabrese EJ. Hormesis and medicine. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;66:594-617

Catorce MN, Gevorkian G. LPS-induced Murine neuroinflammation model: Main features and suitability for pre-clinical assessment of nutraceuticals. *Curr Neuropharmacol*.2016;14:155-64

Centonze D. et al. The endocannabinoid system is dysregulated in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*. 2007;130:2543-53

Chaves-kirsten GP. et al. Temporal changes of CB₁ cannabinoid receptor expression in the basal ganglia as a possible structure-specific plasticity process in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *PLoS One*. 2013

Chen X, Zhang J, Chen C .Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons against β -amyloid insults. *Neuroscience*. 2011;178:159-68

Ciamei A, Cestari V, Castellano C. Retention of C57BL/6 and DBA/2 Mice tested in a one-trial inhibitory avoidance task: involvement of dopaminergic mechanisms. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2000;73:188-94

Colasanti M, Suzuki H. The dual personality of NO. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21:249-52

Correa F. et al. Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB(2) receptors: roles of ERK1/2, JNK, and NF-kappaB. *Glia*. 2010;58:135-47

Di Marzo V, De Petrocellis L. Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: A further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. *Curr Med Chem*. 2010;17:1430-49

Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Neurosci*. 2005;8:585-9

Di Marzo V. et al. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *L.Trends Neurosci*. 1998;21:521-8

Donzis EJ, Tronson NN.; Modulation of learning and memory by cytokines: signaling mechanisms and long term consequences. *Neurobiol Learn Mem*. 2014;115:68-77

Dubal DB. et al. Life extensions factor Klotho prevents mortality and enhances cognition in hAPP transgenic mice. *The Journal of Neuroscience*, 35 (6), 2015. okines: Signaling mechanisms and long term consequences. *Neurobiology of learning and Memory*. 2014;115:68-77

Fernández-Ruiz J. et al. Role of CB₂ receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;286:91-96

Fowler, C.J.; et al. Pharmacological properties of cannabinoid receptors in the avian brain: similarity of rat and chicken cannabinoid1 receptor recognition sites and expression of cannabinoid2 receptor-like immunoreactivity in the embryonic chick brain. *Pharmacol Toxicol*, v. 88, p. 213-222, 2001.

Freund TF. et al. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* 2003;83:1017-66

Fride E, Shohami E. The endocannabinoid system: function in survival of the embryo, the newborn and the neuron. *Neuroreport.* 2002;13:1833-40

García-Arencibia M. et al. 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.* 2007;1134:162-70

Gerondakis S. et al. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. *Oncogene.* 1999;18:6888-95

Glezer I. et al. MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-kappa B induced by LPS. *Neuropharmacology.* 2003;45:1120-9

Gortz N. et al. Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice. *Behav Brain Res.* 2008;191:43-8

Gowran A, Noonan J, Campbell VA. The multiplicity of action of cannabinoids: implications for treating neurodegeneration. *CNS Neurosci Ther.* 2011;17:637-44

Greineisen WE, Turner H. Immunoactive effects of cannabinoids: considerations for the therapeutic use of cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Int Immunopharmacol.* 2010;10:547-55

Guzman M. Neurons on cannabinoids: dead or alive? *Br. J. Pharmacol.* 2003;140: 439-40

Guzman M. Cannabinoids: potential anticancer agents *Nature Reviews cancer.* 2003;3:745-55

Harju, K. et al. Expression of toll-like receptor 4 and endotoxin responsiveness in mice during perinatal period. *Pediatric Research.* 2005;57:644-48

Hashimotodan IY, Ohno-Shosaku T, Kano M. Endocannabinoids and Synaptic Function in the CNS. *Neuroscientist.* 2007;13:127-

Hava G. et al. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. *Developmental Psychobiology.* 2006;48:162-8

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004;18:2195-224

Jackson SJ. et al. Cannabinoids and neuroprotection in CNS inflammatory disease. *J. Neuro. Sci.* 2005;233:21-5

