TALITA APARECIDA DE MORAES VRECHI

**O POTENCIAL TERAPÊUTICO DE COMPOSTOS CANABINOIDES EM UM
MODELO *IN VITRO* DE MORTE NEURONAL**

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

São Paulo
2016

TALITA APARECIDA DE MORAES VRECHI

**O POTENCIAL TERAPÊUTICO DE COMPOSTOS CANABINOIDES EM UM
MODELO *IN VITRO* DE MORTE NEURONAL**

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

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Andréa da Silva
Torrão

Versão original

São Paulo
2016

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

Vrechí, Talita Aparecida de Moraes.

O potencial terapêutico de compostos canabinoides em um modelo *in vitro* de morte neuronal / Talita Aparecida de Moraes Vrechí. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Andréa da Silva Torão.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Comunicação celular no sistema nervoso: expressão e regulação de receptores.

Versão do título para o inglês: The therapeutic potential of cannabinoid in an *in vitro* model of neuronal death.

1. Estresse de retículo endoplasmático 2. Neuroinflamação 3. Receptor CB1 4. Canabinoide 5. Neuroproteção I. Torão, Profa. Dra. Andréa da Silva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB029/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Talita Aparecida de Moraes Vrechi.

Título da Dissertação: O potencial terapêutico de compostos canabinoides em um modelo *in vitro* de morte neuronal.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

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 N° 634/13 referente ao projeto intitulado: "*O Potencial terapêutico de compostos canabinóides em um modelo in vitro de morte neuronal*" sob a responsabilidade de **Talita Aparecida de Moraes Vrechi**, 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 nº466 de 2012.

São Paulo, 16 de dezembro de 2013.

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

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

Aos meus pais, Betânia e Claudemir

Ao meu irmão, Lucas

À Deus e todos os seus Santos e Anjos

AGRADECIMENTOS

Na jornada deste trabalho muitas pessoas especiais me deram apoio em todos os sentidos, desde do desenvolvimento deste projeto até em minha vida pessoal. Muitas dificuldades e muitos obstáculos foram superados através desses anjos que Deus colocou na minha vida no momento exato.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela vida, pela natureza, pela minha família, pelos meus amigos, pela grande oportunidade que tive de realizar o Mestrado no lugar certo e na hora certa.

À minha orientadora Andréa da Silva Torrão, que abriu as portas do seu laboratório para mais essa etapa da minha vida, sempre presente e disposta a ajudar, paciente, dedicada.

Aos meus pais que sempre me deram muito amor e carinho, força e compreensão, que sempre dão o melhor de si para minha felicidade e realização dos meus sonhos. Obrigado mãe por sempre se preocupar comigo, por cuidar de mim, por ser maravilhosa em tudo que faz, pela sua força, pela sua sabedoria, pelos inúmeros conselhos, por me amar incondicionalmente, por tudo! Obrigado pai pela sua força, por me apoiar em todos momentos da minha vida, por ser batalhador, por ser paciente, por sempre me ajudar em tudo que preciso, pela sua sensibilidade, por tudo! Na verdade, é muito difícil colocar em palavras o quanto sou grata por ter vocês dois como meus pais, agradeço a Deus todos os dias por ter colocado vocês na minha vida!

Ao meu irmão Lucas, por ser tão especial, por todo seu amor e compreensão, por me ouvir sempre, por me dar conselhos, por desenhar sempre para mim, pelo seu sorriso inocente, pelo seu abraço forte, pelos filmes que assistimos, pelo tempo jogando vídeo game que me distraía, pela sua inteligência, pela sua paciência, por ser meu irmão querido!

A Fernanda Crunfli, pela grande amizade e companheirismo, pelas risadas e choros, por me ouvir, por me dar apoio, pela sua risada, pelos seus conselhos, por ter me ajudado em todos sentidos da minha vida, pelas caronas, pelos estresses que passamos juntas, por ser justa, por querer sempre o meu melhor, enfim uma linda amizade que vou levar para vida.

A Fernanda Prieto, pela amizade e conversas, pelas caronas, por ter me ajudado em um momento delicado da minha vida, pelo seu jeito de ser, pelos pastéis de sonho de valsa, por me ajudar na elaboração da dissertação.

A técnica Andressa Costa, pela sincera amizade, pelos almoços, pelas conversas, pelos conselhos, pela paciência, pela ajuda em tudo que precisei, pela dedicação, pelo café maravilhoso e por sempre se preocupar com o correto andamento do laboratório.

Ao professor Luiz R. G. Britto, pela sua colaboração com o laboratório, pela sua paciência e atenção, por ter feito parte da minha banca de qualificação do Mestrado, no qual me auxiliou em vários aspectos desse projeto.

Ao técnico do laboratório do professor Britto, Adilson, pelo auxílio em diversos procedimentos e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao meu amigo Daniel, que realizamos a prova de ingresso juntos e começamos essa jornada com muita amizade, cafés, abraços, desabafos e por sempre tentar me ajudar.

A Priscila, Débora e Cecília pela amizade, conversas, jantares, conselhos e descontrações que com certeza tornaram essa caminhada mais leve e descontraída.

A Gabrielle, melhor IC que tivemos neste período, pessoa do bem, simpática, verdadeira, inteligente, dedicada. Obrigada pela amizade, conversas e simplicidade.

Aos meus avós, tias, tios e primos que estavam presente neste momento da minha vida.

Aos meus amigos Amanda, Marlene, Fabiane, Tatiane e Ricardo, que acompanharam e me deram todo o apoio e paciência nessa trajetória.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Obrigada!!!

“O que tem que ser tem muita força”

Guimarães Rosa

RESUMO

VRECHI, T. A. M. **O potencial terapêutico de compostos canabinoides em um modelo *in vitro* de morte neuronal.** 2016. 82 f. (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A neurodegeneração é o resultado da destruição progressiva e irreversível dos neurônios no sistema nervoso central, apresentando causas desconhecidas e mecanismos patológicos não totalmente elucidados. Fatores como a idade, o aumento da formação de radicais livres e/ou estresse oxidativo, defeito no metabolismo energético, a inflamação e acúmulo de elementos neurotóxicos e de proteínas malformadas no lúmen do retículo endoplasmático (RE) contribuem para o desenvolvimento dos processos neurodegenerativos. O sistema canabinoide tem sido proposto como neuroprotetor em diversos modelos de neurodegeneração como hipóxia aguda e epilepsia, isquemia cerebral, lesão cerebral e modelos de estresse oxidativo. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar o papel do sistema canabinoide em uma linhagem de neuroblastoma (Neuro 2a) submetida a condições de estresse oxidativo (H₂O₂), inflamação (LPS) e estresse do RE (tunicamicina), avaliando parâmetros de viabilidade celular e vias de sinalização envolvidas. Nossos resultados mostram que o agonista canabinoide ACEA foi capaz de proteger as células da morte celular causada pela inflamação e pelo estresse de retículo endoplasmático, mas não pelo estresse oxidativo. Esse efeito neuroprotetor exercido pelo ACEA parece pelo menos em parte ocorrer via receptor CB1 no modelo de inflamação e ser independente deste receptor no modelo de estresse de RE. Os efeitos neuroprotetores observados envolveram a modulação dos níveis de proteínas pré-apoptóticas, CHOP e Caspase 12, e da proteína relacionada à sobrevivência celular ERK 1/2. Nossos dados sugerem um papel neuroprotetor do sistema canabinoide em mecanismos relacionados aos processos neurodegenerativos e propõem a manipulação desse sistema como possível alvo terapêutico.

