HADASSA BATINGA DA SILVA

**Participação do sistema canabinoide em processos
oxidativo e inflamatório relacionados à neurodegeneração
*in vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

HADASSA BATINGA DA SILVA

**Participação do sistema canabinoide em processos
oxidativo e inflamatório relacionados à neurodegeneração
*in vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Andréa da Silva Torrão

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Hadassa Batinga da.

Participação do sistema canabinoide em processos oxidativo e inflamatório relacionados à neurodegeneração *in vitro* / Hadassa Batinga da Silva. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Andréa da Silva Torrão.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Neurofisiologia.

Versão do título para o inglês: Participation of the cannabinoid system in oxidative and inflammatory processes related to neurodegeneration *in vitro*.

1. Sistema endocanabinoide 2. Estresse oxidativo 3. Receptor CB1
4. Neuroproteção I. Torrão, Profa. Dra. Andréa da Silva II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0177/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Hadassa Batinga da Silva.

Título da Tese: Participação do sistema canabinoide em processos oxidativo e inflamatório relacionados à neurodegeneração *in vitro*.

Orientador(a): Profa. Dra. Andréa da Silva Torrão.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em
sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 498/12 referente ao projeto intitulado: "*Papel do sistema canabinoide em um modelo experimental in vitro da doença de Parkinson*" sob a responsabilidade de **Hadassa Batinga da Silva**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 14 de fevereiro de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091 7733- e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEPSh.030/2014.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Protocolo de Isenção CEP-ICB nº 498/12, informo que o título do Projeto foi alterado para "*Participação do sistema canabinoide nos processos oxidativo e inflamatório relacionados à neurodegeneração in vitro*" sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 17 de setembro de 2014.

Prof. Dr. PAULO M.A. ZAONOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice- Coordenador da Comissão de
Ética no Uso de Animais - ICB/USP

Ao meu companheiro Juan Pablo que esteve presente nesse último ano de doutorado, e me ajudou de várias formas na finalização dessa etapa. Sem ele a conclusão desse trabalho seria imperfeita.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu quero agradecer a Deus que me concedeu na vida disposição, coragem, força de começar e terminar esse doutorado.

Aos meus pais, especialmente a minha mãe, que em momento algum deixou de me apoiar e à minha irmã que com todo seu carinho e preocupação esteve ao meu lado me dando suporte.

Aos meus pais na ciência, prof^a Adriana Ximenes e prof. Luiz Menna-Barreto, que me deram força e conselhos sábios em cada dificuldade enfrentada, pois sempre tem algo de bom a acrescentar em todos os aspectos da vida. Foram e sempre serão meus guias.

À prof^a Andréa Torrão por possibilitar a realização desse projeto.

Às minhas companheiras de casa, Ana Claudia e Anne Letícia, por compartilhar momentos felizes e tristes durante esse tempo dividindo apartamento, melhor apartamento não houve em toda a minha história.

Ao meu querido Juan Pablo, que apareceu no momento mais certo da minha vida, e foi fundamental para conclusão de mais essa etapa, sem sua paciência e carinho muitas discussões científicas não teriam sido possíveis, além dos muitos vinhos provados durante esse ano.

Aos meus amigos e amigas, novos e antigos, de perto e de longe, que estiveram ao meu lado, ouvindo todo o tipo de conversa a respeito desse doutorado por esses três anos.

Ao Caio Mazucanti que do início ao fim esteve me ajudando, clareando minhas ideias, com sua genialidade impressionante, sem ele tudo teria sido muito mais difícil.

À Gabriela P. Kirsten, que foi essencial para o início dessa jornada.

À Jáfia que por vários momentos compartilhamos nossas angústias com as células, mas superamos todas, entre outras colaborações.

Às meninas do laboratório, Taisa, Fernanda Prieto, Fernanda Crunfli, Talita, Jáfia, Priscila que me ajudaram com a rotina do laboratório.

Aos laboratórios dos profs. Angelo Carpinelli, Cristoforo Scavone e Luiz Britto por me ajudarem com equipamentos, anticorpos, e células, que muitas vezes precisei recorrer a eles. Sem eles o projeto seria inviabilizado.

Aos técnicos de laboratórios Adilson, Patrícia, Andressa me deram o suporte técnico necessário.

Às agências de fomento à pesquisa CNPq e FAPESP que sem o suporte financeiro nada disso teria sido realizado.

Maybe life is like a ride on a freeway
Dodging bullets while you're trying to find your way
Everyone's around, but no one does a damn thing
It brings me down, but I won't let them
If I seem bleak, well you'd be correct
And, if I don't speak it's 'cause I can't disconnect
But, I won't be burned by the reflection
Of the fire in your eyes as you're staring at the sun
When I ran, I didn't feel like a runaway
When I escaped, I didn't feel like I got away
There's more to living than only surviving
Maybe I'm not there, but I'm still trying
Though you hear me, I don't think that you relate
My will is something that you can't confiscate
So forgive me, but I won't be frustrated
By destruction in your eyes as you're staring at the sun
As you're staring at the sun
(Dexter Holland – The Offspring)

RESUMO

BATINGA, H. **Participação do sistema canabinoide em processos oxidativo e inflamatório relacionados à neurodegeneração *in vitro***. 2014. 88 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O sistema endocanabinoide atua como neuromodulador em uma vasta variedade de processos, sendo o principal receptor no cérebro o receptor CB1. A ativação do receptor CB1 leva a modulação de processos intracelulares que eventualmente muda a resposta celular de acordo com o estímulo. Além disso, a sua ativação está envolvida em mecanismos de proliferação, diferenciação, movimentação e morte celular. O objetivo desse trabalho foi avaliar a participação desse sistema em processos oxidativo e inflamatório relacionados à neurodegeneração *in vitro*. Foi utilizado a linhagem de neuroblastoma Neuro2a diferenciada em células dopaminérgicas (com dbcAMP) que foram expostas a três condições: 6-hidroxidopamina (6OHDA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e lipopolissacarídeo (LPS) e co-tratadas com o agonista do receptor CB1 ACEA e o antagonista/agonista inverso AM251 por 24 horas. Foram analisados os parâmetros funcionais de viabilidade celular por MTT e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) através da citometria de fluxo com a utilização da sonda dihidroetídio (50 µM). Parâmetros mecanísticos de sinalização intracelular através da técnica western blot foram avaliados. Observamos que o tratamento com 2 µM de ACEA ou de 2 µM de ACEA e AM251 produziram um aumento da viabilidade celular nos três modelos de exposição propostos (LPS, 6OHDA e H₂O₂). Ao mesmo tempo observamos redução da produção de ROS com os tratamentos com 2 µM de ACEA para os modelos de 6OHDA e LPS, 1 µM de ACEA no modelo de H₂O₂ e 2 µM de ACEA e AM251 para os modelos de 6OHDA e LPS. Os tratamentos com 1 µM de ACEA e 2 µM de ACEA e AM251 no modelo de 6OHDA ou com 1 µM de ACEA no modelo de H₂O₂ geraram ativação da via da proteína ERK1/2. Os mesmos tratamentos levaram à inibição da morte celular por diminuição dos níveis de expressão da proteína caspase 3 nos três modelos estudados. Concluímos que os canabinoides exógenos estudados foram capazes de proteger as células dopaminérgicas do dano oxidativo e inflamatório conduzindo ao aumento da sobrevivência celular devido à diminuição da produção de ROS. Percebemos que a forma de ativação do receptor CB1 não é única e age ativando ou desativando a proteína ERK1/2 na tentativa da manutenção da viabilidade celular. A proteína ERK1/2, por sua vez, apresentou dualidade na sua ativação, mostrando sua importância na decisão final do destino da célula. Se foi ativada pelo receptor CB1 maiores chances de sobrevivência, sem a ativação do receptor CB1 a via da ERK1/2 se direciona para a morte celular.

Palavras-chave: Sistema endocanabinoide. Estresse oxidativo. Receptor CB1. Neuroproteção.

ABSTRACT

BATINGA, H. **Participation of the cannabinoid system in oxidative and inflammatory processes related to neurodegeneration *in vitro***. 2014. 88 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

In the nervous system the endocannabinoid system acts as a neuromodulator in a wide variety of processes. Its major receptor in the brain is CB1 receptor. The CB1 receptor activation leads to modulation of intracellular processes that may change the cellular response accordingly to stimulus and its activation mechanisms are involved in proliferation, differentiation, cell movement and death. The aim of this study was to evaluate the participation of this system in oxidative and inflammatory processes related to neurodegeneration *in vitro*. The cell line of neuroblastoma Neuro2A was differentiated with dbcAMP (1mM) in dopaminergic cells and they were exposed to three conditions separately: 6-hydroxydopamine (6OHDA), hydrogen peroxide (H₂O₂) and lipopolysaccharide (LPS) and they were co-treated with the CB1 receptor agonist, ACEA and the antagonist / inverse agonist AM251 for 24 hours. As functional parameters were analyzed the cell viability by MTT and production of reactive oxygen species (ROS) by flow cytometry using the probe dihydroethidium (50 µM). We used western blotting technique to analyze of CB1 receptor's signaling pathway. The results were neuroprotective in co-treatment with 2 µM of ACEA and treatment with 2 µM of ACEA and AM251 for the three models proposed (LPS, 6OHDA and H₂O₂) for cell viability. A reduction in ROS production was observed in the treatment of 2 µM of ACEA for 6OHDA and LPS models. However, 1 µM of ACEA led to a reduction in ROS in H₂O₂ model. The same effect was observed with 2 µM of ACEA and AM251 treatment in LPS of 6OHDA models. The CB1 receptor's activation was indicated by phosphorylation of ERK1/2 protein in the 6OHDA model with treatments of 1 µM and 2 µM of ACEA and AM251 and model treated with H₂O₂ and 1 µM of ACEA. It was obtained inhibition of cell death by decreasing levels of caspase 3 protein in all three models studied with treatments of 2 µM of ACEA and 2 µM of ACEA and AM251 for the models of 6OHDA and LPS, and 1 µM of the ACEA for H₂O₂ model. We concluded that the exogenous cannabinoids selected were able to protect dopaminergic cells from oxidative and inflammatory damage through increased cell survival by decreasing the production of ROS. We realized that the form of activation of CB1 receptor is not just only one, and it works by activating or deactivating ERK1/2 protein in the attempt of maintaining cell viability; ERK1/2 protein showed duality in its activation, demonstrating its importance in the final decision of the cell fate. If was activated by CB1 the cells has higher chances of living, without activating CB1 receptor the ERK1/2 pathway leads to cell death.

Keywords: Cannabinoid system. Oxidative stress. CB1 receptor. Neuroprotection.

LISTAS DAS FIGURAS

Figura 1 – Esquema simplificado da organização funcional dos núcleos da base.....	30
Figura 2 – Desenho experimental.....	35
Figura 3 - Níveis da proteína TH na linhagem Neuro2a após 2 e 3 dias do tratamento com dbcAMP.....	39
Figura 4 – Níveis de proteína do receptor CB1 na linhagem Neuro2a após 2 e 3 dias do tratamento com dbcAMP.....	40
Figura 5 - Curva concentração-resposta da Neuro 2a diferenciada exposta por 24 horas ao agonista do receptor CB1, ACEA, e ao seu antagonista AM251 através do ensaio de viabilidade (MTT).....	41
Figura 6 - Curva concentração-resposta de 6-OHDA em linhagem de células Neuro-2a diferenciada com dbcAMP. Viabilidade celular analisada por MTT.....	42
Figura 7 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA (50 µM) e tratadas com agonista do receptor CB1 (ACEA) por 24 horas.....	42
Figura 8 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA (50 µM) e tratadas com antagonista do receptor CB1 (AM251) por 24 horas.....	43
Figura 9 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA (50 µM) e tratadas com agonista do receptor CB1, ACEA, e antagonista, AM251, por 24 horas.....	44
Figura 10 - Ensaio produção de espécies reativas (ROS) por citometria de fluxo (50 µM de DHE) em cultura de células diferenciadas expostas à 6OHDA (50 µM), agonista do receptor CB1 (1 µM de ACEA) e antagonista (1 µM de AM251) depois de 24 horas.	45
Figura 11 - Ensaio produção de espécies reativas (ROS) por citometria de fluxo (50 µM de DHE) em cultura de células diferenciadas expostas à 6OHDA (50 µM), agonista do receptor CB1 (2 µM de ACEA) e antagonista (1 µM de AM251) depois de 24 horas.	46
Figura 12 - Curva concentração-resposta de capsazepina em	

linhagem de células Neuro 2a diferenciada com dbcAMP. Viabilidade celular analisada por MTT.....	47
Figura 13 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA (50 μ M) e tratadas com agonista ACEA e antagonista do receptor TRPV1 (CPZ) por 24 horas.....	47
Figura 14 - Curva tempo-resposta da fosforilação da ERK 1/2 estimulada pelo tratamento com ACEA (1 μ M e 2 μ M) e AM251 (1 μ M) em células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA.....	48
Figura 15 - Curva tempo-resposta dos níveis de expressão da ativação da caspase 3 inibida pelo tratamento com 1 μ M e 2 μ M ACEA e 1 μ M de AM251 em células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA.....	49
Figura 16 - Curva tempo-resposta da ativação da PI3K estimulação pelo tratamento com 1 μ M e 2 μ M ACEA e 1 μ M de AM251 em células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA.....	50
Figura 17 - Análise da fosforilação da AKT aos 20 minutos estimulada pelo tratamento com ACEA (1 μ M e 2 μ M) e AM251 (1 μ M) em células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA.....	51
Figura 18 - Curva concentração-resposta das células Neuro 2a expostas ao LPS durante 24 horas através do ensaio de viabilidade (MTT).	52
Figura 19 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao LPS (30 μ g/ml) e tratadas com agonista do receptor CB1 (ACEA) por 24 horas.....	53
Figura 20 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao LPS (30 μ g/ml) e tratadas com antagonista do receptor CB1 (AM251) por 24 horas.....	53
Figura 21 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao LPS (30 μ g/ml) e tratadas com agonista do receptor CB1, ACEA, e antagonista, AM251 por 24 horas.....	54
Figura 22 - Ensaio produção de espécies reativas (ROS) por citometria de fluxo (50 μ M de dihidroetídio – DHE) em cultura de células Neuro 2a diferenciadas expostas ao LPS (30 μ g/ml), agonista	

do receptor CB1 (2 μ M de ACEA) e antagonista (1 μ M de AM251) depois de 24 horas.....	55
Figura 23 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao LPS (30 μ g/ml) e tratadas com agonista do receptor CB1 (ACEA, 2 μ M) e antagonista do canal TRPV1, CPZ (5 μ M e 10 μ M) por 24 horas.....	56
Figura 24 - Analise Western blot da fosforilação da ERK 1 /2 aos 20 minutos das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao LPS e co-tratadas com 2 μ M de ACEA e 1 μ M de AM251.....	56
Figura 25 - Analise western blot da expressão da ativação da caspase 3 inibida pelo tratamento com 1 μ M e 2 μ M de ACEA e 1 μ M de AM251 em células Neuro 2a diferenciadas expostas ao LPS por 24 horas.....	57
Figura 26 - Curva concentração-resposta das células Neuro 2a diferenciadas exposta ao H ₂ O ₂ por 24 horas através do ensaio de viabilidade (MTT).....	58
Figura 27 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao H ₂ O ₂ (40 μ M) e tratadas com agonista do receptor CB1 (ACEA).....	58
Figura 28 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao H ₂ O ₂ (40 μ M) e tratadas com antagonista do receptor CB1 (AM251)	59
Figura 29 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao H ₂ O ₂ (40 μ M) tratadas com agonista do receptor CB1, ACEA, e antagonista, AM251, por 24 horas.....	60
Figura 30 - Ensaio produção de espécies reativas (ROS) por citometria de fluxo (50 μ M de DHE) em cultura de células diferenciadas expostas ao H ₂ O ₂ (40 μ M), agonista do receptor CB1 (2 μ M de ACEA) e antagonista (1 μ M de AM251) depois de 24 horas.	61
Figura 31 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao H ₂ O ₂ (40 μ M) e tratadas com agonista do receptor CB1 (ACEA, 2 μ M) e antagonista do canal TRPV1, CPZ (5 μ M e 10 μ M) por 24 horas.....	62

Figura 32 - Analise Western blot da fosforilação da ERK1/2 aos 20 minutos das células Neuro 2a expostas ao H ₂ O ₂ e co-tratadas com 1 µM de ACEA e AM251.....	63
Figura 33 - Análise western blot da expressão da ativação da caspase 3 inibida pelo tratamento com 1 µM de ACEA e 1 µM de AM251 em células diferenciadas expostas ao H ₂ O ₂ por 24 horas.....	64