Jean-Gilles L, Gran B, Constantinescu CS. Interaction between cytokines, cannabinoids and the nervous system. *Immunobiology.* 2010;215:606-10

Karaninan DA. et al. Dual modulation of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase protects against excitotoxicity. *J. Neurosci.* 2006;25:7813-20

- Kawamoto EM. et al. Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. *J Neurosci.* 2008;8:845-60
- Kawamoto EM. et al. Curcumin requires Tumor Necrosis Factor α signaling to alleviate cognitive impairment elicited by Lipopolysaccharide. *Neurosignals.* 2012
- Khaspekov LG. et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* 2004;19:1691-8
- Kim SH. et al. Involvement of protein kinase A in cannabinoid receptor-mediated protection from oxidative neuronal injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005;313:88-94
- Kincaid B, Bossy-Wetzel E. Forever Young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* 2003
- Kozela, E.; et al. Cannabinoids Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. *J Biol Chem.* 2010;285:1616-26
- Kreitzer AC, Regehr WG. Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron.* 2001;29:717-27
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5
- Lee J. et al. Adaptive Cellular Stress Pathways as Therapeutic Targets of Dietary Phytochemical Focus on the Nervous System. *Pharmacological reviews.* 2014;66:815-68
- Lepsch LB. Et Al. Cocaine induces cell death and activates the transcription Nuclear Factor Kappa-B in PC12 cells. *Mol Brain.* 2009;2:3
- Little JP, Villanueva EB, Klegeris A. Therapeutic potential of cannabinoids in the treatment of neuroinflammation associated with Parkinson's disease. *Mini Rev Med Chem.* 2011;11:582-90
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25:402-8
- Lutz B. Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2002;66:123-42
- Marchalant Y, Brothers HM, Wenk GL. Inflammation and aging: Can endocannabinoids help? *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2008;62:212-7
- Marini AM. et al. Preconditioning and neurotrophins: a model for brain adaptation to seizures, ischemia and other stressful stimuli. *Amino Acids.* 2007;32:299-304
- Mariscano G. et al. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB₁. *J. Neurochem.* 2002;80:448-56

Matsuda LA. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990;346:561-4

Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest*. 2001;107:247-54

Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ*. 2006;13:852-60

Mattson MP. et al. Energy Intake and Exercise as Determinants of Brain Health and Vulnerability to Injury and Disease. *Cell Metab*. 2012

Mattson MP. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med*. 2003;3:65-94

Mattson MP. Hormesis defined. *Ageing res Rev*. 2009;7:1-7

Mckee M, Scavone C, Nathanson JA. Nitric oxide, cGMP, and hormone regulation of active sodium transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994;91:1256-60

Mechoulam R, Gaoni YA. Total synthesis of dl-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*. 1965;20:3273-5

Mechoulam R, Parker LA. The Endocannabinoid System and the Brain. *Annu Rev Psychol*, 2012

Mechoulam R, Spatz M, Shohami E. Endocannabinoids and neuroprotection. *Sci. STKE*. 2002;129

Meyer U, Feldon J, Fatermi SH. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Review*. 2009;33:1061-79,

Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol*. 2007;19:3-10

Munhoz CD. et al. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci*. 2006;26:3813-20

Munhoz CD. et al. Stress-induced neuroinflammation: mechanisms and new pharmacological targets. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Review*. 2008;41:1037-46

Munhoz CD. et al. Glucocorticoids Exacerbate Lipopolysaccharide-Induced Signaling in the Frontal Cortex and Hippocampus in a Dose-Dependent Manner", *J Neurosci*. 2010;30:13690-13698