Palavras-Chave: Receptor CB1. Canabinoide. Neuroproteção. Estresse de retículo endoplasmático. Neuroinflamação.

ABSTRACT

VRECHI, T. A. M. **The therapeutic potential of cannabinoid compounds in an *in vitro* model of neuronal death**. 2016. 82 p Master thesis (Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Neurodegeneration is the result of progressive and irreversible destruction of neurons in the central nervous system, with unknown causes and pathological mechanisms not fully elucidated. Factors such as age, increased formation of free radicals and/or oxidative stress, defects in energetic metabolism, inflammation and accumulation of neurotoxic factors and misfolded proteins in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) contribute to the development of neurodegenerative processes. The cannabinoid system has been proposed as neuroprotector in several models of neurodegeneration such as acute hypoxia and epilepsy, cerebral ischaemia, brain injury and oxidative stress models. This work aimed to investigate the role of the cannabinoid system in a neuroblastoma line (Neuro 2a) submitted to oxidative stress (H₂O₂), inflammation (LPS) and ER stress (thapsigargin) conditions, assessing cell viability parameters and signaling pathways involved. Our results show that the ACEA cannabinoid agonist was able to protect cells from cell death caused by inflammation and ER stress, but not from oxidative stress. This neuroprotective effect exerted by ACEA appears to occur at least in part via the CB1 receptor in inflammation model and it seems to be independent of this receptor in the ER stress model. The neuroprotective effects observed involved the modulation of the levels of pre-apoptotic proteins CHOP and Caspase 12 and the cell survival related protein ERK 1/2. Our data suggest a neuroprotective role of the cannabinoid system in mechanisms related to neurodegenerative processes and propose it as possible therapeutic target.

Keywords: CB1 receptor. Cannabinoid. Neuroprotection. Endoplasmic reticulum stress. Neuroinflammation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ativação da via pró-apoptótica UPR induzida por estresse de RE.. 24
- Figura 2** - Mecanismo de ação dos endocanabinoides. 27
- Figura 3** - Curva concentração-resposta de H₂O₂, diluído em meio de cultivo sem piruvato, em linhagem de células Neuro 2a. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT após 3 e 6 horas de exposição. 38
- Figura 4** - Curva concentração-resposta de LPS em linhagem de células Neuro 2a. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT após 3, 6 e 12 horas de exposição. 39
- Figura 5** - Curva concentração-resposta de tunicamicina em linhagem de células Neuro 2a. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT após 3, 6 e 12 horas de exposição. 40
- Figura 6** - Curva concentração-resposta de ACEA em linhagem de células Neuro 2a. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT após 3 e 6 horas de exposição. 42
- Figura 7** - Curva concentração-resposta de AM 251 em linhagem de células Neuro 2a. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT após 3 (A) e 6 horas de exposição (B). 43
- Figura 8** - Tratamento da linhagem de células Neuro 2a com os compostos canabinoides, ACEA e AM 251, exposta ao H₂O₂. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT, após 3 (A) e 6 horas (B). 44
- Figura 9** - Tratamento da linhagem Neuro 2a com os compostos canabinoides, ACEA e AM 251, exposta ao LPS. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT, após 6 horas. 45
- Figura 10** - Tratamento da linhagem Neuro 2a com os compostos canabinoides, ACEA e AM 251, exposta ao LPS. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT, após 6 horas. 46
- Figura 11** - Tratamento da linhagem Neuro 2a com os compostos canabinoides, ACEA e AM 251, exposta à tunicamicina. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT, após 6 horas. 48
- Figura 12** - Níveis de fosforilação da proteína PKR, na linhagem Neuro 2a, após 5, 10, 15, 20 e 30 minutos de exposição à tunicamicina e ao LPS quantificadas por immunoblotting. 50

Figura 13 - Níveis de fosforilação da proteína eIF2 α , na linhagem Neuro 2a, após 5, 10, 15, 20 e 30 minutos de exposição à tunicamicina e ao LPS quantificadas por immunoblotting.	51
Figura 14 - Níveis de fosforilação da proteína ERK α , na linhagem Neuro 2a, após 5, 10 e 15 minutos de exposição à tunicamicina, ao LPS e ACEA quantificadas por immunoblotting.	52
Figura 15 - Expressão da proteína CHOP na linhagem Neuro 2a após 6 horas de tratamento com a tunicamicina e compostos canabinoides quantificadas por immunoblotting.	53
Figura 16 - Expressão da proteína caspase 12 na linhagem Neuro 2a após 6 horas de tratamento com a tunicamicina e compostos canabinoides quantificadas por immunoblotting.	55
Figura 17 - Expressão da proteína CHOP na linhagem Neuro 2a após 6 horas de tratamento com o LPS e compostos canabinoides quantificadas por immunoblotting.	57
Figura 18 - Expressão da proteína caspase 12 na linhagem Neuro 2a após 6 horas de tratamento com o LPS e compostos canabinoides quantificadas por immunoblotting.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG - 2-araquidonoil-glicerol-éter

AARE - elemento de resposta a aminoácidos

ACEA – araquinodoil – 2 – cloroetilamina

AEA – anandamida

AM 251 - *N*- (Piperidina-1-il) -5- (4-iodofenil) -1- (2,4-diclorofenil) – 4 - metil- 1*H*-pirazole-3-carboxamida

AMT – transportador de anandamida

ASK1 - regulação de apoptose quinase 1

ATF6 - fator de ativação transcricional 6

ATF4 – fator de ativação transcricional 4

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CB – receptor canabinoide

CB1 – receptor canabinoide tipo 1

CB2 – receptor canabinoide tipo 2

CBD – canabidiol

CBN – canabinol

CHOP - C/EBP - proteína homóloga ao fator de transcrição C/EBP

DA – Doença de Alzheimer

DH – Doença de Huntigton

DMEM - dulbecco MEM

DMSO – dimetilsulfóxido

DP – Doença de Parkinson

DTT – ditionitreitol

eIF2 α - subunidade α do fator de iniciação da tradução eucariótica-2

ERK – quinase regulada por sinal extracelular

ERN – espécie reativa de nitrogênio

ERO – espécie reativa de oxigênio

ERSE - elemento de resposta ao estresse de RE

FAAH – enzima hidrolase de amida de ácido Graxo

GABA – ácido gaba-aminobutírico

GP – globo pálido

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HO₂ - hidroperoxila

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

IL-1 β – Interleucina-1 β

INF- γ – Interferon- γ

IRE1 - proteína 1 dependente de inositol

JNK - c-Jun N-terminal quinase

LPS – lipopolissacarídeo

MAP quinase – proteínas quinases ativadas por mitógeno

MGL – monoacilglicerol lipase

MTT - brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

Neuro 2a – neuroblastoma 2a

NF- κ B – fator nuclear *kappa* B

O₂ – superóxido

OH - hidroxila

PERK ou PKR - proteína quinase do retículo endoplasmático semelhante à proteína quinase dependente de RNA