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1 - Concentrações utilizadas nos experimentos de curvas concentração-resposta.....	35
Tabela 2 - Resumo dos principais resultados.....	65

LISTA DAS ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2-Aracdonoil glicerol
6OHDA	6-hidroxidopamina
ACEA	aracdonoil-2'-cloroetilamida – agonista do receptor CB1
AEA	anandamida – aracdonoiletanolamida
AKT	proteína cinase B (PKB do inglês <i>protein kinase B</i>)
AM251	<i>N</i> -(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1 <i>H</i> -pyrazole-3-carboxamide – antagonista/agonista inverso do receptor CB1
CB1	receptor canabinoide tipo 1
CB2	receptor canabinoide tipo 2
CP55,940	(-)- <i>cis</i> -3-[2-Hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)phenyl]- <i>trans</i> -4-(3-hydroxypropyl)cyclohexanol - Agonista do receptor CB1
CPZ	capsazepina – antagonista do receptor TRPV1
CTL	Controle
DAGL	diacilglicerol lipase
DbcAMP	Do inglês <i>Dibutyryl</i> adenosine 3',5'- <i>cyclic monophosphate</i>
DHE	Do inglês <i>dihydroethidium</i>
DMSO	dimetil sulfoxido
DP	doença de Parkinson
DSI/DSE	do inglês <i>Depolarization-induced suppression of inhibition/ excitation</i>
DTT	ditiol treitol
ECS	do inglês <i>endocannabinoid system</i>
ERK	do inglês extracellular regulated kinase
FAAH	Do inglês <i>fat acid amide hydrolase</i>
GABA	ácido gama amino butírico
GPCR	do inglês <i>G protein coupled receptor</i>
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
JNK	do inglês <i>c-JUN N terminal kinase</i>
LDH	lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarideo
MAGL	monoacilglicerol lipase
MAPK	do inglês – <i>mitogen activated protein kinase</i>
MTT	do inglês 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NarPE	N-aracdonoil-fosfatidiletanolamida
NMDA	receptor N-metil-D-aspartato
(ns)	não significativo
PBS	do inglês <i>phospho buffer saline</i>
PI3K	do inglês <i>phosphatidylinositol 3 kinase</i>
PLA ₂	do inglês <i>phospholipase A2</i>
PLC	do inglês <i>phospholipase C</i>
ROS	do inglês <i>Reactive oxyge species</i>
SR141716A	do inglês <i>N</i> -(Piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1 <i>H</i> -pyrazole-3-carboxamide hydrochloride ou rimonabant - antagonista/agonista inverso do receptor CB1

TH	tirosina hidroxilase
THC	Δ 9-tetrahidrocanabinol
TNF- α	do inglês <i>tumoral necrose factor α</i>
TLR-4	do inglês <i>Toll-like receptor 4</i>
TRPV1	do inglês transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 ou receptor valinoide
TTBS	do inglês <i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
WIN55,212-2	(<i>R</i>)-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3- <i>de</i>]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone mesylate - Agonista do receptor CB1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Histórico.....	21
1.2 Sistema Endocanabinoide.....	22
1.3 Receptor CB1.....	24
1.4 Via De Sinalização Do Receptor CB1.....	25
1.5 Visão Terapêutica Dos Canabinoides.....	27
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVO GERAL.....	33
3.1 Objetivos Específicos	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 Cultivo celular e tratamentos	34
4.2 Ensaios de viabilidade celular (MTT).....	36
4.3 Western Blot	36
4.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo	37
4.5 Análise Estatística.....	38
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Diferenciação das células e expressão de TH e receptor CB1.....	39
5.2 Padronização da concentração do agonista ACEA e antagonista AM251 ..	40
5.3 Modelo de morte celular por exposição à 6OHDA.....	41
5.4 Modelo de morte celular por exposição ao Lipopolissacarideo (LPS)	51
5.5 Modelo de morte celular por exposição ao H ₂ O ₂	57
6 DISCUSSÃO	65
6.1 A ação dos agentes indutores de mortes (6OHDA, H ₂ O ₂ e LPS).....	67

6.2 Ação dos canabinoides utilizados (ACEA e AM251) e suas respostas geradas	69
6.3 Vias de sinalização que determinam o destino das células envolvidas com o receptor CB1.....	73
6.4 Considerações finais	77
7 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Cannabis é um gênero para uma única espécie de planta, porém existe na forma de 3 espécies (*Cannabis indica* originária do Nepal; *Cannabis ruderalis* da Mongólia e sul da Sibéria e a *Cannabis sativa* das savanas africanas que pode alcançar 5 metros de altura). Essas plantas existem nas formas masculinas e femininas, porém seus princípios ativos estão presentes em maior quantidade nas plantas femininas (1).

A relação do homem com a *Cannabis* vem da China há muitos anos antes de Cristo. Já existiam registros sobre o uso da planta para diversos fins. O uso da *Cannabis* fez parte de várias culturas e civilizações antigas, principalmente como forma de se aproximar dos deuses, além do seu uso medicinal e artesanal para confecção de tecidos na região dos Balcãs. Desde essa época já se tinham conhecimento de suas propriedades psicoativas (1).

Há registros do uso medicinal da *Cannabis* no tratamento de ulcerações e feridas de difíceis cicatrizações, estimulante sexual, contra o reumatismo, inflamação de ouvido, como agente anticonvulsivante, antiespasmódico para casos de epilepsia e tétano (1).

Em 1964, o pesquisador israelense Raphael Mechoulam isolou a forma pura pela primeira vez do principal princípio ativo da maconha denominado Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) e, em 1967, isolou mais outro composto da *Cannabis*, o canabidiol, que já havia sido isolado e descrito na década de 40 (2,3).

Apesar de todo esse esforço químico para o conhecimento de cada composto presente na planta, até aquele momento não se sabia exatamente as vias moleculares para ação deles no organismo humano. Para isso foi necessário ocorrer avanços nas técnicas de biologia molecular, uma ferramenta importante, que levou ao conhecimento do sítio de ligação do THC, conhecido como receptor canabinoide tipo 1 (CB1) (4). Três anos mais tarde desse evento, o receptor CB2 foi clonado (5). Em 1992 o grupo de Mechoulam isolou a anandamida, o primeiro endocanabinoide (6) e em seguida um grupo de pesquisadores japoneses isolaram o segundo endocanabinoide conhecido como 2-araquidonoilglicerol (2-AG).

1.2 Sistema Endocanabinoide

O sistema endocanabinoide (do inglês *endocannabinoid system* - ECS) é um antigo, evolutivamente conservado e ubíquo sistema lipídico de sinalização encontrado em todos os vertebrados. Vem sendo demonstrado que esse sistema exerce uma grande importância com funções regulatórias por todo o corpo (7).

O ECS é conhecido pelos seus componentes: receptores CB1 e CB2, ligantes endógenos, etanolaminas derivadas do ácido araquidônico, dos quais os mais estudados são a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), e finalmente, suas enzimas responsáveis pelos mecanismos de síntese e mecanismos específicos de captação, inativação e degradação.

O primeiro ligante do receptor CB1 a ser isolado foi a araquidonoiletanolamida, conhecido como AEA, do sanscrito “alegria interna” (6) e logo depois o 2-AG (8). Esses ligantes são principalmente derivados de ácidos graxos poli-insaturados. Embora, tem sido proposta alguma seletividade para os receptores CB1 e CB2 dependendo da concentração e potências, em geral ambos são capazes de se ligar aos dois receptores (9).

A síntese da AEA envolve a quebra do seu precursor N-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NArPE) através de mecanismos dependente de Ca^{+2} envolvendo as seguintes enzimas: fosfolipase C (PLC), fosfolipase A2 (PLA2) e N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipase D (NAPE-PLD); 2-AG, por sua vez, tem como precursor o 2-araquidonato contendo diacilgliceróis, sendo a sua síntese mediada pela atividade da PLC e da diacilglicerol lipase (DAGL) (10,11). A degradação dos endocanabinoides envolvem as enzimas ácido graxo amido hidrolase (FAAH) e a monoacilglicerol lipase (MAGL) (12).

Os endocanabinoides são produzidos de acordo com a demanda pela estimulação do receptor canabinoide, e imediatamente liberados; eles não são estocados. Tem sido proposto duas formas de inativação do endocanabinoide. Uma delas é que a molécula pode ser transportada via transportadores seletivos e/ou uma vez dentro da célula podem seguir diferentes vias metabólicas como hidrólise pela FAAH e MAGL ou ainda uma lipoxigenação pelas lipoxigenases, cicloxigenases e citocromo P450 (9,13).

É importante ser mencionado que a AEA é capaz de se ligar a vários alvos moleculares que não são acoplados a proteína G, como canais de cátions de

membrana. Esses são geralmente modulados por concentrações baixas ou sub-micromolares dos endocanabinoides. Exemplos de canais que são bloqueados quando a AEA se liga a eles: TWIK – canais de K^+ sensíveis a ácido, canais de K^+ , canais de Ca^{+2} tipo T. Por sua vez o receptor vaniloide tipo 1 (VR1 ou TRPV1) – conhecido por ser específico para capsaicina, substância ativa das pimentas – é ativado na presença da AEA (13–15).

No sistema nervoso central tem sido demonstrado que os endocanabinoides agem como mensageiros retrógrados através da supressão transitória das correntes inibitórias e excitatórias (DSI e DSE, respectivamente) (13,15–17) sugerindo a importância desse sistema para plasticidade sináptica.

Essa atuação retrógrada funciona após despolarização pós-sináptica da membrana do neurônio que libera o endocanabinoide, em resposta à elevação do cálcio intracelular, e este se difunde para os receptores CB1 do neurônio pré-sináptico; sua ação consiste em inibir a liberação do neurotransmissor; a ativação pré-sináptica dos receptores CB1 está envolvida na depressão em longo prazo de neurônios do estriado dorsal e nos núcleos accumbens. Dependendo do circuito, os endocanabinoides podem ativar ou inibir a neurotransmissão (13).

No sistema nervoso o sistema endocanabinoide atua como neuromodulador em uma vasta variedade de processos, como regulação do comportamento motor, cognição, aprendizagem e memória, e antinocicepção, além do envolvimento no desenvolvimento neuronal (9,13). A participação desse sistema nesses processos tem sido baseada na distribuição do receptor CB1 e dos níveis de mRNA. A maior concentração da expressão do receptor CB1 foi encontrada no córtex cerebral, núcleos da base e cerebelo, que coincide com efeito evidente sobre o controle motor. A localização pré-sináptica indica sua função modulatória na liberação de neurotransmissor - esse mapeamento da distribuição dos receptores tem sido feita por radioautografia, hibridização *in situ* e imuno-histoquímica, devido a marcante resolução espacial que essa técnica oferece (18).

Os receptores CB1 também são encontrados em núcleos responsáveis pelo controle da dor, temperatura, ciclo sono-vigília, tronco encefálico e naqueles relacionados com funções hormonais como hipotálamo, hipófise e várias regiões periféricas (19–23). Os receptores CB1 são encontrados em alta densidade principalmente nas regiões axonais e em terminais nervosos; o mRNA encontrado

no corpo celular sugere que eles sejam produzidos no soma e então transportados para os axônios e terminais (18).

Acreditava-se que o receptor CB2 estava restrito apenas ao sistema imune e ausente no sistema nervoso central (SNC) ou apenas em caso de ativação da micróglia (13,24). Porém, posteriormente foi observada a sua presença no SNC em condições saudáveis (25,26) em várias regiões como células piramidais do hipocampo, CA2 e CA3, cerebelo, hipotálamo, mesencéfalo, ponte, bulbo, córtex cerebral, substância negra *pars reticulata*, entre outras (26).

1.3 Receptor CB1

Os receptores canabinoides tipo 1 (CB1) e tipo 2 (CB2) são expressos de forma diferente, e possuem, também, sensibilidade diferente aos endocanabinoides. Os receptores CB1 que estão presentes no SNC estão localizados predominantemente nos terminais nervosos, são responsáveis pelos efeitos psicotrópicos dos canabinoides exógenos, como o THC. Farmacologicamente, a afinidade da AEA e do 2-AG é ligeiramente maior pelos receptores CB1 do que pelo CB2. No entanto, o 2-AG apresenta maior eficácia em ambos receptores do que a anandamida (27).

A análise da sequência primária de aminoácido do receptor CB1 confirma a presença de sete regiões de domínio transmembrana hidrofóbicas que se estendem através da membrana plasmática que vão do meio extra para o intracelular, possuindo seu extremo amino terminal no extracelular e o seu extremo carboxi terminal no intracelular. Considerando essa estrutura, esse receptor possui as características para ser um receptor acoplado a proteína G, e pode se apresentar na forma glicosilado com um peso molecular de 64 kDa, mas tratando-os com endoglicosidases F e/ou H seu peso molecular reduz para 59 e 53 kDa, respectivamente (20,28).

Muitos membros da superfamília de receptores acoplados a proteína G contem resíduos de cisteína conservados que ajudam a estabilizar a estrutura terciária do receptor devido ao seu envolvimento com uma ponte dissulfídica intramolecular; na maioria dos receptores essa ponte acontece nos segundos e terceiros domínios transmembranas extracelulares, também entre o quarto e quinto domínio hidrofóbicos. No entanto, no receptor CB1 nenhuma cisteína foi achada

entre as segundas alças extracelulares, mas sim nas terceiras alças extracelulares contendo dois ou mais cisteínas (20).

De acordo com um modelo computacional do receptor CB1, pode haver um sítio de ligação para o cálcio no domínio amino terminal. De maneira interessante, o ligante pode interagir com o receptor através de uma ponte de hidrogênio estabelecida entre o grupo hidroxil fenólico e o grupo carboxi da Ala¹⁹⁸ do receptor. (20).

Os receptores canabinoides são capazes de desenvolver tolerância através da diminuição da expressão, internalização e mudanças conformacionais. Essas alterações são executadas para diminuir a interação do receptor com o ligante, principalmente quando são expostos a este por um tempo longo. O processo de internalização acontece quando os receptores presentes na membrana são translocados para dentro do citoplasma para ser reciclado ou degradado; esse processo resulta na diminuição do número de receptores na membrana celular, com a consequente redução do acoplamento do ligante ao receptor; o desenvolvimento da tolerância não acontece de modo uniforme por todo o cérebro (28).

Existe a sensibilização do receptor canabinoide por repetidas administrações de agonistas canabinoides, processo inverso ao da tolerância. Sensibilização ocorre durante sua repetida administração de, por exemplo, drogas de abuso, onde seu efeito persiste por muito tempo mesmo depois que a exposição à droga foi descontinuada (28).

Existem algumas evidências que outros receptores, que não o CB1 nem CB2, podem também ser alvo dos canabinoides. Dentre esses se encontra o chamado receptor órfão GPR55, que tem como agonistas alguns canabinoides como virodamina, palmitoiletanolamida e o AM251, e como antagonista funciona o canabidiol (29).

1.4 Via De Sinalização Do Receptor CB1

A ativação do receptor CB1, geralmente acoplado a proteína G, leva à modulação de processos intracelulares que eventualmente mudam a resposta celular de acordo com o estímulo (27).

O primeiro relato do início da caracterização da via de sinalização do receptor CB1 começou com Howlett e Fleming (30) descrevendo a inibição que o Δ^8 -

Tetrahydrocannabinol e THC exercem sobre a adenilato ciclase demonstrado através de uma curva concentração-resposta bifásica, no qual esse efeito foi bloqueado pela toxina pertussis, indicando que esse efeito foi mediado pela proteína $G_{i/o}$ (20,31).

No entanto, essa não é a única forma dos canabinoides agirem. Tem sido demonstrado que em algumas circunstâncias o receptor CB1 pode se acoplar a proteína G_s ; além de que algumas isoformas (2, 4 ou 7) da adenilato ciclase estimulada pelo receptor CB1 pode resultar na produção de AMP cíclico, apesar desse efeito ter sido mediado por dímeros $\beta\gamma$ liberados da proteína G_i (32).

Lauckner, Hille e Mackie (2005) propuseram que o CB1 também pode estar acoplado a família da proteína $G_{q/11}$ e ao ser ativado aumenta os níveis de cálcio intracelular.