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365:61-5

- Nagarkatti P. et al. Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future Med Chem.* 2009;1:1333-49
- Newcomer JW, Farber NB, Olney JW. NMDA receptor function memory and brain aging. *Dialogues Clin Neurosci.* 2000;2:219-32
- Okuda H. et al. Protective effects of N-methyl-D-Aspartate against neuronal damages. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.* 2002;5:153-8
- Oliveira Alves L. et al. Opposite action of hippocampal CB1 receptor in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience.* 2008.
- Oliveira Alves L. et al. Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory. *Learning & Memory.* 2010;17:202-9
- O'sullivan SE, Kendall DA. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology.* 2010;215:611-616
- O'Neill LAJ, Kaltschmidt C. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends in Neuroscience.* 1997;20:252-8
- Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene.* 1999;18:6853-66
- Panikashvili D. et al. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature.* 2001;413:527-31
- Panikashvili D. et al. The endocannabinoid 2-AG protects the blood-brain barrier after closed head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines. *Neurobiol. Dis.* 2005;22:257-64
- Panikashvili D. et al. The endocannabinoid 2-AG protects the blood-brain barrier after closed head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines. *Neurobiol. Dis.* 2006;22:257-64
- Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M. Dissection of the NF- κ B signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ.* 2006;13:861-72
- Peat S. Using cannabinoids in pain and palliative care. *Int J Palliat Nurs.* 2010;16:481-5
- Pegorini S. et al. Vanilloid VR1 receptor is involved in rimonabant-induced neuroprotection. *Br. J. Pharmacol.* 2006;147:552-9
- Pertwee RG. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB₁ receptors. *Life Sci.* 2005;76:1307-24
- Pfaffl M, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30

Pisanti S. et al. Use of cannabinoid receptor agonists in cancer therapy as palliative and curative agents. *Best Pract Res Clin Endocrinol Meta.* 2009;23:117-31,

Rameau GA, Chiu L, Ziff EB. NMDA receptor regulation of nNOS phosphorylation and induction of neuron death. *Neurobiology of aging.* 2003;24:1123-33

Romero R. et al. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Seminars in Reproductive Medicine.* 2007;25:21-39

Rong Y, Baudry M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. *J Neurochem.* 1996;67:662-8

Sagredo O. et al. Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol Neurobiol.* 2007;36:82-91

Sánchez AJ, García-Merino A. Neuroprotective agents: cannabinoids. *Clin Immunol.* 2012;142:57-67

Sarne Y, Mechoulam R. Cannabinoids: between neuroprotection and neurotoxicity. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005;4:677-84

Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 2004;318:215-24

Siebenlist U. NF-kB/IkB proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1332:7-13

Sparkman NL. et al. Bacterial endotoxin-induced behavioral alterations in two variations of the Morris water maze. *Physiol Behav.* 2005;86:244-51

Steiner MA. et al. Conditional cannabinoid receptor type 1 mutants reveal neuron subpopulation-specific effects on behavioral and neuroendocrine stress responses. 2008;33:1165-70

Tanasescu R, Constantinescu CS. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology.* 2010;215:588-97

Tang RH. et al. Myocardin inhibits cellular proliferation by inhibiting NF-kappaB(p65)-dependent cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:3362-7

Tillerson JL. et al. Forced nonuse in unilateral parkinsonian rats exacerbates injury. *J Neurosci.* 2002;22:6790-9

Ulrich O. et al. Immune control by endocannabinoids - New mechanisms of neuroprotection? *J. Neuroimmunol.* 2007;184:127-35

Van Waes V. et al. CB₁ Cannabinoid Receptor Expression in the Striatum: Association with Corticostriatal Circuits and Developmental Regulation. *Front Pharmacol.* 2012;3:21

Walter L, Stella N. Cannabinoids and neuroinflammation. *Br J Pharmacol.* 2004;141:775-85

Xi ZX. et al. Cannabinoid CB₁ receptor antagonist AM251 inhibits cocaine-primed relapse in rats: role of glutamate in the nucleus accumbens. J Neurosci. 2006;26:8531-6

Zhuang SY. et al. Cannabinoids produce neuroprotection by reducing intracellular calcium release from ryanodine-sensitive stores. Neuropharmacology. 2005;48:1086-96

Zoppi S. et al. Regulatory Role of Cannabinoid Receptor I in stress-Induced excitotoxicity and neuroinflammation. Neuropsychopharmacology. 2011;36:805-818