RE – Retículo Endoplasmático

SN – substância negra

SNC – sistema nervoso central

TASK1 – canal sensível ao potássio

TNF- α – fator de necrose tumoral α

TRAF2 - fator associado ao receptor de necrose tumoral 2

TRPV1 – receptor valinóide de potencial transiente tipo 1

UPR – *Unfolded Protein Response* (resposta a proteínas mal dobradas)

USP – Universidade de São Paulo

Δ^9 -THC - Δ^9 -tetrahydrocannabinol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Aspectos Gerais.....	17
1.2 Doenças Neurodegenerativas	17
1.3 Estresse oxidativo e morte celular	18
1.4 Neuroinflamação.....	20
1.5 Estresse de Retículo Endoplasmático	21
1.6 Sistema Canabinoide.....	24
1.6.1 Mecanismo de ação do sistema canabinoide.....	26
1.6.2 Sistema canabinoide e neuroproteção.....	27
2 JUSTIFICATIVA.....	29
3 OBJETIVO	30
3.1 Objetivos Específicos.....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Cultivo da linhagem Neuro 2a	31
4.2 Tratamentos	31
4.2.1 Curvas concentração-resposta de H ₂ O ₂ , LPS e tunicamicina.....	31
4.2.2 Curvas concentração-resposta de ACEA e AM 251.....	32
4.2.3 Indução de toxicidade por H ₂ O ₂ , LPS, tunicamicina e tratamento com os compostos canabinoides ACEA e AM 251	33
4.2.4 Ensaio colorimétrico MTT – análise de viabilidade celular.....	33
4.2.5 Tratamentos para os ensaios de immunoblotting.....	34
4.3 Immunoblotting	34
4.4 Análises estatísticas.....	35
5 RESULTADOS.....	37
5.1 Curva concentração-resposta de H ₂ O ₂	37
5.2 Curva concentração-resposta de LPS	38
5.3 Curva-concentração resposta de tunicamicina.....	39
5.4 Curva concentração-resposta de ACEA.....	41
5.5 Curva concentração-resposta de AM 251	42
5.6 Efeitos dos tratamentos com os compostos canabinoides sobre a viabilidade celular da linhagem Neuro 2a exposta ao H ₂ O ₂	43
5.7 Efeitos dos tratamentos com compostos canabinoides sobre a viabilidade celular da linhagem Neuro 2a exposta ao LPS	44
5.8 Efeitos dos tratamentos com compostos canabinoides sobre a viabilidade celular da linhagem Neuro 2a exposta à tunicamicina	46

5.9 Análise das proteínas relacionadas ao estresse de retículo endoplasmático.....	49
5.9.1 Decurso temporal da fosforilação da proteína p-PKR	49
5.9.2 Decurso temporal da fosforilação da proteína p-eIF2α	50
5.9.3 Decurso temporal da fosforilação da proteína p-ERK	51
5.9.4 Expressão da proteína CHOP após a exposição à tunicamicina	52
5.9.5 Expressão da proteína caspase 12 após a exposição à tunicamicina	53
5.9.6 Expressão da proteína CHOP após a exposição ao LPS	56
5.9.7 Expressão da proteína caspase 12 após a exposição ao LPS.....	57
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS*	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

A neurodegeneração apresenta causas e mecanismos patológicos desconhecidos ou que ainda não foram totalmente elucidados. Sendo assim, essas patologias não possuem cura definitiva e os tratamentos desenvolvidos até o momento são à base de medicamentos que visam reverter, controlar ou diminuir os sintomas causados pela neurodegeneração (KAR et al., 2004).

Há inúmeras hipóteses propostas para explicar as possíveis causas das doenças neurodegenerativas, porém os dados são ainda muito conflitantes (GRUNDY; RABUFFETTI; BELTRAMO, 2001). No entanto, estudos revelam que o estresse oxidativo, a neuroinflamação e o estresse de retículo endoplasmático podem estar envolvidos no processo de desenvolvimento dessas doenças (FLOYD, 1999; KAR et al., 2004; YOSHIDA, 2007).

Diante deste contexto, diversos estudos têm investigado o papel do sistema canabinoide nas doenças neurodegenerativas e sugerem uma ação neuroprotetora dos compostos canabinoides em modelos de neurotoxicidade e neuroinflamação (GRUNDY; RABUFFETTI; BELTRAMO, 2001; PANIKASHVILI et al., 2001).

1.2 Doenças Neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (DA), a Doença de Parkinson (DP) e a Doença de Huntington (DH), são definidas pela perda progressiva de uma população específica de neurônios no sistema nervoso central (SNC). Dependendo da gravidade e do grupo de neurônios afetados, o indivíduo pode apresentar perda das funções fisiológicas, motoras e da capacidade cognitiva (KAR et al., 2004; MATTSON, 2004).

Na DA, por exemplo, a degeneração dos neurônios localizados no hipocampo, córtex entorrinal, amígdala, prosencéfalo basal e algumas regiões do córtex, leva ao comprometimento das funções cognitivas e problemas emocionais (WISCHIK et al., 1992) enquanto que na DP a destruição de neurônios dopaminérgicos localizados na substância negra, leva aos sintomas motores típicos da doença como os tremores em repouso, rigidez muscular e bradicinesia (LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002). Já os

pacientes com a DH apresentam movimentos motores involuntários e os neurônios comprometidos nesta doença estão localizados no estriado e córtex (REINER et al., 1988).

A neurodegeneração ainda é um fenômeno complexo que envolve vários mecanismos diferentes dos quais apenas alguns foram elucidados. No caso de doenças neurodegenerativas progressivas, há inúmeras hipóteses propostas para explicar as possíveis causas responsáveis pela neurodegeneração, porém os dados são ainda muito conflitantes (GRUNDY; RABUFFETTI; BELTRAMO, 2001). No entanto, um mecanismo que parece ser comum aos processos neurodegenerativos é a presença de componentes proteicos anormais que se acumulam no encéfalo, levando à perda neuronal. Alguns exemplos são o acúmulo do peptídeo β -amiloide nas placas senis e da proteína *Tau* hiperfosforilada nos emaranhados neurofibrilares na DA, o acúmulo da α -sinucleína nos corpos de Lewy na DP e os agregados de proteína huntingtina na DH (GLENNER; WONG, 1984; HUANG et al., 1998; SPILLANTINI et al., 1997;). Além disso, dados recentes da literatura sugerem que em condições patológicas, como nas doenças neurodegenerativas, ocorre um comprometimento da homeostase do retículo endoplasmático, o que leva a má formação e acúmulo de proteínas em seu lúmen, resultando no chamado estresse de retículo endoplasmático (HOOZEMANS et al., 2012; STEFANI et al., 2012; ZHANG; KAUFMAN, 2006).