Receptores acoplados à proteína G podem regular proliferação, diferenciação e morte celular através das proteínas cinases ativadas por mitógenos (do inglês – *mitogen activated protein kinase* – MAPK), as quais estão organizadas de forma hierárquica como MAPK ativadas por MAPK cinases (MAPKK), estas por sua vez são ativadas por MAPKK cinases (MAPKKK). As MAPKKK são ativadas por pequenas GTPases ou outras proteínas cinases. A ativação das MAPK's levam à ativação da cinase regulada por sinal extracelular (do inglês *extracellular-signal-regulated kinase* – ERK), c-JUN N-terminal cinase (JNK), p38 MAPK ou proteínas ERK5 (31,34).

A estimulação do receptor CB1 *in vitro* e *in vivo* leva a ativação da ERK1 /2 em diversos tipos celulares. Para esta ativação outras proteínas precisam ser ativadas e esta ação envolve mecanismos diferentes incluindo a participação da proteína $G_{i/o}$, ativação da fosfatidilinositol 3 cinase (do inglês *phosphatidylinositol 3 kinase* – PI3K), inibição da adenilato ciclase e proteína cinase A (do inglês *protein kinase A* – PKA), e a ativação da Src tirosina cinase FYN (31,34,35). A ordem e a presença de cada uma delas não se fazem necessariamente presente. Isso vai depender de outros fatores como tipo celular, concentração do ligante e entre outros (31).

Além dessas proteínas, o receptor CB1 modula o metabolismo de esfingolipídio, levando ao aumento dos níveis de ceramida por ativar a hidrólise da esfingomielina ou melhorar a síntese de ceramida – lipídio segundo mensageiro que pode induzir a apoptose e parada do ciclo celular, efeito que não depende do acoplamento do receptor à proteína G, no entanto, parece estar envolvido com o

adaptador de proteína FAN (fator associado com ativação neutro da esfingomielinase) (34).

Outros alvos para os canabinoides que podem envolver o destino da célula incluem o fator de transcrição NF κ B e a enzima óxido nítrico sintase. No entanto, os efeitos dos canabinoides sobre essas duas proteínas são variadas, e os mecanismos ainda não foram completamente elucidados (34).

Existem evidências que dois receptores podem ser co-expressos, com consequências funcionais. A dimerização dos GPCR é um paradigma útil para explicar propriedades funcionais alteradas na presença de outros receptores. Tem sido mostrado que o receptor CB1 pode dimerizar (19,36) com outros CB1, CB2, receptor D2 de dopamina entre outros.

Uma das consequências da dimerização poderia ser um acoplamento de tráfico de GPCR de/para a membrana plasmática, por exemplo, ocasionando uma mudança na localização dos receptores na membrana para vesículas intracelulares. O fato é que a co-expressão do receptor CB1 altera a função e sinal de transdução de outros GPCR e vice-versa (31).

Os receptores CB1 quando acoplados a proteína G_{i/o} reduzem a produção de AMP cíclico, além de modularem alguns tipos de canais iônicos, como os canais de cálcio dependente de voltagem do tipo L, N, P/Q; melhora a ativação de canais de K⁺ dependente de voltagem do tipo A e canais para K⁺ retificadores de corrente de entrada acoplados a proteína G (20,31).

1.5 Visão Terapêutica Dos Canabinoides

Estudos farmacológicos ao longo dos últimos anos têm levantado hipóteses baseadas na possibilidade da ação neuroprotetora dos endocanabinoides depois de traumas neuronais agudos ou até mesmo crônicos. Além do grande investimento nas pesquisas sobre doenças neurodegenerativas que envolvem distúrbios motores como doença de Parkinson e coreia de Huntington, e ainda problemas relacionados com a memória e aprendizagem como a doença de Alzheimer, pode ainda se observar em outros modelos experimentais resultados promissores para uma grande variedade de distúrbios e doenças como lesão cerebral, dor crônica, glaucoma, asma, câncer, AIDS e outras doenças (9,12,13,37–40).

Os efeitos dos canabinoides podem apresentar dois lados da mesma moeda. Um lado seria esse tão esperado efeito de neuroproteção por eles apresentarem propriedades antioxidantes (41,42) e anti-inflamatórias (43,44) sendo por ativação ou bloqueio do receptor CB1. No entanto, o outro lado da moeda seria o efeito neurotóxico que também tem sido descrito em modelo *in vivo*. Sugere-se que esse duplo efeito seja devido às diferentes concentrações utilizadas dos canabinoides (45–47) além da ação inespecífica já que a estrutura química lipofílica dos canabinoides permite que atravessem a membrana celular e atuem em outros receptores como mencionado acima.

Porém, a visão positiva dos canabinoides pode estar no fato deles serem mensageiros retrógrados e inibirem a liberação de neurotransmissores, o que torna um ponto importante no que diz respeito à redução da excitotoxicidade do glutamato (48,49). Há ainda relatos que o pré-tratamento com o WIN55,212-2 (agonista do receptor CB1) reduz o volume da área necrosada vista após uma isquemia tanto global quanto local, de modo que o efeito foi revertido quando se conjugou o tratamento com um antagonista de CB1 (38).

Sarne e colaboradores (2011) encontraram um efeito interessante quando utilizaram concentrações extremamente baixas de THC em modelo *in vivo*, na ordem de nanomolar, que produziu efeitos opostos aos convencionais (aumento da temperatura e atividade locomotora), e os mesmos animais foram testados no labirinto aquático de *Morris* após 3 semanas e percebeu-se que houve um déficit cognitivo nos animais que receberam concentrações ultra baixas (na ordem de nanomolar). No entanto, quando se testou um pré-condicionamento com essa concentração muito baixa 3 dias antes de uma injeção de uma droga epileptogênica o resultado foi protetor, o grupo tratado com THC não teve diferença estatística com o grupo controle nos testes comportamentais (46). Esses dados sugerem que a ação aguda pode ser diferente da ação crônica de concentrações ultra baixas.

Outro exemplo de proteção decorrente da ativação do receptor CB1 foi vista em modelo de encefalomielite autoimune onde a ativação do receptor CB1 regulou os efeitos do TNF- α (50) e o uso do agonista WIN55,212-2 apresentou uma ação anti-inflamatória em animais expostos ao lipopolissacarídeo (LPS) utilizado como modelo animal da doença de Parkinson (43,44,51).

A transmissão dopaminérgica é influenciada pelo sistema endocanabinoide que exerce a função de controlar a liberação de dopamina, embora não tenha sido

encontrado nenhuma co-localização ou co-expressão dos receptores CB1 com os neurônios dopaminérgicos, sugerindo assim um controle indireto de sua parte (9,13)

Pisani e colaboradores mostraram uma diminuição na disponibilidade de receptores CB1 na substância negra de paciente com doença de Parkinson (DP), no entanto, um aumento na expressão de receptores CB1 foi encontrado nas projeções dopaminérgicas nigroestriatais, mesolímbicas e mesocorticais desses pacientes, porém, não houve diferença nessa expressão do receptor CB1 em pacientes que desenvolveram discinesia induzida pela levodopa; também foi encontrado um aumento nas concentrações de AEA no fluido cerebrospinal de pacientes com DP não tratados (52).

Há relatos que ocorre um aumento nos níveis de anandamida no estriado quando os neurônios são expostos a 6-OHDA no modelo *in vivo* de doença de Parkinson, e esse aumento é acompanhado da redução da atividade de ambos FAAH e transportador de membrana de anandamida. Também foi observado a elevação de 2-AG no globo pálido quando houve a depleção de dopamina no estriado e isso resultou no bloqueio dos movimentos, sendo revertido pela estimulação dos receptores D2 (13,53).

Por outro lado, a estimulação de receptores CB1 pré-sinápticos pode reduzir a entrada de glutamato na substância negra pelo núcleo subtalâmico com a consequente ativação reduzida dos neurônios dopaminérgicos no estriado resultando na facilitação do movimento (9,13) (Figura 1).

Figura 1: Esquema simplificado da organização funcional dos núcleos da base.

Os núcleos da base consistem em quatro núcleos: estriado dorsal (estriatum), globo pálido (interno (GPi) e externo (GPe)), núcleo subtalâmico (Stn) e substância negra (*pars reticulata* (Snr) e *pars compacta* (Snc)). O estriado é o primeiro núcleo de entrada e contém neurônios GABAérgicos que recebem inervação glutamatérgica (setas vermelhas) do córtex cerebral e projeções dopaminérgicas da Snc (seta azul). Fazem parte da via direta os neurônios do estriado que enviam projeções GABAérgicas (setas pretas pontilhadas) para a Snc e os neurônios GPi que são os principais núcleos de saída, no qual o tálamo (Tha) está sob o controle inibitório. Consiste na via indireta neurônios do estriado que enviam suas projeções GABAérgicas primeiro para o GPe, o qual, por sua vez, inibe o Stn com eferências GABAérgicas. O Stn, com suas projeções glutamatérgicas, ativa os núcleos de saída. O receptor CB1 (representados pelos quadrados amarelos) são expressos nas diferentes regiões dos núcleos da base, modulando assim a via direta (receptor D1) e a via indireta (receptor D2). Fonte: van der Stelt e Di Marzo, 2003.

De acordo com as evidências anteriores, a manipulação do sistema canabinoide nos núcleos da base pode interferir em ambas as direções positivas e negativas do ponto de vista motor e comportamental. Com isso pode-se levar em consideração que os canabinoides podem regular a liberação de glutamato no estriado e restabelecer a plasticidade sináptica afetada pela deservação dopaminérgica (54,55).

Podemos ainda mencionar que o tratamento com canabinoides reduz a morte celular em culturas de células quando essas são tratadas com 6-OHDA neurotoxina análoga ao neurotransmissor dopamina utilizada para estudar em modelos *in vivo* e *in vitro* doença de Parkinson (56) através da inibição da citotoxicidade do inibidor de proteasoma sintase e inibição da ativação da caspase 3 (57). Tem-se mostrado que a AEA foi capaz de inibir a apoptose promovida pela 6OHDA (58).

Podemos considerar que a partir das evidências que propõem o envolvimento dos canabinoides na modulação tanto de aspectos funcionais do sistema nervoso central, quanto de mecanismos de controle de proteção celular, compreender o papel protetor e modulatório dos canabinoides durante o estresse oxidativo e inflamação, eventos que estão por trás de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a Doença de Parkinson, adquire importância fundamental.

Este trabalho teve como intuito, adicionalmente, responder perguntas levantadas no nosso grupo (55). Para tanto, foram estudados em linhagem celular diferenciada (modelo dopaminérgico) com o intuito de identificar os efeitos tóxicos ou protetores exercidos pelos canabinoides nesses modelos de inflamação e estresse oxidativo.

2 JUSTIFICATIVA

Há muito se usa a 6OHDA, análogo da dopamina, como modelo de estudo da doença de Parkinson, no entanto, seus mecanismos não estão totalmente elucidados (59). Sabe-se que 6OHDA pode ser formada *in vivo* e que níveis elevados foram encontrados nos fluidos de pacientes com doença de Parkinson (60). A oxidação não enzimática da 6OHDA produz H_2O_2 , superóxido, radical hidroxil e para-quinona em pH fisiológico (56). Além disso, a 6OHDA em modelo *in vivo* aumenta os níveis de mediadores inflamatórios que são secretados pela micróglia, neurônios e astrócitos (61).

Considerando evidências propostas na literatura sobre o possível papel protetor dos canabinoides, nossa motivação foi investigar se o sistema canabinoide seria mais eficiente em situações de morte celular causada por eventos de estresse oxidativo e inflamação simultâneos, ou se o sistema canabinoide seria mais eficaz em prevenir a morte celular por estresse oxidativo, promovido pelo H_2O_2 , ou mais eficaz em prevenir a morte celular por processos inflamatórios promovido pelo LPS.

A escolha dessa análise em modelo *in vitro*, foi devido à “simplicidade” que o sistema oferece por ser uma cultura de um único tipo celular, pois o interesse era avaliar ações de agonista e antagonista/agonista inverso em neurônios numa particular condição.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação do sistema canabinoide em processos oxidativo e inflamatório relacionado à neurodegeneração *in vitro*.

3.1 Objetivos Específicos

- Investigar o papel neuroprotetor do agonista do receptor CB1 hidrato de aradonoil-2'-cloroetilamida (ACEA) em células dopaminérgicas diferenciadas desafiadas com 6OHDA, H₂O₂ e LPS.
- Avaliar a neuroproteção através de parâmetros de viabilidade celular e produção de espécies reativas de oxigênio (do inglês - *reactive oxygen species* – ROS).
- Investigar a ativação do receptor CB1 através da sua via de sinalização.

4 METODOLOGIA

4.1 Cultivo celular e tratamentos

Foi utilizada neste estudo a linhagem celular Neuro-2a (ATCC; Richmond, VA, USA) que é um clone derivado de um neuroblastoma espontâneo de camundongo (62). Essa linhagem tem sido extensivamente utilizada como modelo neuronal *in vitro* em estudos com diversos agentes indutores de toxicidade e morte celular (63,64). Além disso, essas células expressam o receptor canabinoide CB1 (65).

O protocolo de cultivo, tratamento das células e análises realizadas estão esquematizados na Figura 2.

As células ($0,7 \times 10^6$) foram cultivadas em meio Dulbecco MEM (DMEM; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 10 U.I./ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB), 3,9 mM de glutamina e 25 mM de glicose, em uma incubadora com atmosfera umidificada a 37 °C de 5% de CO₂. Após dois dias de cultivo as células foram diferenciadas em neurônios dopaminérgicos de acordo com *Tremblay* e colaboradores (2010). Para isso, o meio foi substituído por meio DMEM contendo 0,5% de SFB acrescido de 1 mM de dibutilil-cAMP (dbcAMP; Sigma, St Louis, MO, USA). Antes de iniciar os tratamentos e os experimentos de curva concentração-resposta, as células tratadas com dbcAMP foram analisadas quanto aos níveis da enzima tirosina hidroxilase (TH) pelo método de *Western blot* (descrito abaixo). A TH é responsável pela conversão do aminoácido L-tirosina a L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA) e é amplamente utilizada como forma indireta de se avaliar os níveis de produção de dopamina, e consequentemente, como marcador de diferenciação.

Após a diferenciação da linhagem em células dopaminérgicas foram realizados experimentos de curva concentração-resposta com agentes indutores de morte neuronal, 6-hidroxidopamina (6-OHDA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e lipopolissacarídeo (LPS), e com os compostos canabinoides ACEA (agonista do receptor CB1) e AM251 (antagonista/agonista inverso). Após 24 horas as células foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelos métodos colorimétricos de MTT descrito abaixo.

Figura 2 – Desenho experimental.

As exposições com os agentes indutores de morte neuronal e com os compostos canabinoides se basearam em dados anteriores do nosso laboratório e da literatura (67–69), e as concentrações utilizadas estão detalhadas na Tabela 1. Especificamente no que diz respeito aos compostos canabinoides esses experimentos iniciais de curvas concentração-resposta foram fundamentais, uma vez que os dados da literatura são ainda controversos e alguns têm mostrado efeitos apoptóticos, como por exemplo, o THC em cultura de córtex de ratos (70) (Downer et al., 2003). Assim, antes de conjugar o tratamento dos agentes indutores de morte com os compostos canabinoides, avaliamos os efeitos *per se* desses compostos. Neste caso, dados anteriores do nosso laboratório (dados não publicados) serviram de ponto de partida para a determinação das concentrações que pudessem interferir com o processo de morte neuronal.

Tabela 1: Concentrações utilizadas nos experimentos de curvas concentração-resposta.

Agente	Concentração					
LPS (µg/mL)	10	20	30	40	50	
6OHDA (µM)	15	20	30	40	50	75
H ₂ O ₂ (µM)	40	50	60	70		
ACEA (µM)	0,5	1	2	10		
AM251 (µM)	0,5	1	2	10		

4.2 Ensaios de viabilidade celular (MTT)

O ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico de redução de sais de tetrazólio (MTT) baseia-se na habilidade de células viáveis, de converter o sal tetrazólio a formazano colorido. Após 24 horas dos tratamentos, as células foram incubadas com MTT (12 mM) em solução salina tamponada (em mM: NaCl 136,8, KCl 2,7, KH_2PO_4 0,9, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6,4) a 37 °C, por 2 horas e 30 minutos. Após esse período de incubação, foi adicionada uma solução solubilizadora (DMSO), e os valores de absorbância determinados no comprimento de onda de 550 nm em um espectrofotômetro para placas. Em cada experimento, o ensaio era feito com triplicatas de cada amostra.

4.3 Western Blot

As células foram coletadas em PBS a 4 °C e centrifugadas a 12.000rpm por 10 minutos a 4 °C, o pellet ressuspendido em tampão de lise (NP-40 à 10%, glicerol, NaCl 5M, Tris 1M) e as amostras sonicadas e centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A concentração proteica do sobrenadante foi determinada pelo método de *Bradford* (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Amostras dos sobrenadantes contendo 30 µg de proteína total foram tratadas com tampão Laemmli contendo DTT 100 mM e submetidas à eletroforese em géis de acrilamida 10% contendo dodecil sulfato de sódio. Após a separação eletroforética, as proteínas foram eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) e bloqueadas em solução de TBS (100 mM tris-base; 0,9% NaCl e água) contendo 0,1% de Tween 20 e 5% de leite desnatado ou BSA (bovine sérum albumine) durante pelo menos duas horas sob agitação leve. Após esse período, as membranas foram lavadas e incubadas a 4 °C, sob leve agitação, durante toda a noite com os seguintes anticorpos: para verificação de fenótipo neuroquímico utilizamos anticorpo monoclonal feito em camundongo anti-tirosina hidroxilase (TH; Chemicon Darmstadt, Alemanha; 1:1,000); para análise da expressão do receptor CB1, utilizamos anti-CB1 (1:500; Cayman; Michigan, USA), para análise de via de morte celular utilizamos anticorpo monoclonal feito em coelho anti-caspase 3

(1:1000; Cell signaling, Beverly, MA, USA), para análise da via de sinalização foram utilizados anticorpos monoclonais feito em coelho anti-fosfo-ERK1 /2 (1:2000; Cell signaling), anti-ERK1 /2 (1:2000; Cell signaling), anti-fosfo-AKT (1:1000; Cell signaling), anti-AKT (1:1000; Cell signaling), anti-fosfo-PI3K (1:1000; Cell signaling). As membranas foram então novamente lavadas e incubadas com os anticorpos secundários por 2 horas. A ligação específica dos anticorpos foi revelada utilizando o kit quimioluminescente ECL (Amersham). Finalmente, as bandas foram analisadas quanto à densidade óptica da imunorreatividade usando-se o programa Image J 1.46r (Wayne Rasband – National Institute of Health/USA). Dessa maneira, foi definida a Unidade Arbitrária (U.A) como densidade de pixels da banda selecionada corrigido pela densidade de pixel da β actina como marcador endógeno. No caso particular das análises de proteínas dos tratamentos com LPS e H₂O₂, a densidade de bandas das proteínas analisadas foi corrigida pelo *ponceau*.

4.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo

Dihidroethidium (DHE), devido a sua capacidade de permear livremente as membranas celulares é amplamente utilizado para monitorar a produção de superóxido. Há muito tempo se postulou que a DHE mediante reação com superóxido forma um produto vermelho fluorescente (etídio) que se intercala com o DNA. A sonda DHE é, talvez, o corante mais específico e menos problemático; como se detecta essencialmente radicais superóxido, é bem retido por células, e pode mesmo tolerar fixação suave (71,72). Para avaliação de ROS, as células foram tratadas previamente, e após 24 horas de acordo com o protocolo inicial, o sobrenadante foi retirado, e as células foram lavadas com PBS 2 vezes, e logo após foi colocado a sonda DHE (50 μ M) em meio de cultivo sem soro e incubadas no escuro por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante retirado e os poços foram lavados novamente com PBS, e então tripsinizados com 100 μ L de tripsina e neutralizado com 200 μ L de meio de cultivo com soro. As células foram então retiradas das placas e estocadas em tubos de 1,5 mL, e centrifugados a 2000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em solução livre de Ca⁺², para logo serem transferidas através de filtros de 22 μ m a

placas de leitura no citrometro Guava easyCyte™ Ht Sampling no comprimento de onda 670 nm.

4.5 Análise Estatística

Os valores foram expressos em médias $\pm$ SEM de experimentos individuais, exceto quando indicado. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de comparação de múltiplos de *Dunnet* para a análise das curva concentração-resposta, o pós-teste de *Tukey* para comparações múltiplas, considerando como o nível de significância de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Diferenciação das células e expressão de TH e receptor CB1

De acordo com os resultados, a partir do terceiro dia de cultivo em meio acrescido de dbcAMP, as células apresentaram um aumento significativo de mais de 2 vezes ($p < 0,05$) nos níveis da proteína tirosina hidroxilase (TH; figura 3), indicando um fenótipo dopaminérgico, conforme foi descrito por Tremblay e colaboradores (2010).

Figura 3 - Níveis da proteína TH na linhagem Neuro2a após 2 e 3 dias do tratamento com dbcAMP.

Em A, imagem digital ilustrando as bandas imunorreativas para TH e b-actina (controle endógeno) de células não tratadas (CTL) e após 2 dias (2d) e 3 dias (3d) da incubação com dbcAMP. Em B, quantificação da densidade óptica das bandas de *western blot* ($n=3$) de tirosina hidroxilase. Se mostram que há aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de TH após 3 dias de exposição ao dbcAMP comparado ao controle.

Fizemos uma análise de expressão de proteína por *western blot* para verificar a presença do receptor CB1 em nosso modelo de células diferenciadas (Figura 4), e constatamos a presença do receptor em todo processo de diferenciação. Não obtivemos diferença estatística devido à variabilidade e ao número pequeno de amostras, pois era só um controle interno para certificação.

Figura 4 – Níveis de proteína do receptor CB1 na linhagem Neuro2a após 2 e 3 dias do tratamento com dbcAMP.

Quantificação da densidade óptica das bandas de *western blot* (n=3) do receptor CB1. Considerando a dispersão dos dados, não houve diferença significativa, no entanto, se observa a tendência do aumento da expressão do receptor após 3 dias de diferenciação.

5.2 Padronização da concentração do agonista ACEA e antagonista AM251

Para a padronização das concentrações que foram utilizadas nos demais experimentos, foi realizado uma curva concentração-resposta para o agonista do receptor CB1, ACEA, e outra para o antagonista do mesmo receptor, AM251. Podemos observar que a menor concentração de ACEA (0,5 μ M) diminuiu para 44% (p<0,01) as células viáveis e as concentrações de 0,5 μ M e 10 μ M de AM251 foi capaz de reduzir a quantidade de células viáveis para aproximadamente 33% e 44% (p<0,01) respectivamente (Figura 5). Devido a esse fato, escolhemos uma concentração que não causasse dano celular, portanto, as quais foram a concentração de 1 μ M e 2 μ M do agonista ACEA e 1 μ M do antagonista AM251.

Figura 5 - Curva concentração-resposta da Neuro 2a diferenciada exposta por 24 horas ao agonista do receptor CB1, ACEA, e ao seu antagonista AM251 através do ensaio de viabilidade (MTT).

DMSO – controle. Análise estatística ANOVA, pós-teste de *Dunnet*; ** $p < 0,01$.

5.3 Modelo de morte celular por exposição à 6OHDA

Com a intenção de avaliar como os canabinoides se comportam num modelo *in vitro* de células dopaminérgicas, resolvemos submeter essas células às situações que simulam a gênese de algumas doenças. Decidimos portanto, utilizar a neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6OHDA), que é muito utilizada em modelos experimentais da doença de Parkinson, pois é específica para neurônios dopaminérgicos, além de ser capaz de gerar um microambiente de inflamação e estresse oxidativo.

A partir dos dados existentes em nosso laboratório (Kirsten, 2013), escolhemos a concentração de 50 µM, pois essa concentração de 6OHDA garante 42% de células viáveis (Kirsten, 2013) (Figura 6).

Figura 6 - Curva concentração-resposta de 6OHDA em linhagem de células Neuro-2a diferenciada com dbcAMP. Viabilidade celular analisada por MTT.

(CONT) controle. Análise estatística por ANOVA com pós-teste de *Tukey*, * $p > 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Seguimos então com a realização do co-tratamento com o agonista do receptor CB1, ACEA, nas concentrações acima mencionadas. Na concentração de 1 µM de ACEA não houve prevenção de morte celular (Figura 7); no entanto, com a concentração de 2 µM de ACEA foi possível prevenir 23% ($p < 0,05$; $n = 13$) de morte celular (Figura 7).

Figura 7 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA (50 µM) e tratadas com agonista do receptor CB1 (ACEA) por 24 horas.

(*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$. Análise ANOVA, pós-teste de *Tukey*.

Para avaliar se essa resposta foi via ativação do receptor CB1, resolvemos testar primeiramente se o antagonista AM251 exerceria algum efeito sobre a viabilidade celular na presença da toxina 6OHDA, pois há relatos na literatura (73) que esse antagonista pode agir como agonista inverso também. Conforme na figura 8, o AM251 não exerceu nenhuma resposta na presença de 6OHDA por 24 horas, o que sugere que ele poderia estar agindo como antagonista clássico.

Figura 8 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA (50 μ M) e tratadas com antagonista do receptor CB1 (AM251) por 24 horas.

(***) $p < 0,001$. Análise ANOVA (uma via), pós-teste de *Tukey*.

Esse fato esclarecido, foi dada a sequência do co-tratamento com agonista e antagonista. Para a nossa surpresa, o co-tratamento com o antagonista não resultou no bloqueio da ação do agonista ACEA, como era esperado. O que podemos constatar é que houve uma prevenção de 90% ($p < 0,05$; $n=12$; $n=12$) da morte celular em ambos tratamentos (1 μ M e 2 μ M de ACEA e mais 1 μ M de AM251) (Figura 9).

Figura 9 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA (50 μ M) e tratadas com agonista do receptor CB1, ACEA, e antagonista, AM251, por 24 horas.

(*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$. Análise ANOVA, pós-teste de *Tukey*.

Decidimos testar esse tratamento através de outra técnica e verificar se o resultado se reproduzia. Resolvemos investigar a produção de ROS desse modelo por DHE, já que é sabido que os canabinoides exercem uma ação antioxidante (40,74,75). Nesse caso, ficamos interessados em descobrir se o AM251 conjugado com o ACEA estaria agindo em conjunto para reduzir a produção de ROS nesse modelo.

Quando as células diferenciadas foram expostas à 6OHDA (50 μ M), houve um aumento na produção de ROS em 50% ($p < 0,01$; $n=6$), quando comparada com os grupos controles (DMSO). O tratamento com o agonista ACEA (1 μ M) diminuiu 18% (ns) a produção de ROS, e constatou-se que o AM251 na mesma proporção 1:1 com o ACEA agiu como um antagonista clássico (figura 10), bloqueando a ação do agonista (ns), elevando a produção de ROS para o mesmo nível do grupo tratado apenas com a 6OHDA.

Figura 10 - Ensaio produção de espécies reativas (ROS) por citometria de fluxo (50 μ M de DHE) em cultura de células diferenciadas expostas à 6OHDA (50 μ M), agonista do receptor CB1 (1 μ M de ACEA) e antagonista (1 μ M de AM251) depois de 24 horas.

(**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. Análise ANOVA, pós-teste de *Tukey*.

Logo em seguida testamos a concentração de 2 μ M de ACEA, e observamos que o agonista mesmo com a concentração maior foi capaz apenas de reduzir a produção de ROS em 20% (ns), no entanto, o co-tratamento com agonista e antagonista na proporção 2:1 reduziu a produção de ROS em 36% ($p < 0,05$; $n=6$) (Figura 11).

Figura 11 - Ensaio produção de espécies reativas (ROS) por citometria de fluxo (50 μ M de DHE) em cultura de células diferenciadas expostas à 6OHDA (50 μ M), agonista do receptor CB1 (2 μ M de ACEA) e antagonista (1 μ M de AM251) depois de 24 horas.

(*) $P < 0,05$; (**) $p < 0,01$. Anova, pós-teste de *Tukey*

Esses resultados nos fez questionar a via de sinalização que o ACEA estaria ativando. Uma vez que o ACEA pode se ligar a outro receptor, o TRPV1, resolvemos testar o antagonista do TRPV1, a capsazepina (CPZ). Devido a que sua K_i ($K_i = 3,2 \mu\text{M}$) é muito menor que a K_i do ACEA ($K_i = 1,4 \text{nM}$), resolvemos testar 2 concentrações maiores de CPZ que não causassem dano celular (5 μM e 10 μM) baseados na curva de concentração-resposta já realizada em nosso laboratório (Kirsten, 2013) (Figura 12).

Figura 12 - Curva concentração-resposta de capsazepina em linhagem de células Neuro 2a diferenciada com dbcAMP. Viabilidade celular analisada por MTT.

(DMSO) grupo controle. Análise estatística por ANOVA, com pós- teste de Tukey. (Kirsten, 2013).

Como é possível notar, a CPZ foi capaz de bloquear a ação do ACEA ($n=6$; $p<0,01$), mantendo a viabilidade celular no mesmo nível do grupo tratado apenas com a 6OHDA (Figura 13), sugerindo ação via TRPV1.

Figura 13 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA (50 μ M) e tratadas com agonista ACEA e antagonista do receptor TRPV1 (CPZ) por 24 horas.

(*) $P<0,05$; (**) $p<0,01$; (***) $p<0,001$. Anova, pós-teste de Tukey.

Após identificar que nesse modelo o co-tratamento com agonista do receptor CB1, ACEA, e o antagonista AM251 exercem um efeito protetor sobre as células

diferenciadas evidenciado em dois tipos de técnicas, produção de ROS e viabilidade celular, resolvemos investigar se realmente o receptor CB1 estaria acionando a via clássica de sinalização das proteínas MAPK/ERK. Apesar do tratamento ter sido de 24 horas, nosso interesse era identificar o início da ativação da via. Então, escolhemos três tempos iniciais para observar: 10, 15 e 20 minutos do modelo de morte com a 6OHDA.

Podemos perceber que houve um aumento de 3 vezes ($p < 0,05$) da fosforilação da proteína ERK 1/2 (Figura 14) com 15 e 20 minutos de tratamento com $1\mu\text{M}$ de ACEA comparada com 10 do mesmo tratamento. Também podemos observar um aumento de 6 vezes da fosforilação no co-tratamento de $2\mu\text{M}$ de ACEA e $1\mu\text{M}$ AM251 comparado com os 10 minutos iniciais do mesmo tratamento. Esses resultados se apresentam sem mudanças importantes no nível de expressão da proteína ERK 1/2 total.

Figura 14 - Curva tempo-resposta da fosforilação da ERK 1 /2 estimulada pelo tratamento com ACEA ($1\mu\text{M}$ e $2\mu\text{M}$) e AM251 ($1\mu\text{M}$) em células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA.

Western blot; $n = 4$; Anova, comparação intra-grupo, $p < 0,05$. Barra cinza claro representa 10min de tratamento, a cinza escuro 15min e preta 20min. Nota: no tratamento ACEA+AM251 (2:1) as bandas foram resolvidas em géis diferentes, no entanto correspondem ao mesmo experimento.

Nos propomos também em verificar se aumento da sobrevivência observada nos experimentos anteriores se deu através da inibição da ativação da cascata de

sinalização de morte celular programada, apoptose, através dos níveis de expressão da proteína caspase 3.

Podemos observar que houve um aumento de 5,6 vezes ($p<0,05$; $n=4$) nos níveis de expressão da caspase 3 aos 20 minutos nas células expostas à 6OHDA comparado com o controle (Figura 15), e com o co-tratamento com 1 μM de ACEA diminuiu essa ativação para 2,8 vezes ($p<0,05$) e o co-tratamento com 2 μM de ACEA e 1 μM de AM251 reduziu pela metade comparada com o grupo 6OHDA nos mesmos 20 minutos.

Figura 15 - Curva tempo-resposta dos níveis de expressão da ativação da caspase 3 inibida pelo tratamento com 1 μM e 2 μM ACEA e 1 μM de AM251 em células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA.

Western blot, $n=4$; comparação intra-tempo Anova, $p<0,05$. Considerando que os géis utilizados não possuem quantidade suficiente de poços para incluir todas as amostras de cada tratamento, os western blots que se mostram na parte inferior do gráfico foram construídos utilizando bandas de filmes diferentes. Barra branca representa 10min de tratamento, a cinza 15min e preta 20min. No caso do controle, se mostra a banda de 20min separada das de 10 e 15min pois corresponde a um filme diferente.

Ao tentar analisar outra via de sinalização que o receptor CB1 pode ativar, tentamos a PI3K/AKT.

Observamos uma pequena diminuição de quase 3 vezes (Figura 16; $p=0,058$) nos níveis de expressão da PI3K no tratamento com 6OHDA+ACEA+AM251 (1:1) quando comparado com os 10 minutos desse mesmo tratamento. E aos 15 minutos, esse mesmo tratamento diminuiu 1/3 ($p<0,01$) os níveis de expressão quando comparado com 15 minutos do grupo tratado com 6OHDA.