Pesquisas ainda revelam que há outros aspectos que parecem contribuir para o aparecimento de processos neurodegenerativos, como por exemplo, os fatores genéticos e ambientais. Porém a idade parece ser um dos principais fatores de risco, aproximadamente após os 65 anos de idade, há uma queda na atividade cerebral e as células neuronais ficam mais susceptíveis aos processos degenerativos. Além disso, outros fatores como o aumento da formação de radicais livres e/ou estresse oxidativo, o defeito mitocondrial, o acúmulo de elementos neurotóxicos e o defeito no metabolismo energético podem contribuir para o desenvolvimento da neurodegeneração (KAR et al., 2004).

1.3 Estresse oxidativo e morte celular

Atualmente, com o aumento da expectativa de vida, há um grande interesse nas pesquisas relacionadas às doenças neurodegenerativas. Muitos destes estudos

mostram que o estresse oxidativo parece aumentar com a idade além de estar presente nos processos neurodegenerativos. Particularmente, as células neuronais são muito vulneráveis aos danos oxidativos devido ao seu alto consumo de oxigênio, baixos níveis de antioxidantes e capacidade reduzida de regeneração quando comparadas a outros tipos celulares. Assim, o estresse oxidativo pode causar sérios danos ao SNC e com isso contribuir com o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas (HALLIWELL, 2001; MANCUSO et al., 2007; VALKO et al., 2007).

O estresse oxidativo é consequência de uma alteração no balanço da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e nos mecanismos antioxidantes endógenos (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006). A elevação dos níveis de EROs acima da capacidade antioxidante da célula resulta em estresse oxidativo potencialmente citotóxico. Durante essas reações fisiológicas do metabolismo celular alguns reativos intermediários são formados, como superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2), hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio, apesar de não ser um radical livre, apresenta um efeito deletério, pois participa da reação que produz a hidroxila, tem vida longa e atravessa as camadas lipídicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A produção intracelular de EROs, em níveis fisiológicos, tem um importante papel para as células, pois atuam na regulação da sinalização celular e da expressão gênica (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006). Além disso, as EROs também são importantes sinalizadores intracelulares nas respostas inflamatórias, onde podem atuar como segundos mensageiros na ativação de fatores de transcrição nuclear, como o κ -B (NF- κ B), que coordena a expressão de vários genes relacionados a resposta inflamatória (FILIPPIN et al., 2008; OKTYABRSKY; SMIRNOVA, 2007).

Estudos evidenciam que o estresse oxidativo pode desencadear a morte por apoptose e até necrose dos neurônios, dependendo da intensidade do estímulo (FERNANDEZ; COTTER, 1994). Assim, inúmeros estudos têm utilizado o peróxido de hidrogênio como modelo de estresse oxidativo em células neuronais, para uma melhor compreensão da etiologia, dos mecanismos patológicos das doenças neurodegenerativas e o possível papel protetor que algumas substâncias possam apresentar (CALDERÓN et al., 1999; CHAN; MONG; YIN, 2009; CRISPO et al., 2010; PAN et al., 2010).

1.4 Neuroinflamação

Como já mencionado anteriormente, há inúmeras hipóteses para a etiologia das doenças neurodegenerativas, porém processos inflamatórios no sistema nervoso central parecem ser eventos importantes nessas condições. A reação inflamatória no cérebro depende da síntese de componentes inflamatórios dos neurônios e das células gliais, mas especialmente da micróglia (MCGEER; YASOJIMA; MCGEER, 2004).

A micróglia quando ativada pode induzir ou modular uma série de respostas celulares envolvidas na inflamação, além da fagocitose (HARRY; KRAFT, 2008). Uma das principais respostas celulares que ocorre na neuroinflamação crônica é o aumento da formação de citocinas “pró-inflamatórias”, como as interleucinas e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que também pode resultar em aumento da produção de EROs e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), contribuindo para a neurodegeneração (FLOYD, 1999; QUAN; SUNDAR; WEISS, 1994).

Estudos mostram que a micróglia está ativada durante o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a DP e a DA (MCGEER et al., 1998; MCGEER; YASOJIMA; MCGEER, 2004). Outros estudos observaram que no cérebro de pacientes com Alzheimer são predominantemente encontradas citocinas pró-inflamatórias em contraste com o cérebro normal (ROTHWELL; RELTON, 1993; VANDENABEELE; FIER, 1991) e que há o aparecimento de reações imunitárias locais em regiões acometidas pela DP (MCGEER; YASOJIMA; MCGEER, 2004). Além disso, outros estudos também têm confirmado a presença de mediadores inflamatórios no líquido cefalorraquidiano de pacientes com a DP assim como na substância negra de pacientes com esta patologia em análises *post-mortem* (GERHARD et al., 2006; MCGEER et al., 1998).

Alguns modelos experimentais de neuroinflamação têm sido utilizados na tentativa de compreender melhor os mecanismos do SNC durante os processos inflamatórios. Diversos estudos utilizam o lipopolissacarídeo (LPS) para induzir a neuroinflamação tanto *in vivo* quanto *in vitro* (QIN et al., 2007).

O LPS é uma endotoxina da parede de bactérias Gram-negativas conhecida por estimular o sistema imune através da ativação de macrófagos em tecidos periféricos e da micróglia no cérebro, onde são liberadas as citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (QUAN; SUNDAR, WEISS, 1994).

Pesquisas mostram que a injeção intracerebroventricular bilateral de altas doses de LPS (25-50 µg/ 20µl) aumenta significativamente o TNF-α em todas as regiões do cérebro de ratos (TYAGI et al., 2008). Outros estudos descrevem ainda que a ativação da micróglia causada pela exposição crônica ao LPS pode levar a uma perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos, tanto *in vivo* (2-10 dias, 0,1-10ng/mL de LPS) como *in vitro* (2-10 semanas, 5ng/h) (GAO et al., 2002; LING et al., 2006) e a injeção intraperitoneal de LPS (250 µg/Kg) em camundongos pode levar a um comprometimento da memória e acúmulo do peptídeo β-amiloide, características encontradas na DA (LEE, 2001).

Além disso, o LPS também é capaz de ativar o fator de transcrição NF-κB (MENG; LOWELL, 1997; QUAN; SUNDAR, WEISS, 1994) e estudos recentes mostraram que há um aumento em sua atividade em processos neurodegenerativos (PRELL et al., 2014). O NF-κB induz a expressão de genes pró-inflamatórios como as citocinas e interferons, que podem ativar as vias de sinalização relacionadas ao estresse de retículo endoplasmático através de mecanismos que ainda não estão totalmente elucidados, porém são importantes para a manutenção do estado de inflamação celular (DENG et al., 2004; HU et al., 2006; JIANG et al., 2003; KANEKO; NIINUMA; NOMURA, 2003; NGUYEN; HUANG; PICKETT, 2000; THOMAS; QU; PEDERSEN, 1995; SANO; REED, 2013). O interferon-γ (IFN-γ), por exemplo, é uma das citocinas pró-inflamatórias, que pode causar estresse de retículo endoplasmático e morte celular por apoptose, durante a inflamação do SNC, como demonstrado em cultura primária de oligodendrócitos de camundongos (LIN et al., 2005). Desta maneira, estudos recentes têm mostrado que os mecanismos envolvidos na inflamação e na resposta imune estão intimamente conectados com as vias de estresse de retículo endoplasmático (PRELL et al., 2014).

1.5 Estresse de Retículo Endoplasmático

Diversos estudos indicam que o estresse de retículo endoplasmático parece estar presente na patogênese de doenças neurodegenerativas, especialmente nas doenças de Alzheimer e Parkinson (YOSHIDA, 2007), porém sua contribuição para a morte neuronal ainda não está bem esclarecida (ZHAO; ACKERMAN, 2006).

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela intracelular, exclusiva de células eucariontes, onde ocorre a modificação pós-translacional, oligomerização e

dobramento das proteínas celulares. O RE é extremamente sensível a alterações da homeostase e apresenta rigorosos sistemas de controle para garantir que apenas proteínas com dobramento correto se direcionem ao complexo de Golgi (KAUFMAN, 1999). As proteínas que não foram corretamente processadas ou que apresentam uma má formação são retidas no RE, onde podem ser degradadas ou acumuladas (RUTKOWSKI, KAUFMAN, 2004).

A homeostase do RE é monitorada e mantida através de um programa coordenado chamado de resposta a proteínas malformadas (UPR - *unfolded protein response*), que pode ser ativada em resposta a uma perturbação da homeostase do cálcio, a neuroinflamação, ao estresse oxidativo, a hipóxia ou a privação de glicose. Esses eventos fisiopatológicos podem gerar um aumento na síntese de proteínas secretoras e aumento na expressão de proteínas malformadas no lúmen do RE, resultando no chamado estresse de RE (KITAMURA, 2008; ZHANG; KAUFMAN, 2006).

Até o momento três proteínas, localizadas na membrana do RE e pertencentes à UPR, foram identificadas como sensores do estresse de RE; a proteína quinase do RE semelhante à proteína quinase dependente de RNA (PERK ou PKR *RNA-dependent protein kinase-like ER kinase*), o fator de ativação transcricional 6 (ATF6 – *activating transcription factor 6*) e a proteína 1 dependente de inositol (IRE1 - *inositol-requiring protein-1*). A ativação da PERK (PKR) leva a fosforilação da subunidade α do fator de iniciação da tradução eucariótica-2 (eIF2 α – *α subunit of eukaryotic translation initiation factor-2*) que causa a inibição geral da síntese proteica (KITAMURA, 2008; SANO; REED, 2013). O estresse de RE também pode ativar proteínas relacionadas a apoptose, como a proteína homóloga ao fator de transcrição C/EBP (CHOP - C/EBP-homologous protein), via PERK ou ATF6, e a caspase 12 que está localizada na membrana do retículo endoplasmático através da interação com IRE1 e TRAF2 (fator associado ao receptor de necrose tumoral 2) (KITAMURA, 2008) **(Figura 1)**. Estudos mostram que a UPR ativa o fator de transcrição NF- κ B através de múltiplos mecanismos, possivelmente pelas vias PERK-eIF2 α , IRE1 e/ou ATF6 (FLAMMENT et al., 2012; HU et al., 2006; KANEKO; NIINUMA; NOMURA, 2003). Outras pesquisas mostram que a fosforilação da proteína eIF2 α é necessária e suficiente para ativar o NF- κ B, mas os mecanismos moleculares envolvidos não estão bem esclarecidos (DENG et al., 2004; JIANG et al., 2003).

A UPR pode ser também ativada experimentalmente através da inibição da glicosilação da porção *N*-terminal no processo de síntese de novas proteínas, ou pela depleção dos estoques de cálcio no RE, o que leva ao acúmulo de proteínas malformadas (RUTKOWSKI; KAUFMAN, 2004). Algumas substâncias químicas como a tunicamicina e tapsigargina são normalmente utilizadas para causar estresse de RE em culturas de células ou animais para fins experimentais (YOSHIDA, 2007). A tunicamicina, uma das substâncias mais utilizadas, é um antibiótico nucleosídico produzido pela bactéria *Streptomyces lysosuperficus* que inibe a formação de lipídios intermediários de *N*-acetilglucosamina, e deste modo bloqueia a glicosilação de novas proteínas sintetizadas no RE. Com isso, há um acúmulo de proteínas malformadas no lúmen do retículo endoplasmático e causa o estresse de RE (HICKMAN et al., 1977; TAKATSUKI et al., 1977).

O estresse do RE e a ativação de proteínas da UPR podem estar envolvidos em diversas condições patológicas como: hipóxia e isquemia, infecções virais, doenças metabólicas e doenças neurodegenerativas (KAUFMAN, 2002; LEE, 2001). Porém a relação entre as doenças neurodegenerativas e o acúmulo de proteínas malformadas ainda não está bem esclarecida, mas a ativação da UPR pode representar uma nova hipótese na patogênese destas doenças. Além disso, estas vias de sinalização relacionadas ao estresse de retículo endoplasmático podem ser novos alvos para possíveis agentes terapêuticos no tratamento de doenças neurodegenerativas (FORMAN; LEE; TROJANOWSKI, 2003).

Figura 1 - Ativação da via pró-apoptótica UPR induzida por estresse de RE.

A ativação da via PERK-eIF2 α induz a ativação do fator de transcrição ATF4. Consequentemente, o ATF4 aumenta a expressão de CHOP através da ativação do elemento de resposta a aminoácidos (AARE). A via ATF6 (e a via IRE1) pode aumentar a expressão de CHOP através da ativação de ERSE (elemento de resposta ao estresse de RE). O estresse de RE ativa a caspase 12 (ou caspase 4 em humanos) localizada na membrana do retículo endoplasmático através da interação com IRE1 e ao fator associado ao receptor de necrose tumoral 2 (TRAF2), o que leva as células a apoptose. A interação IRE1-TRAF2 também permite o recrutamento e ativação da via de sinalização de regulação de apoptose quinase 1 (ASK1) e também da c-Jun N-terminal quinase (JNK), que está envolvido numa variedade de sinalização pró-apoptótica. Fonte: Adaptado de Kitamura, 2008.

1.6 Sistema Canabinoide

O sistema canabinoide é um sistema de sinalização intercelular que modula diferentes funções neurobiológicas como atividade locomotora, memória, percepção de dor, ingestão de alimentos, reação inflamatória e desenvolvimento de câncer (GRUNDY; RABUFFETTI; BELTRAMO, 2001). Este sistema é constituído de endocanabinoides, seus receptores e suas enzimas de síntese e degradação (AMERI, 1999; DE PETROCELLIS; CASCIO; DI MARZO, 2004).