Figura 16 - Curva tempo-resposta da ativação da PI3K estimulação pelo tratamento com 1 μ M e 2 μ M ACEA e 1 μ M de AM251 em células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA.

Western blot, $n=4$; comparação intra-tempo, e comparação intra-grupo. Anova, $p<0,05$. Barra branca representa 10min de tratamento, a cinza 15min e preta 20min. No tratamento com 6OHDA+ACEA+AM251 (2:1) se mostra a banda de 10min separada das duas seguintes pois corresponde à banda de um filme diferente, submetido ao mesmo tratamento.

No entanto, ao observarmos a fosforilação da AKT (Figura 17) encontramos um pequeno aumento ($p<0,01$) nos níveis de fosforilação da AKT (razão pAKT/AKT T; figura 17) do grupo exposto à 6OHDA quando comparado com o controle aos 20 minutos; além disso, encontramos uma diminuição na fosforilação ($p<0,05$) no co-tratamento com 2 μ M de ACEA e 1 μ M de AM251.

Figura 17 - Análise da fosforilação da AKT aos 20 minutos estimulada pelo tratamento com ACEA (1 μ M e 2 μ M) e AM251 (1 μ M) em células Neuro 2a diferenciadas expostas à 6OHDA.

Western blot, n=4, test *t* Student, $p < 0,05$

5.4 Modelo de morte celular por exposição ao Lipopolissacarideo (LPS)

Com a intenção de separar os tipos de injúria que a neurotoxina 6OHDA faz na célula (inflamação e estresse oxidativo), decidimos separar os eventos utilizando o LPS como gerador de inflamação.

A concentração de 30 μ g/ml de LPS foi escolhida a partir da curva concentração-resposta em células diferenciadas (Figura 18), essa concentração permitiu trabalhar com 62% de células viáveis ($n=7$; $p < 0,01$), as concentrações maiores ocasionaram a morte de mais de 50% das células o que não era interessante para a nossa proposta de modelo experimental *in vitro*.

Figura 18 - Curva concentração-resposta das células Neuro 2a expostas ao LPS durante 24 horas através do ensaio de viabilidade (MTT).

(**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. Anova, pós-teste de *Dunnet*

Continuando com a análise de viabilidade celular, a exposição das células diferenciadas por 24 horas ao LPS apresentou 34% de morte celular ($p < 0,001$; $n=18$) (Figura 19); no entanto, quando co-tratadas com 1 μM de ACEA, o agonista do receptor CB1 foi capaz de prevenir em 10% (ns) essa morte celular causada pelo LPS; então resolvemos testar a concentração de 2 μM de ACEA, o resultado foi a prevenção da morte celular em 88% ($p < 0,05$; $n=13$).

Figura 19 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao LPS (30µg/ml) e tratadas com agonista do receptor CB1 (ACEA) por 24 horas.

(*) $P < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. Anova, pós-teste de Tukey

Para verificar se essa resposta foi via receptor CB1, utilizamos o antagonista AM251 a 1 µM de concentração. Primeiro testamos se o AM251 exerceria algum efeito quando tratado com o LPS (n=6); não obtivemos diferença significativa nesse tratamento, o que nos levou a concluir que o AM251 nesse modelo não estaria agindo como um agonista inverso (figura 20).

Figura 20 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao LPS (30µg/ml) e tratadas com antagonista do receptor CB1 (AM251) por 24 horas.

(***) $p < 0,001$. Anova, pós-teste de Tukey

Logo em seguida, realizamos o co-tratamento com as duas diferentes concentrações de ACEA (1 μ M e 2 μ M) e AM251 (1 μ M). De maneira semelhante aos resultados do modelo de morte celular causado pela 6OHDA (Figura 11), nos co-tratamentos do modelo de LPS ambas concentrações do agonista e antagonista foram capazes de prevenir a morte celular deixando 88% e 100% de células viáveis ($p < 0,001$; $n = 8$; $p < 0,001$; $n = 13$) respectivamente, (Figura 21), sugerindo uma ação moduladora do AM251, e não de antagonista clássico.

Figura 21 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao LPS (30 μ g/ml) e tratadas com agonista do receptor CB1, ACEA, e antagonista, AM251 por 24 horas.

(*) $P < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. Anova, pós-teste de Tukey

Para seguir os mesmos passos feitos no modelo de 6OHDA, resolvemos investigar se o ACEA e o AM251 estariam agindo como antioxidante nesse modelo de inflamação *in vitro*, tendo em vista que um foco inflamatório também pode elevar a produção de ROS. O ensaio de detecção de produção de ROS confirmou os resultados do ensaio de viabilidade (Figura 22). Nesse ensaio podemos verificar que o co-tratamento com 2 μ M de ACEA foi capaz de reduzir a produção de ROS após 24 horas em 25% ($p < 0,05$; $n = 6$); e o co-tratamento com ACEA (2 μ M) e AM251 (1 μ M) seguiu o mesmo padrão do ensaio de viabilidade, reduzindo a produção de ROS em 33% ($p > 0,05$; $n = 6$), consequentemente prevenindo a morte celular.

Figura 22 - Ensaio produção de espécies reativas (ROS) por citometria de fluxo (50 μ M de dihidroetídio – DHE) em cultura de células Neuro 2a diferenciadas expostas ao LPS (30 μ g/ml), agonista do receptor CB1 (2 μ M de ACEA) e antagonista (1 μ M de AM251) depois de 24 horas.

(*) $P < 0,05$; (**) $p < 0,01$. Anova, pós-teste de *Tukey*,

Esses resultados nos levaram a fazer o teste da CPZ com as mesmas concentrações utilizadas anteriormente. Ao fazer o co-tratamento com 2 μ M de ACEA e 5 μ M e 10 μ M de CPZ observamos que não só o efeito do ACEA foi anulado, como a viabilidade celular diminuiu drasticamente, restando 20% e 32% ($p < 0,001$; $n=6$; $p < 0,001$; $n=8$) de células viáveis respectivamente (Figura 23). Portanto, esses resultados apontam para uma ação do ACEA via TRPV1, no entanto, o seu bloqueio causou mais dano celular que o tratamento isolado com LPS.

Figura 23 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao LPS (30µg/ml) e tratadas com agonista do receptor CB1 (ACEA, 2 µM) e antagonista do canal TRPV1, CPZ (5 µM e 10 µM) por 24 horas.

(*) $P < 0,05$; (***) $p < 0,001$. Anova, pós-teste de Tukey

Supomos que a via a ser ativada por esse modelo deveria ser a da MAPK/ERK, no entanto, não obtivemos essa resposta (Figura 24), talvez 20 minutos não foi tempo suficiente para fosforilar a via da ERK de forma significativa. Nosso tratamento nem com LPS, nem LPS mais canabinoides apresentaram diferença significativa comparada com o controle.

Figura 24 - Análise *Western blot* da fosforilação da ERK 1/2 aos 20 minutos das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao LPS e co-tratadas com 2 µM de ACEA e 1 µM de AM251.

Anova, pós-teste de Tukey.

Partindo do pressuposto que 20 minutos não foi suficiente para visualizar através do nível de ativação da proteína ERK nesse modelo, resolvemos investigar com 24 horas de tratamento a expressão da proteína caspase 3, sinalizadora de apoptose (Figura 25), onde apresentou uma diferença significativa o tratamento com 2 μ M de ACEA com 67% ($p<0,05$; $n=6$) de redução na expressão da caspase 3, e o tratamento com 2 μ M de ACEA e 1 μ M de AM251 também se mostrou eficaz reduzindo a ativação da caspase 3 em 44% ($p<0,05$; $n=6$) comparado com o LPS que teve um aumento na expressão da caspase 3 em 35% ($p<0,05$; $n=6$) comparado com o DMSO.

Figura 25 Análise *western blot* da expressão da caspase 3 inibida pelo tratamento com 1 μ M e 2 μ M de ACEA e 1 μ M de AM251 em células Neuro 2a diferenciadas expostas ao LPS por 24 horas.

(*) $P<0,05$. Anova, pós-teste de Tukey

5.5 Modelo de morte celular por exposição ao H_2O_2

Para a escolha da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), optamos por fazer uma curva de concentração-resposta, já que na literatura não encontramos nenhuma padronização utilizando nosso modelo experimental com H_2O_2 .

Sendo assim, começamos com as concentrações de 40 μ M à 70 μ M. Obtivemos uma morte celular de 34% ($p<0,001$; $n=15$) na concentração de 40 μ M

(Figura 26), e resolvemos seguir com essa concentração, pois estava dentro dos nossos interesses para o modelo proposto.

Figura 26 - Curva concentração-resposta das células Neuro 2a diferenciadas exposta ao H₂O₂ por 24 horas através do ensaio de viabilidade (MTT).

(***) $p < 0,01$. Anova, pós-teste de *Dunnet*

O próximo passo foi realizar o co-tratamento com o agonista ACEA por 24 horas. Essa exposição gerou 30% ($p < 0,001$; $n = 15$; figura 27) de morte celular, como esperado e o co-tratamento com 1 μM de ACEA resultou em 8% (ns) de prevenção de morte celular (figura 26), porém o co-tratamento com 2 μM de ACEA melhorou a sobrevivência em 22% ($p < 0,01$; $n = 11$).

Figura 27 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao H₂O₂ (40 μM) e tratadas com agonista do receptor CB1 (ACEA)

(**) $P < 0,01$; (***) $p < 0,001$. Anova (uma via), pós-teste de *Tukey*

Realizamos o mesmo procedimento citado anteriormente no modelo de LPS, e verificamos o comportamento do antagonista AM251 em um modelo de estresse oxidativo. O AM251 na presença de H_2O_2 (n=6) sem a presença do ACEA não produziu nenhuma resposta (Figura 28) se comportando como um antagonista clássico.

Figura 28 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao H_2O_2 (40 μM) e tratadas com antagonista do receptor CB1 (AM251)

(***) $p < 0,001$. Anova, pós-teste de Tukey.

Foi mantida a concentração de 1 μM de AM251 para a realização do co-tratamento com as duas concentrações de ACEA (1 μM e 2 μM) por 24 horas. Obtivemos duas formas distintas de resposta ao AM251 (Figura 29). Quando tratadas numa proporção 1:1 (ACEA: AM251) o resultado indica uma ação de antagonismo clássico, pois os valores retornaram para o mesmo valor do grupo tratado apenas com H_2O_2 , sugerindo um bloqueio do receptor CB1; mas, devemos observar que 1 μM de ACEA não foi capaz de prevenir significativamente a morte celular. No entanto, os 2 μM de ACEA conjugado com AM251 (na proporção 2:1) apresentou uma prevenção de 100% de morte celular ($p < 0,001$; n=11), sugerindo uma ação moduladora do AM251, e não a de um antagonista clássico.

Figura 29 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao H_2O_2 (40 μM) tratadas com agonista do receptor CB1, ACEA, e antagonista, AM251, por 24 horas.

(*) $P < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. Anova, pós-teste de Tukey.

Ainda não satisfeitos, fomos investigar se o resultado da melhora da viabilidade celular poderia ser uma consequência da redução de produção de ROS, tendo em vista que há relatos na literatura que canabinoides agem como antioxidantes.

No ensaio de produção de ROS, obtivemos um aumento de 3 vezes ($p < 0,01$; $n=6$) na produção de ROS com o tratamento 40 μM de H_2O_2 por 24 horas (Figura 30). O co-tratamento com 1 μM de ACEA foi capaz de reduzir para os níveis do controle a produção de ROS ($p < 0,01$; $n=6$), e para nos certificar que o ACEA estava realmente agindo via receptor CB1 nessas concentrações, realizamos o co-tratamento com 1 μM de AM251, e observamos o bloqueio da ação do ACEA ($p < 0,05$; $n=6$).

Figura 30 - Ensaio produção de espécies reativas (ROS) por citometria de fluxo (50 μ M de DHE) em cultura de células diferenciadas expostas ao H₂O₂ (40 μ M), agonista do receptor CB1 (2 μ M de ACEA) e antagonista (1 μ M de AM251) depois de 24 horas.

(*) $P < 0,05$; (**) $p < 0,01$. Anova, pós-teste de Tukey.

Para o nosso controle resolvemos testar se o bloqueio do TRPV1 por capsazepina (CPZ) também anularia o efeito do ACEA nesse modelo.

Utilizamos então as mesmas concentrações de CPZ nesse modelo e obtivemos além de uma reversão do efeito do ACEA, como uma diminuição da viabilidade celular para 26% e 29% ($p < 0,001$; $n=6$; $p < 0,001$; $n=8$), respectivamente (Figura 31). Podemos então pensar que o TRPV1 está envolvido nos mecanismos de prevenção da morte celular por toxicidade de ROS e inflamação, visto que seu bloqueio causa mais morte celular que o próprio agente indutor de morte celular, de maneira igual ao modelo de inflamação *in vitro* com LPS.

Figura 31 - Viabilidade celular (MTT) das células Neuro 2a diferenciadas expostas ao H₂O₂ (40 µM) e tratadas com antagonista do receptor TRPV1 (CPZ).

(**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. Anova, pós-teste de Tukey.

Com base nesses fatos, fomos investigar a cascata de sinalização ativada pelo peróxido de hidrogênio e tratamento com canabinoides. Constatamos o seguinte fato: a fosforilação da ERK1/2 aumentou por volta de 2 vezes ($p < 0,05$; $n = 3$; figura 32) e o tratamento com 1 µM de ACEA reduziu essa fosforilação embora não significativa, talvez devido ao n ser pequeno; no entanto, o co-tratamento com ACEA e AM251(1:1) foi capaz de trazer os níveis de fosforilação para o mesmo do controle ($p < 0,05$; test *t Student*; ANOVA, $p = 0,055$).

Figura 32 - Análise Western blot da fosforilação da ERK1/2 aos 20 minutos das células Neuro 2a expostas ao H₂O₂ e co-tratadas com 1 μ M de ACEA e AM251.

Western blot, n=3; test *t Student* $p < 0,05$; Anova, $p = 0,055$.

Na análise da expressão da proteína caspase 3 no modelo de morte celular promovido pelo H₂O₂, conseguimos observar uma redução da ativação da caspase 3 de 7 vezes ($p < 0,05$; $n = 5$; figura 33) produzido pelo tratamento com 1 μ M de ACEA e de forma igual com o tratamento com 1 μ M de ACEA e 1 μ M de AM251 quando comparado com a ativação produzida pelo estresse oxidativo causado pelo H₂O₂ por 24 horas.

Acreditamos que se fosse realizado uma análise de expressão de proteína do co-tratamento ACEA e AM251 (2:1) das células expostas ao H₂O₂, o resultado seguiria o mesmo padrão dos resultados da análise do mesmo tratamento nas células expostas à 6OHDA, ou seja, haveria uma proteção, e uma inibição da via das caspases, como observado também na análise do mesmo tratamento nas células expostas ao LPS.

Figura 33 - Análise *western blot* da expressão da caspase 3 inibida pelo tratamento com 1 μ M de ACEA e 1 μ M de AM251 em células diferenciadas expostas ao H₂O₂ por 24 horas.

$p < 0,05$. Anova (uma via), pós-teste de *Tukey*. A banda da b-actina do tratamento DMSO apresentou intensidade semelhante com a da Caspase 3, por isto diminui a razão caspase3/b-actina.

6 DISCUSSÃO

Conforme visto nos resultados acima, na tabela abaixo encontra-se o resumo dos principais resultados, que deverá ajudar na leitura da discussão na sequência.

Tabela 2 - Resumo dos principais resultados.

MODELO		TRATAMENTO	RESULTADOS		
			<i>Viabilidade celular</i>	<i>ROS</i>	<i>Western Blot</i>
6OHDA		6OHDA	↓40%	↑50%	↑pERK, ↑caspase, ↑pAKT
		6OHDA + ACEA 1μM	ns	ns	↑pERK, ↓caspase
		6OHDA + ACEA 2μM	↑23%	↓20%	x
		6OHDA + ACEA 1μM+AM251 1μM	↑50%	↑50%	↓PI3K
		6OHDA + ACEA 2μM+AM251 1μM	↑50%	↓36%	↑pERK, ↓caspase, ↓pAKT
		6OHDA + ACEA 2μM+ CPZ 5μM	↓50%	x	x
		6OHDA + ACEA 2μM+ CPZ 10μM	↓50%	x	x
LPS		LPS	↓30%	↑40%	ns-pERK, ↑caspase
		LPS + ACEA 1μM	ns	x	x
		LPS + ACEA 2μM	↑22%	↓25%	ns-pERK, ↓caspase
		LPS + ACEA 1μM+AM251 1μM	↑22%	x	x
		LPS + ACEA 2μM+AM251 1μM	↑30%	↓33%	ns-pERK, ↓caspase
		LPS + ACEA 2μM+ CPZ 5μM	↓80%	x	x
		LPS + ACEA 2μM+ CPZ 10μM	↓68%	x	x
H2O2		H2O2	↓34%	↑150%	↑pERK, ↓caspase
		H2O2 + ACEA 1μM	ns	↓100%	↓pERK, ↓caspase
		H2O2 + ACEA 2μM	↑22%	x	x
		H2O2 + ACEA 1μM+AM251 1μM	↓30%	↑100%	↓pERK, ↓caspase
		H2O2 + ACEA 2μM+AM251 1μM	↑34%	x	x
		H2O2 + ACEA 2μM+ CPZ 5μM	↓80%	↓74%	x
		H2O2 + ACEA 2μM+ CPZ 10μM	↓68%	↓69%	x

(↓) significa redução em n% da viabilidade celular, produção de ROS ou da ativação da proteína. (↑) significa aumento em n% da viabilidade celular, produção de ROS ou da ativação da proteína. (ns) significa não significativo, (x) significa que não houve experimento com esse grupo de tratamento.

Apesar de existirem extensas evidências na literatura onde foram usadas diversas concentrações de canabinoides em modelos *in vitro*, na presente tese tomamos como base os dados disponíveis na literatura para escolher as concentrações dos canabinoides utilizados. No entanto, preferimos testar em nosso modelo se haveria alguma diferença comparada com o que já se tem na literatura. De maneira interessante, e em concordância com o estabelecido por Sarne e colaboradores, observamos o padrão de U invertido, ou seja, os canabinoides

podem apresentar respostas estimulatórias ou inibitórias a depender da concentração da droga (46). Com altas concentrações, observa-se, em geral, os efeitos mais clássicos dos canabinoides (inibição da nocicepção, diminuição da atividade locomotora, prejuízo da memória de curto prazo, redução da temperatura corporal), no entanto, baixas concentrações de canabinoides podem induzir efeitos estimulatórios. Sendo assim, tomamos como base para a curva concentração-resposta as concentrações que são frequentemente utilizadas (entre 1 μ M a 10 μ M) (57). Podemos observar que as concentrações muito baixas utilizadas *in vitro* podem ser neurotóxicas por elevar os níveis de cálcio intracelular, tal como afirmaram Okada e colaboradores e Rubrovitch e colaboradores (76,77). Adicionalmente, encontramos nos nossos resultados que não só as concentrações menores como as mais altas apresentaram citotoxicidade. Portanto, decidimos pelas concentrações de 1 μ M e 2 μ M de ACEA como agonista do receptor CB1 e 1 μ M de AM251 como antagonista do mesmo receptor.

Nossas curvas de concentrações-resposta estão de acordo com alguns dados da literatura, diferindo pouco dependendo do protocolo e tipo celular utilizado.

A utilização de 6OHDA como modelo de morte celular em cultura de células diferenciadas em neurônios tem sido previamente reportado. Nesse sentido Lundius e colaboradores utilizaram o mesmo protocolo de diferenciação sugerido por Trembley e colaboradores, mesmo protocolo utilizado por nós, no qual tratou sua cultura celular com a concentração de 20 μ M de 6OHDA por 24 horas e a viabilidade diminuiu aproximadamente 50% em ambas as culturas, tanto diferenciadas e como não diferenciadas. Esses resultados foram analisados pelos métodos de viabilidade celular (MTT) (66,78). Nós, no entanto, pudemos verificar resultado semelhante com uma concentração um pouco maior (50 μ M) que a concentração usada por Lundius e colaboradores (78).

A utilização de peróxido de hidrogênio como modelo de estresse oxidativo é aceito na literatura e amplamente descrito. Para o presente trabalho escolhemos a concentração de peróxido de hidrogênio de 40 μ M, que é uma concentração baixa se comparada com a maioria dos dados encontrados na literatura. Todavia, foi suficiente para o nosso modelo que necessitava apenas de 30% de morte celular, pois consideramos razoável pensar que se a morte celular já alcançou mais da metade dos neurônios, as chances de evidenciar a proteção celular pelos

canabinoides poderia ser perdida. No entanto, Calderón e colaboradores (64) testaram 3 diferentes concentrações (30, 60 e 250 μM) na linhagem celular Neuro2a e registraram 80% de sobrevida na análise de MTT e um aumento na liberação de LDH de 22% acima dos níveis basais. Harato e colaboradores (2012) utilizaram a mesma linhagem celular Neuro 2a e trataram com 0,5 mM (ou 500 μM) de H_2O_2 durante 9 horas de exposição e obtiveram 30% de sobrevida celular analisado pelo método de MTT. Portanto, é razoável pensar que nossa concentração de peróxido de hidrogênio escolhida foi acertada para o nível de morte celular desejado.

Finalmente, no modelo de LPS, testamos algumas concentrações e escolhemos a de 30 $\mu\text{g/ml}$ pois foi suficiente para obter o mesmo nível de morte celular comparado com a encontrada com os 40 μM de H_2O_2 . Com essas concentrações, fomos capazes de padronizar o nível de proteção promovida pelo agonista ACEA e pelo antagonista/agonista inverso AM251.

Em resumo, e de acordo com as evidências propostas no presente trabalho, podemos dizer que o tratamento com canabinoides nos três modelos de dano celular estudados no presente trabalho foi bem sucedido, no sentido em que obtivemos valores significativos de neuroproteção.

6.1 A ação dos agentes indutores de mortes (6OHDA, H_2O_2 e LPS)

O modelo de neurônios dopaminérgicos escolhido para o presente trabalho, e tomando a doença de Parkinson como base para discutir, não foi selecionado de maneira aleatória. No metabolismo da dopamina, neurotransmissor em questão, está envolvido a produção de várias espécies reativas tóxicas como quinonas, peróxido de hidrogênio, superóxido, radical hidroxil, além de produzir a 6OHDA *in vivo* (56,59,60,80,81). Nesse contexto, além de estar relacionada com disfunções mitocondriais, o que nos remete ao aumento do estresse oxidativo e a acumulação de α -sinucleína, contamos também com a presença de micróglias, as quais liberam mediadores inflamatórios, o que culmina na morte dos neurônios dopaminérgicos, evento fundamental por trás da doença de Parkinson (43,61,81,82).

Tem sido amplamente utilizado a neurotoxina 6OHDA como modelo experimental para estudar a doença de Parkinson (56,83–88), mas também, encontramos o uso do LPS como modelo de estudo para a mesma doença, pois o

LPS parece ter uma afinidade maior para células dopaminérgicas. Esse composto é capaz de aumentar a produção de superóxido (88) e diminuir o número de células positivas para tirosina hidroxilase, resultado visto em cultura primária de mesencéfalo, onde também se observou o aumento da produção de citocinas, ativando cascatas inflamatórias (80,89).

Obtivemos nos testes funcionais de viabilidade celular e produção de ROS uma morte neuronal controlada porém não muito avançada, com os três modelos propostos. Obtivemos um aumento na produção de ROS, como descrito na literatura (59,90–92); no entanto, não avaliamos o conteúdo de espécies reativas produzidos, pois esse não era o nosso interesse principal.

Com o intuito de descrever os aspectos mecanísticos por trás dos resultados funcionais obtidos, perseguimos a ativação da proteína ERK, através da sua fosforilação, pois tem sido descrito que a ERK1 /2 está envolvida em mecanismos de proliferação, diferenciação, movimentação e morte celular, e que sua ativação é mediada por receptores acoplados a proteína G (31). De maneira interessante, os receptores canabinoides, dentre eles o CB1, se associam a vários tipos de proteína G. Isto será discutido mais à frente.

Acredita-se que uma das principais funções da MAPK é definir o destino celular, principalmente através da ativação da ERK1 /2, que exerce um papel central nessa decisão.

Sendo assim, nos deparamos com uma alta fosforilação da ERK1 /2 nos tratamentos com 6OHDA e H₂O₂, no entanto, sem alteração importante no tratamento LPS. Consultamos a literatura e constatamos que Kulich e Chu (56,59) já haviam demonstrado que em células de neuroblastoma B65 há fosforilação da ERK1 /2 quando tratadas com 6OHDA e H₂O₂, o que nos indica o papel duplo que a ERK exerce ao também sinalizar fortemente a morte celular, resultados vistos no presente trabalho. Subramaniam e Unsicker também já haviam descrito que o aumento da produção de ROS induz a ativação sustentada da ERK1 /2 promovendo morte neuronal, e que a ativação transitória promoveria sobrevida (93). Nós observamos que agentes indutores de estresse oxidativo são capazes de induzir a ativação da ERK1/2 levando à cascata de morte neuronal. Consequentemente, baseados nos nossos resultados e nas evidências pré-existentes, é possível especular que a via da ERK, particularmente a ativação de ERK1/2 através da sua fosforilação, possuiria

uma função dupla ou bimodal, onde a sua ativação conduz tanto a sobrevivência (*p. ex.* quando ativada pela via do receptor CB1), quanto a morte celular (*p. ex.* quando ativada por diversos tipos de injúria celular como os descritos neste trabalho). Dessa maneira, é possível especular que exista uma conversa ou *crosstalk* entre a via da ERK, ativada pelo CB1, e outras vias de sinalização celular, que permitam à célula “decidir” o seu destino em frente a uma injúria celular.

Subramaniam e Unsicker também relatam em sua revisão que a fosforilação da ERK1/2 e a sustentação do sinal promove dano nas membranas e ativação da caspase 3, assim como danos bioquímicos e morfológicos demonstrando um tipo de morte celular chamado necroptose (uma mistura de necrose e apoptose) (94).

Reis e colaboradores (95) já demonstraram que as células Neuro 2a, que apresentam TLR-4, apresentam um aumento na expressão de iNOS, conhecido por ser induzido por LPS, após o tratamento durante 16h com lipopolissacarídeo. Bae e colaboradores trataram células NCI-H292, linhagem de células epiteliais de vias aéreas com LPS e demonstraram que essas células apresentaram um aumento de fosforilação da ERK1/2 no tratamento com LPS a partir de 30 minutos (96). Podemos sugerir que em nosso modelo de exposição ao LPS, a ERK1/2 leve mais tempo para aumentar a sua fosforilação significativamente, comparada com a exposição à 6OHDA e ao H₂O₂, ou o LPS pode ter ativado outra via como a do NFκB e a subsequente ativação de genes pro-inflamatórios (88).

6.2 Ação dos canabinoides utilizados (ACEA e AM251) e suas respostas geradas

De acordo com os nossos resultados, em termos de viabilidade celular a proteção promovida parece ser concentração-dependente, visto que foi alcançada maior porcentagem de células viáveis nos tratamentos com 2 µM de ACEA comparado com as células tratadas com 1 µM de ACEA.

Quando fomos observar através da ótica de estresse oxidativo, com a sonda redox sensível DHE, podemos observar, no entanto, que o efeito concentração-dependente não foi o mais evidenciado, pois no modelo de morte celular causado pela 6OHDA testamos as duas concentrações de agonista e observamos um registro de menor produção de ROS no co-tratamento com 2 µM de ACEA e 1 µM de AM251. No entanto, no modelo de morte celular causado pelo peróxido de

hidrogênio, 1 μM de ACEA foi suficiente para verificar uma redução significativa da produção de ROS, e no modelo do LPS os 2 μM de ACEA e 2 μM de ACEA mais 1 μM de AM251 foram capazes de diminuir significativamente a produção de ROS. Antioxidantes como N-acetil-cisteína (NAC) e uma mistura de catalase e superóxido dismutase protegeram células PC12 da morte celular induzida pela 6OHDA indicando que a maior ação citotóxica da 6OHDA está associada com geração de espécies reativas (82). Portanto, o conjunto dos nossos dados de viabilidade celular e produção de ROS nos dão permissão para afirmar que há proteção celular nos modelos de morte celular escolhidos pelo ACEA e AM251 embora que a proteção não demonstra ter sido alcançada através da mesma via. Isto será discutido com mais profundidade posteriormente.

Resultados como os nossos de proliferação ou 100% de proteção às células quando expostas ao ACEA e AM251 simultaneamente em nossos modelos de morte, também foram encontrados por Farsandaj e colaboradores que utilizaram 20 nM de AM251 mais 10 μM de meta-anandamida e 100 nM de AM630 mais 10 μM de meta-anandamida em células MDA-MB-231, células de carcinoma mamário humano, e observaram um aumento da proliferação dessas células no teste de viabilidade celular (97).

Testamos em nosso modelo a CPZ e ACEA e obtivemos um bloqueio da ação do ACEA, o que concorda com os dados do Baker e McDougall (98). Esses autores trataram com ACEA a articulação de joelho de ratos e observaram vasodilatação, mas quando co-administraram com AM251 não houve diferença comparado com o tratamento com ACEA, porém houve uma diminuição do efeito dilatador do ACEA quando co-administrou com a CPZ.

No entanto, nossos dados diferem dos resultados de Farsandaj e colaboradores que trataram suas células de câncer de mama com 10 μM de meta-anandamida e 10 μM de capsazepina, tratamento com o qual eles obtiveram proliferação. Nossos resultados sugerem que que a CPZ e o ACEA agem por uma via de sinalização diferente da via que a CPZ e a meta-anandamida agiram no modelo celular acima citado.

A possível potenciação do efeito protetor do ACEA, quando feito o co-tratamento junto com AM251 na proporção 2:1, nos faz levantar algumas hipóteses com relação à ação do AM251 nesse modelo.

É preciso ter em mente que os receptores acoplados à proteína G são capazes de mudar de conformação para um estado ativo (R^*) na ausência de um agonista. A forma ativa do receptor inicia a cascata de sinalização; a forma inativa (R) não. O agonista inverso tem alta afinidade pelo estado inativo; o antagonista clássico, por sua vez, tem afinidade igual para ambos os estados (ativo e inativo) (99); Gullapalli e colaboradores demonstraram que somente 1/5 e 1/9 dos receptores CB1 totais estão no estado ativo reconhecido pelo CP55,490 em cérebro de ratos e cães respectivamente. Adicionalmente, esses autores propõem que dois estados do receptor, R^* e R , estão em equilíbrio na ausência do ligante. A interação do ligante com o receptor desloca este equilíbrio para um ou outro estado. Diante disso, se assumirmos que o AM251 agiu como um agonista inverso (73) ele teria muito mais sítios para se ligar que o ACEA em nosso modelo. E ainda de acordo com Gullapalli e colaboradores o tratamento com o agonista ACEA deslocaria esse equilíbrio para o estado ativo e, conseqüentemente, ativaria a via.

Mas, devemos ressaltar que em termos teóricos, o receptor CB1 possui uma atividade constitutiva, a qual parece ser independente da presença de endocanabinoides (73). De acordo com os antecedentes na literatura, existe dificuldade em encontrar moléculas capazes de agirem como um antagonista clássico, aqueles que bloqueiam completamente a atividade do receptor; já os chamados antagonistas neutros são incapazes de bloquear dita atividade constitutiva, embora eles devessem inibi-la se a razão para existir essa atividade fosse os endocanabinoides (31).

No entanto, Pertwee propõe que a modulação negativa da atividade constitutiva do receptor CB1 seria resultante do agonismo inverso que moléculas como AM251 (pode induzir efeitos canabinomiméticos inversos) realizaria, através de mecanismos alostéricos (100). Cabe destacar que essa possibilidade faz parte de três modelos ou mecanismos propostos, que permitem explicar a habilidade que moléculas como AM251 e SR141716A tem de agir como canabinomiméticos inversos. Todavia, assumir que o AM251 bloquearia completamente a atividade constitutiva do receptor CB1 resulta um paradoxo com os nossos resultados de viabilidade celular que sugerem que AM251, na presença de ACEA, potencializa a atividade do receptor. Portanto, é possível que os nossos resultados não estejam de acordo com esses mecanismos propostos por Pertwee.

Portanto, vamos nos aventurar em explicar nossos resultados de neuroproteção alcançado pelo tratamento com ACEA e AM251 levantando outra hipótese de acordo com os experimentos realizados por Gatley e colaboradores em que o AM251 e o agonista do receptor CB1 CP55,490 podem ter se ligado no mesmo receptor CB1, pois em experimentos de “*binding*” os dois radioligantes supostamente puderam interagir cada um em um sítio de união diferente no ou próximo ao sítio ativo (101).