Até o momento, três endocanabinoides já foram bem descritos, a “anandamida” (etanol amida do ácido araquidônico), o éster 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) e o 2-araquidonoil-glicerol-éter (BASAVARAJAPPA, 2007; DI MARZO; MATIAS, 2005; FRIDE; SHOHAMI, 2002). Existem também os canabinoides exógenos, o mais conhecido é o princípio psicoativo da planta *Cannabis sativa* (maconha), o Δ^9 -THC (Δ^9 -tetrahydrocannabinol), que foi isolado em 1965. Outros compostos derivados da maconha incluem o canabidiol (CBD) e o canabinol (CBN) (DEWEY, 1986; MECHOULAM; GAONI, 1965).

Os efeitos dos compostos canabinoides, endógenos ou exógenos, dependem então dos receptores canabinoides (CB) (AMERI, 1999; DI MARZO et al., 1998; LUTZ, 2002). Os receptores canabinoides são membros típicos da família dos receptores acoplados a proteína G, e até o momento, sabe-se da existência de dois receptores canabinoides: o receptor canabinoide tipo 1 (CB1) (MATSUDA et al., 1990) e o receptor canabinoide tipo 2 (CB2) (MUNRO et al., 1993). No encéfalo, o receptor CB1 é encontrado em maiores densidades, nos núcleos da base (substância negra (SN), globo pálido (GP), núcleo entopeduncular e estriado lateral), no cerebelo, nas células piramidais do hipocampo, no giro denteado e nas camadas I e IV do córtex; e em densidades intermediárias no núcleo acumbens. Os receptores CB2 foram inicialmente encontrados em regiões do baço, tonsilas e células do sistema imune (AMERI, 1999), entretanto estudos mais recentes demonstram que há um aumento na expressão dos receptores CB2 em micróglia e astrócitos ativados em situações patológicas, como em processos inflamatórios no sistema nervoso central (FERNANDÉZ-RUIZ et al., 2000).

Além disso, há evidências que sugerem a existência de outros alvos da ação dos canabinoides além dos receptores anteriormente citados, como por exemplo, a anandamida também pode se ligar aos receptores vaniloides de potencial transiente do tipo 1 (TRPV1) e ao TASK-1 (canal de potássio) (DI MARZO; MATIAS, 2005; LUTZ, 2002; ROSS, 2003; VAN DER STELT; DI MARZO, 2004).

1.6.1 Mecanismo de ação do sistema canabinoide

Os endocanabinoides, de modo geral, são sintetizados por neurônios pós-sinápticos após o influxo de cálcio e por consequência ativação da fosfolipase D (anandamida) e a diacilglicerol lipase (2-AG), que convertem os fosfolípidos em endocanabinoides (EGERTOVÁ, 1998). Assim os canabinoides endógenos são liberados por neurônios pós-sinápticos após uma estimulação, e agem no receptor CB1 de neurônios pré-sinápticos, resultando em uma redução da liberação de outros neurotransmissores, como o GABA (ácido gama-aminobutírico) e o glutamato (FREUND; KATONA; PIOMELLI, 2003; HASHIMOTODANI; OHNO-SHOSAKU; KANO, 2007). Quando os endocanabinoides se ligam aos receptores CB1 ocorre uma série de mecanismos intracelulares característicos dos receptores acoplados à proteína $G_{i/o}$ e três eventos importantes acontecem (1) inibição da adenil ciclase, levando a uma diminuição dos níveis de AMPc intracelular e da proteína quinase A; (2) estimulação de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP quinases); (3) inibição de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo N e P/Q, e estimulação de canais de K^+ tipo A resultando em uma diminuição do influxo de cálcio e aumento no efluxo de potássio (DE PETROCELLIS; CASCIO; DI MARZO, 2004; DI MARZO et al., 1998).

Os canabinoides endógenos para serem inativados necessitam de uma molécula transportadora de membrana, o transportador de anandamida da membrana celular (AMT), no qual leva a anandamida para dentro das células para que aconteça a degradação enzimática intracelular realizada pela enzima amido hidrolase de ácido graxo (FAAH - *fatty acid amide hydrolase*). O AMT também transporta o 2-AG e em seguida sofre a degradação enzimática intracelular pela monoacilglicerol lipase (MGL - *monoacylglyceride lipase*) ou pela FAAH (BASAVARAJAPPA, 2007; FRIDE; SHOHAMI, 2002; SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010;) (**Figura 2**).

Figura 2 - Mecanismo de ação dos endocanabinoides.

Endocanabinoides são sintetizados e liberados através da membrana de neurônios pós-sinápticos após o influxo de cálcio (1). Os receptores CB₁, localizados nos neurônios pré-sinápticos, são ativados pelos endocanabinoides (2). A anandamida (AEA) e o 2-AG são removidos da fenda sináptica por transportadores dos neurônios pós e pré-sinápticos, respectivamente (3). Uma vez dentro dos neurônios, a anandamida se liga ao TRPV1 (com consequências opostas à ativação dos receptores CB₁) e sofre hidrólise pela FAAH enquanto o 2-AG é hidrolisado pela MGL (4). Fonte: Adaptado de Saito; Wotjak; Moreira, 2010.

1.6.2 Sistema canabinoide e neuroproteção

Estudos sugerem a participação de endo e/ou exocanabinoides e dos receptores em diversos modelos de neurotoxicidade e neuroinflamação, apresentando propriedades neuroprotetoras (FERNANDÉZ-RUIZ et al., 2000; GILBERT et al., 2007; GRUNDY; RABUFFETTI; BELTRAMO, 2001; PANIKASHVILI et al., 2001; PARMENTIER- BATTEUR et al., 2002; RAMOS et al., 2002; VAN DER STELT; DI MARZO, 2004; VAN DER STELT, 2001). Os dados sugerem que a ação neuroprotetora do sistema canabinoide é ativada em resposta a diferentes estímulos que danificam as células nervosas (SAGREDO et al., 2007) em modelos de neurodegeneração como, hipóxia aguda e epilepsia (WALLACE et al., 2003), lesão cerebral (PANIKASHVILI et al., 2001) e estresse oxidativo (MARSICANO et al., 2003). Alguns estudos mostram, por exemplo, níveis elevados tanto de endocanabinoides como na expressão dos receptores CB₁ em modelos de lesões centrais em ratos e camundongos (HANSEN et al., 2001; PANIKASHVILI et al., 2001). Além disso, camundongos *knock-out* para o receptor CB₁ apresentam uma maior susceptibilidade

à neurodegeneração (MARSICANO et al., 2003; PARMENTIER-BATTEUR et al., 2002).

Com a descoberta da presença de receptores do sistema canabinoide em células do sistema imune, muitas pesquisas têm sido realizadas para uma melhor compreensão da função e do papel desses receptores em células imunológicas. Além disso, algumas evidências sugerem que os canabinoides possuem potentes efeitos imunomodulatórios, podendo modular tanto a função como a secreção de citocinas pelas células do sistema imune e que a proteção exercida pelo CB2 pode estar relacionada com o recrutamento, ativação e migração da micróglia para os locais acometidos pela inflamação. Com isso os canabinoides podem ser possíveis agentes terapêuticos para o tratamento de doenças inflamatórias (CROXFORD; YAMAMURA, 2005; ELJASCHEWITSCH et al., 2006; MOLINA-HOLGADO et al., 2007).

2 JUSTIFICATIVA

Diversos estudos têm sugerido a participação do sistema canabinoide em processos neuroprotetores em diferentes modelos experimentais de neurotoxicidade e neuroinflamação. No entanto, os mecanismos relacionados à neuroproteção desempenhada pelo sistema canabinoide ainda não estão bem elucidados e os dados da literatura ainda são conflitantes, já que diferenças como dose, tipo de agente, tempo de exposição, entre outras variáveis dos compostos canabinoides, podem gerar respostas opostas entre neuroproteção e neurotoxicidade (DI MARZO, 1998; FOWLER; ROJO; RODRIGUEZ-GAZTELUMENDI, 2010; GUZMÁN, 2003; SARNE et al., 2011; SARNE; MECHOULAM, 2005).

Dados anteriores do nosso laboratório sugerem a participação do sistema canabinoide em processos neurodegenerativos (CHAVES et al., 2008; CHAVES-KIRSTEN et al., 2013; MECHA et al., 2012; TORRÃO et al., 2012). Deste modo, uma vez que os mecanismos de estresse oxidativo, inflamação e estresse de retículo endoplasmático estão relacionados aos processos neurodegenerativos e que as vias de sinalização intracelular envolvidas nesses processos podem ser moduladas pela ativação do sistema canabinoide, o uso de modelos experimentais que tentem esclarecer essas relações pode colaborar para uma melhor compreensão sobre o papel do sistema canabinoide nos processos neurodegenerativos.

3 OBJETIVO

Avaliar o papel do sistema canabinoide em um modelo *in vitro* (linhagem de neuroblastoma) de estresse oxidativo, neuroinflamação e estresse do retículo endoplasmático, induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), lipopolissacarídeo (LPS) e tunicamicina, respectivamente, e as vias de sinalização envolvidas.

3.1 Objetivos Específicos

1. Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de H₂O₂, LPS, tunicamicina e dos compostos canabinoides (curvas concentração-resposta) em diferentes tempos (curva tempo-resposta) sobre a viabilidade celular.
2. Avaliar os efeitos dos tratamentos conjugados (H₂O₂ + canabinoides; LPS + canabinoides e tunicamicina + canabinoides) sobre a viabilidade celular.
3. Avaliar as proteínas relacionadas ao mecanismo de estresse de retículo endoplasmático e de sobrevida/morte celular do sistema canabinoide.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo da linhagem Neuro 2a

A linhagem celular utilizada neste projeto é um clone derivado de um neuroblastoma espontâneo de camundongo (KLEBE; RUDDLE, 1969), a Neuro 2a (ATCC; Richmond, VA, USA), que já tem sido utilizada pelo nosso grupo (BATINGA; ZÚÑIGA-HERTZ; TORRÃO, 2016). Essas células são amplamente utilizadas como modelo neuronal *in vitro* em estudos que investigam os processos de toxicidade e morte celular, inclusive os gerados pelo estresse oxidativo (CALDERÓN et al., 1999). Essas células também expressam o receptor canabinoide tipo 1 (CB1) (JORDAN et al., 2005).

As células foram mantidas em uma incubadora com atmosfera umidificada a 37 °C e 5% de CO₂ em meio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; #12800017, Gibco, Waltham, MA, USA), pH 7,4, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 U.I./mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina (Gibco). Para os ensaios de viabilidade celular, as células foram cultivadas em placas de 24 poços (0,4x10⁵/poço) e para os ensaios de *immunoblotting* em placas de 6 poços (2,5x10⁵/poço) ou em garrafas (1x10⁶).

4.2 Tratamentos

Após dois dias de cultivo as células foram expostas a diferentes concentrações dos agentes indutores de toxicidade celular, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Synth), o lipopolissacarídeo (LPS) e a tunicamicina (Sigma-Aldrich); e também dos compostos canabinoides ACEA (agonista do receptor CB1) e AM 251 (antagonista/agonista inverso do receptor CB1) (Tocris). Todos os tratamentos foram realizados em meio de cultivo sem soro fetal bovino.

Após 3, 6 e 12 horas da exposição as células foram analisadas pelo ensaio colorimétrico do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio; Amresco) como parâmetro quantitativo de viabilidade celular descrito no item 4.2.4.

4.2.1 Curvas concentração-resposta de H₂O₂, LPS e tunicamicina

As concentrações dos agentes indutores de toxicidade celular foram baseadas em dados anteriores do nosso laboratório e da literatura (AUAD, 2012; BATINGA;

ZÚÑIGA-HERTZ; TORRÃO, 2016 CALDERÓN et al., 1999; LINDEGREN et al., 2003; MECHA et al., 2012). Inicialmente foram testadas diferentes concentrações de H_2O_2 (50, 100, 250, 500, 750 μM e 1 mM), porém observamos uma grande variabilidade nos experimentos realizados com o H_2O_2 , o que não nos permitiu obter uma curva concentração-resposta consistente.

Consultando cuidadosamente a literatura, encontramos que o piruvato, um componente característico da composição dos meios de cultivo celular, apresenta um efeito protetor contra as espécies reativas de oxigênio em células de mamíferos (GIANDOMENICO et al., 1997). Desta maneira, novos experimentos de curva concentração-resposta foram realizados, porém em meio de cultivo DMEM sem o componente piruvato. As células foram cultivadas normalmente utilizando o meio de cultivo DMEM com piruvato e somente no momento dos tratamentos com o H_2O_2 o meio de cultivo DMEM sem piruvato foi utilizado. As concentrações de H_2O_2 utilizadas foram 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 μM e após 3 e 6 horas de exposição seguiu-se o protocolo de análise da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico MTT, descrito no item 4.2.4.

As curvas concentração-resposta para a tunicamicina e LPS foram realizadas utilizando o meio de cultivo DMEM com piruvato. As células foram expostas as concentrações de 20, 30, 45, 60 e 75 $\mu\text{g/mL}$ de LPS e as concentrações de 1, 3, 5, 8 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de tunicamicina. Após 3, 6 e 12 horas de exposição os ensaios colorimétricos MTT foram realizados para análise da viabilidade celular.

4.2.2 Curvas concentração-resposta de ACEA e AM 251

Para avaliar uma possível toxicidade dos compostos canabinoides na linhagem Neuro 2a, as células foram expostas ao agonista do receptor CB1, ACEA, nas concentrações de 0,5; 1; 1,5 e 2 μM nos períodos de 3 e 6 horas. E também ao antagonista/agonista inverso do receptor CB1, AM 251, nas concentrações de 1; 3; e 10 μM no período de 3 horas e de 1; 3; 4,5; 6 e 10 μM no período de 6 horas. Após os tratamentos seguiu-se com o ensaio colorimétrico MTT para análise da viabilidade celular. O veículo utilizado para a diluição dos compostos canabinoides foi o etanol, que foi utilizado como o grupo controle nos experimentos.