Esse fato se constituiria em ligação alostérica do AM251. Sítios alostéricos são sítios topograficamente distintos dos sítios ortostéricos (que reconhece o agonista endógeno do receptor); portanto, características estruturais que determinam a ligação do ligante aos sítios alostéricos são diferentes daqueles dos ligantes ortostéricos (100).

Drogas alostéricas agem modulando a atividade do receptor, através de mudanças conformacionais no receptor que são transmitidas do sítio alostérico para o ortostérico e/ou para os sítios de acoplamento do efetor (100).

Baur e colaboradores utilizaram receptores GABA_A recombinantes expressos em oócitos *Xenopus laevis*, nos quais foram expostos ao AM251 e SR41716A (rimonabant) na ausência e presença de GABA, e observaram um efeito modulador alostérico apenas quando na presença de GABA (102). A resposta demonstrada foi um aumento de três vezes do potencial gabaérgico. Esse resultado se assemelha ao nosso quando tratamos as células apenas com AM251 e não obtivemos resposta, no entanto, quando conjugamos com 2 μ M de ACEA o efeito do ACEA foi melhorado significativamente.

Price e colaboradores explicam que a resposta alostérica depende tanto do tipo de ligante ortostérico quanto do ligante alostérico. De acordo com essas interações vai ser a variação da resposta modulatória proporcionada pelo sítio alostérico (100). Portanto, podemos segurar como hipótese a respeito do comportamento do AM251 nos modelos aqui estudados que tem grande potencial de estar modulando alostericamente o receptor CB1, potenciando a ação do ACEA e não antagonizando-a. Talvez nos arriscamos a afirmar que nos nossos modelos estudados o AM251 foi um agonista inverso com ação alostérica, concordando com Gatley e colaboradores.

6.3 Vias de sinalização que determinam o destino das células envolvidas com o receptor CB1

O próximo passo foi investigar se a via de sinalização que esse tratamento estava acionando era a via clássica da MAPK. Dita procura faz sentido à luz do fato que os receptores acoplados à proteína G podem adotar múltiplas conformações, levando à ativação de diversas vias de sinalização. Turu e Hunyady relataram que essas diferentes conformações podem ser estabilizadas por diferentes ligantes, levando a uma ativação de via influenciada por esse ligante, assim um mesmo ligante pode ativar diferentes via dependendo até da sua concentração (31). Dessa maneira, a multiplicidade de acoplamento a proteínas G abre a possibilidade de múltiplos segundos-mensageiros serem ativados. Considerando que o receptor CB1 pode estar acoplado a ambas, G_s e $G_{i/o}$, e essas proteínas serem reguladas por agonistas de forma diferente, é possível a ativação de diferentes vias de sinalização (33).

O fator complicador é que o receptor CB1 apresenta diferentes estados de afinidades, e diferentes estados conformacionais. Foi demonstrado (33) que a proporção de cada estado de ativação está em função do ligante, por exemplo, a alta concentração de WIN55,212-2 provavelmente acopla mais facilmente a proteína $G_{q/11}$ nas células HEK293 e pode aumentar o cálcio intracelular.

No caso particular do receptor CB1 (que se associa a proteínas G), a sua estimulação leva à ativação da ERK1/2 envolvendo vários mecanismos independentes ou paralelos, incluindo a ativação, por exemplo da proteína $G_{i/o}$, PI3K/AKT, inibição da adenilil ciclase e PKA, e a ativação da Src proteína cinase FYN. No entanto, a estimulação da ERK1/2 parece ser dependente do tipo celular, e diferentes agonistas podem ativa-la através de diferentes vias; a estimulação do CB1 também pode ativar a p38 MAPK e a JNK (31,103).

Nesse sentido, resolvemos investigar a via clássica que o receptor CB1 ativa. Obtivemos na curva tempo-resposta que o tratamento com 1 μ M de ACEA em exposição à 6OHDA, 20 minutos foi suficiente para observar um aumento na fosforilação da ERK comparado com os 10 minutos iniciais. Da mesma maneira observamos um aumento significativo aos 20 minutos com o tratamento de 2 μ M de ACEA e 1 μ M de AM251. Os 20 minutos estão de acordo com Asimaki e Mangoura (104) onde demonstraram um aumento da fosforilação da ERK1/2 até 30 minutos,

em duas fases: uma iniciada com 2 minutos e sustentada até os 5 minutos e então declina, e a segunda aumentando aos 15 minutos e sustentando até os 30 minutos quando começa a declinar para os níveis basais aos 90 minutos. Essa ativação da ERK foi relacionada à indução de proliferação, crescimento de neuritos e diferenciação. Asimaki e Mangoura (102) explicam que o segundo pico de ativação da ERK, mas não primeiro, foi abolido ao tratar com a toxina pertussis, o que indica que o primeiro pode ter sido ativação da proteína $G_{q/11}$, e o segundo pico foi relacionado à proteína $G_{i/o}$. Esse fato corroboraria a hipótese de acoplamento a múltiplas proteínas G.

Neuroproteção por canabinoide tem sido amplamente estudada, e Chen e colaboradores observaram que ao induzir apoptose por toxicidade de NMDA (7,5 mM) houve um aumento na produção de ROS e na fosforilação de p38 MAPK, e ao tratar com THC houve um bloqueio na produção de ROS e uma inibição da na ativação da p38 MAPK(105).

Outros estudos mostram que a subunidade $\beta\gamma$ pode ativar a ERK através da PI3K como sinalização intermediária (35). Por sua vez, outros propõem mecanismos dependentes do AMP cíclico, ou ainda via de transativação do receptor de tirosina cinase, embora essas vias não são exclusivas umas das outras (106). No entanto, a dependência da ERK1/2 pode ser célula-específica, pois a ativação da ERK1/2 via CB1 foi vista em células CHO e U373 MG, mas não foi vista uma concomitância na ativação da PI3K com a ativação da ERK1/2 em cultura primária de neurônios corticais (106).

Ibrahim e Abdel-Rahman (107) apresentaram um resultado interessante quando encontraram alterações no tronco encefálico de ratos conscientes tratados com WIN55,212-2 e observaram que quando havia fosforilação da ERK, diminuía a fosforilação da AKT, demonstrando uma modulação diferenciada para os controles cardiovasculares neurais. Nossos resultados parecem concordar apenas no modelo de exposição À 6OHDA com o tratamento de ACEA e AM251 (2:1) em 20 minutos quando observamos um aumento na atividade da ERK e uma indicação na diminuição da fosforilação da AKT, dado que não foi estatisticamente significativo.

Bouaboula e colaboradores descreveram que os canabinoides inibiram a adenilato ciclase, e para provar que a ativação da MAPK/ERK era decorrente dessa inibição, esses autores aumentaram os níveis de AMP cíclico dentro da célula. Para

surpresa deles, os níveis basais de ativação da MAPK/ERK estiveram aumentados mesmo sem a adição de canabinoide. No entanto, quando adicionaram o agonista do receptor CB1, CP55,940, nas mesmas condições, houve um reforço no sinal correspondente aos efeitos aditivos dos dois estímulos, ou seja, a ativação da MAPK/ERK pelos canabinoides não é secundária a inibição da adenilato ciclase (108).

Uma característica que pode ser usada para explicar o fato acima descrito é que os canabinoides podem ter utilizado uma via alternativa como por exemplo, a ativação da Raf, Raf-1 ou B-Raf, pela PKA pode levar a inibição ou ativação respectivamente da ERK1/2 (103). No entanto, a grande maioria da literatura afirma que o aumento de AMP cíclico e análogos, ou ainda a adição forskolina inibem a habilidade do receptor CB1 ativar a ERK1/2 (106).

Estresse oxidativo gerado por LPS também aumenta a atividade da p38 MAPK (109), talvez por essa razão a busca pela fosforilação da ERK em nosso modelo de LPS não pareceu significativa, no entanto, ainda podemos atribuir ao pequeno número de experimentos.

A diminuição da fosforilação da ERK no modelo do H₂O₂ pode ser explicada pelo comportamento dual dessa proteína, no qual ela também pode sinalizar morte celular, como citado no tópico anterior. Logo, a redução da fosforilação da ERK no modelo de H₂O₂ com o tratamento com canabinoide explica proteção celular, pelo fato que naquele momento a ERK não estava sinalizando sobrevida, e sim morte celular. Como já havia sido reportado por Subramaniam e Unsicker que há um aumento na fosforilação da ERK1/2 quando há um aumento nos níveis de H₂O₂, logo a redução da fosforilação dessa proteína no tratamento com 1 µM de ACEA pode ser vista como uma proteção desencadeada pela ativação do receptor CB1 pelo ACEA (93).

Há outros relatos na literatura como os de Cunningham e colaboradores que observaram um aumento da fosforilação da ERK ao infectar as células com um vírus, e a subsequente ativação da caspase 3 (110). Como podemos observar, nosso tratamento nos três modelos estudados, independente da via de sinalização inicial, os tratamentos com ACEA e ACEA/AM251 (2:1) foram eficazes na prevenção da morte celular, através da inibição da ativação da caspase 3.

A esse respeito podemos aventar algumas possibilidades de via no modelo de 6OHDA. Aos vinte minutos de tratamento com ACEA/A251 (2:1) observamos o aumento da PI3K e, mesmo não sendo significativo, um aumento da fosforilação da AKT no mesmo tempo (20 minutos). Esses dados concordam com os resultados de Ha e colaboradores no qual foi demonstrado uma prevenção da morte celular, decorrente do tratamento com óxido nítrico em células PC12, através da ativação da via da PI3K/AKT, suprimindo a liberação do citocromo C e ativação da caspase 3 (82). De maneira interessante, podemos ver que nos nossos tratamentos aos 20 minutos há uma redução significativa da caspase 3 não só no tratamento ACEA/AM251 (2:1), mas, em todos os tratamentos com canabinoides nos três modelos. No entanto, evidências na literatura propõem que poderia estar envolvida outra via de sinalização com a proteção celular.

Mnich e colaboradores demonstraram através da utilização de anandamida, um efeito protetor contra a toxicidade de 6OHDA. Dito efeito foi promovido através da ativação da JNK, resultando na inibição de apoptose(58). Finalmente, em estudo desenvolvido por Tran e colaboradores foi observado que a ativação da ERK1/2 foi responsável pela inibição da via de sinalização de morte no nível da caspase 8, ou inibindo um passo antes da amplificação, talvez a liberação do citocromo c, porém o exato mecanismo não foi ainda elucidado (111).

De acordo com os nossos dados e as evidências propostas anteriormente, a literatura é vasta na correlação entre a fosforilação da ERK1/2 e inibição da caspase 3. No entanto, como vimos, a mesma fosforilação da ERK1/2 também sinaliza morte celular. O que se sabe é que diferentes isoformas da ERK1/2 são ativadas por fatores neurotróficos que exercem ações protetoras (56), mas o estado redox celular desequilibrado pode ser prejudicial, levando a uma ativação sequencial da p38 e ERK1/2 e contribuir para consequente apoptose, como é visto na doença de Parkinson e em outras doenças neurodegenerativas.

A ativação sustentada e bifásica da ERK1 /2 havia sido relatada por Kulich e Chu (56) mas essa ERK não havia sido ativada pelo receptor CB1. Asimaki e Mangoura (104) demonstraram que o receptor CB1 também ativa a ERK1 /2 de forma sustentada e bifásica, de modo que o primeiro pico de ativação da ERK é via proteína $G_{q/11}$, e o segundo pico de ativação via proteína $G_{i/o}$.

A *priori* tinha sido atribuído que a ativação sustentada da ERK1/2 seria prejudicial às células, mas vimos que isso não é uma resposta única. Pois, temos visto que a ativação do receptor CB1 também leva a uma ativação sustentada e bifásica da ERK1 /2 (93,104), significando sobrevida e diferenciação.

6.4 Considerações finais

Sabe-se que o tipo celular, o tipo de estímulo e a duração da ativação da ERK1/2 são fatores que levam a manutenção da vida ou da morte celular. O desafio é saber se em um sistema onde se encontra, por exemplo, 6OHDA e canabinoides, onde ambos fosforilam a ERK1/2, o que vai determinar o caminho que essa fosforilação vai seguir? Seria talvez a co-ativação de vias paralelas adicionais para direcionar o destino da célula? Essas e outras perguntas ainda precisam ser melhor investigadas e respondidas.

Além disso, a escolha de fazer o tratamento com ACEA e AM251 foi uma decisão acertada no sentido em que obtivemos neuroproteção, seja com o uso do agonista só, seja conjugado com o agonista inverso. O ponto principal que deve ser ressaltado é que receptor CB1 está presente nas células para modular e contribuir com a decisão do destino da célula, ou ousar em dizer o destino do tecido. O que parece ser claro, através dos nossos resultados e das evidências propostas na literatura é que o receptor CB1 não é o tipo de receptor que se liga ao ligante e desencadeia uma cascata única e previsível de sinalização.

Como foi analisado, existem várias nuances a serem observadas, nuances essas que *a priori* não estão claras. Talvez devido a essa multiplicidade de acoplamentos proteicos e acionamento de vias de sinalização é que se encontra a real dificuldade de pensar em canabinoides como tratamento terapêutico, além do fato que os receptores canabinoides estão espalhados por todo o corpo, agindo de maneiras diferentes dependendo do sistema em que está localizado, e qual o ambiente que o está estimulando.

O sistema endocanabinoide age como um real sistema modulador com direito a todas as suas possibilidades de atuação, assim é vista a sua importância. Pensar sistema modulador endocanabinoide é pensar na complexidade de um organismo desenvolvido e em processo de constante adaptação.

7 CONCLUSÃO

Constatamos que nos modelos de neurodegeneração propostos, o agonista do receptor CB1, ACEA foi capaz de proteger as células contra o dano celular causado por ROS e eventuais mediadores inflamatórios.

Sugerimos que o co-tratamento com ACEA e AM251 na proporção 2:1 induz uma modificação conformacional de modo que o AM251 se ligue ao sítio alostérico do receptor CB1 potenciando a ação do agonista ACEA, promovendo neuroproteção.

A neuroproteção observada através dos ensaios de viabilidade celular e produção de ROS foi decorrente da ativação de vias de sinalização diferente dependendo do dano celular e tratamento com canabinoides, demonstrando mais uma vez o papel modulador de sinal que a ativação do receptor CB1 exerce para complementar a decisão do destino celular.

REFERÊNCIAS*

- 1 MALCHER-LOPES, R.; RIBEIRO, S. **Maconha, cérebro e saúde**. Rio de Janeiro: Vieira e Lent, 2007.
- 2 MECHOULAM, R.; GAONI, Y. A Total Synthesis Of DI-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, The Active Constituent Of Hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, p. 3273–3275, 1965.
- 3 MECHOULAM, R.; HANUS, L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 108, n. 1-2, p. 1–13, 2000.
- 4 MATSUDA, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561–564, 1990.
- 5 MUNRO, S. et al. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61–65, 1993.
- 6 DEVANE, W. A. et al. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. **Science**, v. 258, n. December, p. 1946–1949, 1992.
- 7 RODRÍGUEZ DE FONSECA, F. et al. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. **Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)**, v. 40, n. 1, p. 2–14, 2005.
- 8 MECHOULAM, R. et al. Endogenous cannabinoid ligands biological studies chemical and. **Cell**, v. 7855, n. 96, p. 0–4, 1996.
- 9 ROMERO, J. et al. The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia. biochemical, pharmacological, and therapeutic aspects. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 95, n. 2, p. 137–152, 2002.
- 10 SÁNCHEZ, A J.; GARCÍA-MERINO, A. Neuroprotective agents: cannabinoids. **Clinical Immunology (Orlando, Fla.)**, v. 142, n. 1, p. 57–67, 2012.
- 11 FAGAN, S. G.; CAMPBELL, V. A. The influence of cannabinoids on generic traits of neurodegeneration. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 6, p. 1347–1360, 2014.
- 12 MICALE, V. et al. Endocannabinoids and neurodegenerative diseases. **Pharmacological Research: the Official Journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 56, n. 5, p. 382–392, 2007.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- 13 OHNO-SHOSAKU, T. et al. Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. **The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 10, p. 3864–3872, 2002.
- 14 STELT, M. VAN DER; MARZO, V. Di The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. **European Journal of Pharmacology**, v. 480, n. 1-3, p. 133–150, 2003.
- 15 KREITZER, A. C AND REGEHR, W. Retrograde signaling by endocannabinoids. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, n. 3, p. 324–330, 2002.
- 16 ROBBE, D. et al. Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 12, p. 8384–8388, 2002.
- 17 LISBOA, S. F.; GUIMARÃES, F.S. Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 8, p. 2455–2462, 2012.
- 18 MACKIE, K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 168, p. 299–325, 2005.
- 19 MACKIE, K. Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization. **Life Sciences**, v. 77, n. 14, p. 1667–1673, 2005.
- 20 AMERI, A. The effects of cannabinoids on the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 58, n. 4, p. 315–348, 1999.
- 21 MATIAS, I. et al. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 8, p. 3171–3180, 2006.
- 22 BERMÚDEZ-SILVA, F. J. et al. Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. **Diabetologia**, v. 51, n. 3, p. 476–487, 2008.
- 23 GRANT, I.; CAHN, B. R. Cannabis and endocannabinoid modulators: Therapeutic promises and challenges. **Clinical Neuroscience Research**, v. 5, n. 2-4, p. 185–199, 2005.
- 24 FERNÁNDEZ-RUIZ, J. et al. Role of CB2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 286, n. 1-2 Suppl 1, p. S91–6, 2008.

- 25 ONAIVI, E. S. et al. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 1074, n. 1, p. 514–536, 2006.
- 26 GONG, J. -P. et al. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. **Brain Research**, v. 1071, n. 1, p. 10–23, 2006.
- 27 ROMERO-ZERBO, S. Y.; BERMÚDEZ-SILVA, F. J. Cannabinoids, eating behaviour, and energy homeostasis. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, n. 1-2, p. 52–58, 2014.
- 28 SVÍZENSKÁ, I. et al. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 90, n. 4, p. 501–511, 2008.
- 29 RYBERG, E. et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 7, p. 1092–1101, 2007.
- 30 Howlett, A. C.; Fleming, R. M. Cannabinoid Inhibition of Adenylate Cyclase: Pharmacology of the Response in Neuroblastoma Cell Membranes. **Molecular Pharmacology**, v. 26, p. 532–538, 1984.
- 31 TURU, G.; HUNYADY, L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 44, n. 2, p. 75–85, 2010.
- 32 RHEE, M. H. et al. Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. **Journal of Neurochemistry**, v. 71, n. 4, p. 1525–1534, 1998.
- 33 LAUCKNER, J. E. et al. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 52, p. 19144–19149, 2005.
- 34 GUZMÁN, M. Cannabinoids: potential anticancer agents. **Nature Reviews. Cancer**, v. 3, n. 10, p. 745–755, 2003.
- 35 GALVE-ROPERH, I. et al. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 1385–1392, 2002.
- 36 WAGER-MILLER, J. et al. Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 121, n. 1-2, p. 83–89, 2002.
- 37 STELT, M. VAN DER; DI MARZO, V. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. **Neuromolecular Medicine**, v. 7, n. 1-2, p. 37–50, 2005.

- 38 FOWLER, C. J. et al. Modulation of the endocannabinoid system: Neuroprotection or neurotoxicity ? **Experimental Neurology**, v. 224, n. 1, p. 37–47, 2010.
- 39 ALBAYRAM, O. et al. Role of CB1 cannabinoid receptors on GABAergic neurons in brain aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 27, p. 11256–11261, 2011.
- 40 SAGREDO, O. et al. Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. **Molecular Neurobiology**, v. 36, n. 1, p. 82–91, 2007.
- 41 HAMPSON, A. J. H. et al. Cannabidiol and (-)-delta 9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. **Medical Sciences**, v. 95, n. July, p. 8268–8273, 1998.
- 42 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 Research**, v. 1134, n. 1, p. 162–170, 2007.
- 43 LITTLE, J. P. et al. Therapeutic potential of cannabinoids in the treatment of neuroinflammation associated with Parkinson's disease. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 7, p. 582–590, 2011.
- 44 CHUNG, E. S. et al. Cannabinoids prevent lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat substantia nigra in vivo through inhibition of microglial activation and NADPH oxidase. **Brain research**, v. 1451, p. 110–116, 2012.
- 45 CLARKE, J R. et al. Posttraining activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs object recognition long-term memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, n. 2, p. 374–381, 2008.
- 46 SARNE, Y. et al. The dual neuroprotective-neurotoxic profile of cannabinoid drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1391–401, 2011.
- 47 SARKER, K. P.; MARUYAMA, I. Anandamide induces cell death independently of cannabinoid receptors or vanilloid receptor 1: possible involvement of lipid rafts. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 6, p. 1200–1208, 2003.
- 48 SHEN, M. et al. Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 14, p. 4322–4334, 1996.
- 49 KELLEY, B. G.; THAYER, S. A. Anandamide transport inhibitor AM404 and structurally related compounds inhibit synaptic transmission between rat hippocampal neurons in culture independent of cannabinoid CB1 receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 496, n. 1-3, p. 33–39, 2004.

- 50 ROSSI, S. et al. Cannabinoid CB₁ receptors regulate neuronal TNF- α effects in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 6, p. 1242–1248, 2011.
- 51 HU, H. et al. Brain CB₁ receptor expression following lipopolysaccharide-induced inflammation. **Neuroscience**, v. 227, p. 211–222, 2012.
- 52 PISANI, V. et al. Dynamic changes of anandamide in the cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients. **Movement Disorders: official Journal of the Movement Disorder Society**, v. 25, n. 7, p. 920–4, 2010.
- 53 BROTHIE, J. CB cannabinoid receptor signalling in Parkinson's disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 54–61, 2003.
- 54 MORERA-HERRERAS, T. et al. Endocannabinoid modulation of dopaminergic motor circuits. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, p. 110, 2012.
- 55 Chaves-Kirsten, G.P. **O receptor canabinóide CB 1 nos núcleos da base e a sua participação no processo degenerativo em modelos da Doença de Parkinson**. 2013. 163f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- 56 JEON, P. et al. Cannabinoid receptor agonist protects cultured dopaminergic neurons from the death by the proteasomal dysfunction. **Anatomy & Cell Biology**, v. 44, n. 2, p. 135–142, 2011.
- 57 MNICH, K. et al. Inhibition by anandamide of 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 8184-8197, 2010.
- 58 KULICH, S. M.; CHU, C. T. Role of reactive oxygen species in extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation and 6-hydroxydopamine cytotoxicity. **Journal of Biosciences**, v. 28, n. 1, p. 83–89, 2003.
- 59 KULICH, S. M. et al. 6-Hydroxydopamine induces mitochondrial ERK activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, n. 3, p. 372–383, 2007.
- 60 KULICH, S. M.; CHU, C. T. Sustained extracellular signal-regulated kinase activation by 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 77, n. 4, p. 1058–1066, 2001.
- 61 MACHADO, A. et al. Peripheral inflammation increases the damage in animal models of nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration: possible implication in Parkinson's disease incidence. **Parkinson's disease**, v. 2011, p. 3937-3969, 2011.
- 62 OLMSTED, J. B. et al. Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 65, n. 1, p. 129–136, 1970.

- 63 RIOS, C. et al. Mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neurogenesis. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 4, p. 387–395, 2006.
- 64 CALDERÓN, F. H. et al. PC12 and Neuro 2a Cells Have Different Susceptibilities to Acetylcholinesterase – Amyloid Complexes, Amyloid25–35 Fragment, Glutamate, and Hydrogen Peroxide. **Journal of Neuroscience research**, v. 56, p. 620–631, 1999.
- 65 JORDAN, J. D. et al. Cannabinoid receptor-induced neurite outgrowth is mediated by Rap1 activation through G(alpha)o/i-triggered proteasomal degradation of Rap1GAP1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 12, p. 11413–11421, 2005.
- 66 TREMBLAY, R. G. et al. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 186, n. 1, p. 60–67, 2010.
- 67 AUAD, L. G. **A metanandamida , um agonista canabinóide , protege a linhagem de neuroblastoma neuro2a.** 2012. 25f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- 68 LASTRES-BECKER, I. et al. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro : Relevance to Parkinson ' s disease. **Neurobiology of Disease**, v. 19, p. 96 – 107, 2005.
- 69 LINDEGREN, H. et al. Loss of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in scrapie-infected N2a cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 71, n. 2, p. 291–299, 2003.
- 70 DOWNER, E. J.; FOGARTY, M. P.; et al. Tetrahydrocannabinol-induced neurotoxicity depends on CB1 receptor-mediated c-Jun N-terminal kinase activation in cultured cortical neurons. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 3, p. 547–57, 2003.
- 71 OWUSU-ANSAH, E.; YAVARI, A.; BANERJEE, U. A protocol for in vivo detection of reactive oxygen species. **Nature Protocol Exchange**, 2008. Disponível em: <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/414>. Acesso em: 15 Out. 2014.
- 72 CAI, H. et al. Vascular Biology Protocols. In: N Sreejayan, J Ren (Ed.); **Methods in Molecular Medicine**. Totowa, NJ: Humana Press Inc, v.000.2007, p. 293 – 311.
- 73 PERTWEE, R. G. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. **Life Sciences**, v. 76, n. 12, p. 1307–1324, 2005.
- 74 GRUNDY, R.I. et al. Cannabinoids and neuroprotection. **Molecular Neurobiology**, v. 24, n. 1-3, p. 29–51, 2001.

- 75 MARSICANO, G. et al. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, n. 3, p. 448–456, 2002.
- 76 OKADA, M. et al. The facilitating and suppressing effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on the rise in intrasynaptosomal Ca²⁺ concentration in rats. **Neuroscience Letters**, v. 140, n. 1, p. 55–58, 1992.
- 77 RUBOVITCH, V. et al. The cannabinoid agonist DALN positively modulates L-type voltage-dependent calcium-channels in N18TG2 neuroblastoma cells. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 101, n. 1-2, p. 93–102, 2002.
- 78 LUNDIUS, E.G. et al. Functional GPR37 trafficking protects against toxicity induced by 6-OHDA, MPP⁺ or rotenone in a catecholaminergic cell line. **Journal of Neurochemistry**, v. 124, n. 3, p. 410–7, 2013.
- 79 HARATO, M. et al. Bupivacaine-induced apoptosis independently of WDR35 expression in mouse neuroblastoma Neuro2a cells. **BMC Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 149 - 150, 2012.
- 80 WHITTON, P.S. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 8, p. 963–976, 2007.
- 81 FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. A Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Parkinson's Disease**, v. 2011, p. 1–9, 2011.
- 82 HA, K.-S. et al. Nitric oxide prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells through cGMP-dependent PI3 kinase/Akt activation. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 9, p. 1036–1047, 2003.
- 83 LATCHOUMYCANDANE, C. et al. Dopaminergic neurotoxicant 6-OHDA induces oxidative damage through proteolytic activation of PKC δ in cell culture and animal models of Parkinson's disease. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 256, n. 3, p. 314 - 323, 2011.
- 84 KANTHASAMY, A. et al. Novel cell death signaling pathways in neurotoxicity models of dopaminergic degeneration: relevance to oxidative stress and neuroinflammation in Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v. 31, n. 5, p. 555–561, 2010.
- 85 TUFEKCI, K. U.; GENC, S.; GENC, K. The endotoxin-induced neuroinflammation model of Parkinson's disease. **Parkinson's Disease**, v. 2011, Article ID 487450, p. 1 - 25, 2011.

86 SCHOBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell and Tissue Research**, v. 318, n. 1, p. 215–224, 2004.

87 ALVAREZ-FISCHER, D. et al. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice. **Experimental Neurology**, v. 210, n. 1, p. 182–193, 2008.

88 ORR, C.; ROWE, D.; HALLIDAY, G. An inflammatory review of Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 68, n. 5, p. 325–340, 2002.

89 FERRARI, C.C.; TARELLI, R. Parkinson's disease and systemic inflammation. **Parkinson's Disease**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

90 GAURON, C. et al. Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. **Scientific Reports**, v. 3, Article ID 2084, 2013.

91 CHUNG, E.S. et al. Cannabinoids prevent lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat substantia nigra in vivo through inhibition of microglial activation and NADPH oxidase. **Brain Research**, v. 1451, p. 110–116, 2012.

92 CALDERÓN, F. H. et al. PC12 and neuro 2a cells have different susceptibilities to acetylcholinesterase-amyloid complexes, amyloid25-35 fragment, glutamate, and hydrogen peroxide. **Journal of Neuroscience Research**, v. 56, n. 6, p. 620–631, 1999.

93 SUBRAMANIAM, S.; UNSICKER, K. ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death. **The FEBS Journal**, v. 277, n. 1, p. 22–29, 2010.

94 VANDENABEELE, P. et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 10, p. 700–714, 2010.

95 REIS, K. et al. NADPH Oxidase Inhibitor Diphenyliodonium Abolishes Regulation of Transferrin Receptor Expression in N2a and BV-2 Cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 84, p. 1047–1052, 2006.

96 BAE, C. H. et al. Delphinidin Inhibits LPS-Induced MUC8 and MUC5B Expression Through Toll-like Receptor 4-Mediated ERK1/2 and p38 MAPK in Human Airway Epithelial Cells. **Clinical and Experimental Otorhinolaryngology**, v. 7, n. 3, p. 198–204, 2014.

97 FARSANDAJ, N.; GHAREMANI, M. H.; OSTAD, S. N. Role of cannabinoid and vanilloid receptors in invasion of human breast carcinoma cells. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of The International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 31, n. 4, p. 377–387, 2012.

- 98 BAKER, C. L.; MCDOUGALL, J. J. The cannabinomimetic arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA) acts on capsaicin-sensitive TRPV1 receptors but not cannabinoid receptors in rat joints. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 8, p. 1361–1367, 2004.
- 99 GULLAPALLI, S. et al. Characterization of active and inactive states of CB1 receptor and the differential binding state modulation by cannabinoid agonists, antagonists and inverse agonists. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 8, p. 1215–1219, 2010.
- 100 PRICE, M. R. et al. Allosteric Modulation of the Cannabinoid CB 1 Receptor. **Molecular Neurodegeneration**, v. 68, n. 5, p. 1484–1495, 2005.
- 101 GATLEYL, S. J. et al. Binding of the non-classical cannabinoid CP 55,940, and the diarylpyrazole AM251 to rodent brain cannabinoid receptors. **Pharmacology Letters**, v. 61, n. 14, p. 191–197, 1997.
- 102 BAUR, R.; GERTSCH, J.; SIGEL, E. The cannabinoid CB1 receptor antagonists rimonabant (SR141716) and AM251 directly potentiate GABA(A) receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 8, p. 2479–2484, 2012.
- 103 DAVIS, M. I.; RONESI, J.; LOVINGER, D. M. A predominant role for inhibition of the adenylate cyclase/protein kinase A pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 49, p. 48973–48980, 2003.
- 104 ASIMAKI, O.; MANGOURA, D. Cannabinoid receptor 1 induces a biphasic ERK activation via multiprotein signaling complex formation of proximal kinases PKC ϵ , Src, and Fyn in primary neurons. **Neurochemistry International**, v. 58, n. 2, p. 135–144, 2011.
- 105 CHEN, J.; ERRICO, S. L.; FREED, W. J. Reactive oxygen species and p38 phosphorylation regulate the protective effect of 9 -tetrahydrocannabinol in the apoptotic response to NMDA. **Neuroscience Letters**, v. 389, n. 2, p. 99–103, 2005.
- 106 SCOTTER, E., GRAHAM, S., GLASS, M. The Cannabinoid Receptors. In: PH Reggio (Ed.); **The Cannabinoid Receptors**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009, p. 153–171.
- 107 IBRAHIM, B. M.; ABDEL-RAHMAN, A. A Differential modulation of brainstem phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling underlies WIN55,212-2 centrally mediated pressor response in conscious rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 340, n. 1, p. 11–18, 2012.
- 108 BOUABOULA, M. et al. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. **The Biochemical Journal**, v. 312, p. 637–641, 1995.

- 109 HOU, R. C. -W. et al. Effect of sesame antioxidants on LPS-induced NO production by BV2 microglial cells. **Neuroreport**, v. 14, n. 14, p. 1815–9, 2003.
- 110 CUNNINGHAM, K. A.; CHAPMAN, N. M.; CARSON, S. D. Caspase-3 activation and ERK phosphorylation during CVB3 infection of cells: influence of the coxsackievirus and adenovirus receptor and engineered variants. **Virus Research**, v. 92, n. 2, p. 179–186, 2003.
- 111 TRAN, S. E. et al. MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 16484–16490, 2001.