4.2.3 Indução de toxicidade por H₂O₂, LPS, tunicamicina e tratamento com os compostos canabinoides ACEA e AM 251

Após a análise das curvas concentração-resposta dos agentes indutores de toxicidade celular, as concentrações que apresentaram entre 30-50% de morte celular foram escolhidas para os tratamentos conjugados com os compostos canabinoides.

Os tratamentos conjugados de H₂O₂ e compostos canabinoides foram realizados nos períodos de 3 e 6 horas, nas concentrações 40 e 20 µM de H₂O₂, respectivamente, e os compostos canabinoides nas concentrações de 2 µM de ACEA e 3 µM de AM 251. Para os tratamentos conjugados com a tunicamicina ou LPS e compostos canabinoides o intervalo de tempo avaliado foi de 6 horas. As concentrações utilizadas para os tratamentos conjugados de LPS e compostos canabinoides foram utilizadas as concentrações de 60 µg/mL de LPS; 0,5, 1, 1,5 e 2 µM de ACEA e 4,5 µM de AM 251. Já para os tratamentos conjugados com a tunicamicina e compostos canabinoides foram utilizadas as concentrações de 8 µg/mL de tunicamicina; 1,5 e 2 µM de ACEA; 3 e 6 µM de AM 251.

Após os respectivos períodos de tratamento todos os experimentos foram avaliados pelo ensaio colorimétrico MTT para análise de viabilidade celular, descrito a seguir.

4.2.4 Ensaio colorimétrico MTT – análise de viabilidade celular

O ensaio colorimétrico do MTT se baseia na habilidade de células viáveis de converter o sal tetrazólio (cor amarelo) em cristais de formazan (coloração púrpura). Assim, a quantidade de formazan formada se correlaciona diretamente com o número de células metabolicamente ativas. Esse método tem sido amplamente utilizado como parâmetro quantitativo de viabilidade celular (LIU et al., 1997).

Após os diferentes tratamentos e períodos o meio de cultivo foi removido e a solução de MTT (concentração final de 0,5 mg/mL) em DMEM sem soro foi adicionada às células. As células então foram incubadas por 3 horas a 37 °C no escuro. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan formados foram solubilizados com DMSO (dimetilsulfóxido) e a absorbância medida a 550 nm em espectrofotômetro para microplacas (BioTek, Winooski, VT, USA).

A condição experimental foi reproduzida em triplicatas para cada experimento, em 3 a 6 experimentos independentes. A média do controle (grupo tratado com

veículo) foi realizada para cada placa e os valores obtidos para as condições experimentais foram apresentados como porcentagem (razão da porcentagem de cada grupo/média da porcentagem do controle).

4.2.5 Tratamentos para os ensaios de immunoblotting

As células foram tratadas com tunicamicina (8 µg/mL) e LPS (60 µg/mL) nos períodos de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos, e em seguida foi avaliada a fosforilação das proteínas PKR e eIF2α, relacionadas ao estresse de retículo endoplasmático.

Para avaliarmos a participação do sistema canabinoide, as células foram tratadas com o agonista CB1, ACEA, na concentração de 2 µM, nos intervalos de tempo de 5, 10 e 15 minutos, para a análise dos níveis de fosforilação da proteína ERK 1/2 pelo método de *immunoblotting*. A fosforilação da proteína ERK 1/2 da família das MAPKs está presente nas vias de sinalização relacionadas à proliferação, diferenciação e morte celular; que podem ser moduladas pelo sistema canabinoide (TURU; HUNYADY, 2010).

As proteínas CHOP e caspase 12 também foram analisadas pelo método de *immunoblotting*, porém após 6 horas de tratamento com a tunicamicina (8 µg/mL) e compostos canabinoides (ACEA 2 µM e AM 251 3 µM); e LPS (60 µg/mL) e compostos canabinoides (ACEA 1,5 µM e AM 251 4,5 µM). A tunicamicina (8 µg/mL) foi utilizada como controle positivo de estresse de RE no experimento com o LPS.

4.3 Immunoblotting

Após o período dos tratamentos descrito acima, as células foram lavadas com PBS gelado, coletadas e homogeneizadas em tampão de extração (Tris pH 7,4, 1M; glicerol 10%, 1% de Nonidet P- 40; um coquetel de inibidores de proteases, Roche; Mannheim, Germany) junto com os inibidores de fosfatases (fluoreto de sódio 2mM; ortovanadato de sódio 100mM e pirofosfato de sódio 1M, Sigma-Aldrich; St. Louis, USA). Os homogeinados foram centrifugados a 12.000 rpm por 20 minutos a 4 °C em uma centrífuga modelo 5804R (Eppendorf; Hamburgo, Alemanha) e a concentração proteica do sobrenadante determinada utilizando uma solução para ensaio colorimétrico (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Amostras dos sobrenadantes contendo 30-50 µg de proteína total foram tratadas com tampão Laemmli (Bio-Rad) contendo DTT (ditiotretitol) e submetidas à eletroforese em géis de acrilamida a 12% e eletro-

transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando um sistema de transferência (Trans-Blot cell system; Bio Rad). Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio contendo 5% de albumina em salina tamponada contendo Tween 20 (TTBS; 0,01 M de Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,05% de Tween 20) durante pelo menos duas horas sob leve agitação. Após esse período, as membranas foram lavadas três vezes de 10 minutos com TTBS e incubadas a 4 °C, sob leve agitação, “overnight” com os seguintes anticorpos primários: um anticorpo policlonal de coelho anti-phospho-ERK (Cell Signalling), um anticorpo policlonal de coelho anti-phospho-PKR (Sigma-Aldrich), um anticorpo monoclonal de coelho anti-phospho-eIF2 α (Cell Signalling), um anticorpo monoclonal de camundongo anti-CHOP (Cell Signalling) e um anticorpo policlonal de coelho anti-caspase 12 (Cell Signalling) diluídos a 1:1.000 em TTBS. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes de 10 minutos com TTBS e incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo conjugados com peroxidase (Amersham Biosciences; Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) diluídos a 1:10.000 em solução de TTBS. Novamente as membranas foram lavadas por três vezes de 10 minutos em TTBS e a ligação específica do anticorpo com a proteína analisada foi revelada com um sistema de imunodeteção quimioluminescente, no qual foi utilizado o luminol, o ácido p-cumárico e o H₂O₂. Finalmente, as bandas foram analisadas quanto à densidade óptica da imunorreatividade pelo programa Image Studio Digits (versão 4.0) e os dados obtidos foram submetidos à análise estatística explicada mais adiante.

Como controle da quantidade de proteína aplicada nos géis utilizou-se um anticorpo monoclonal de camundongo contra a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, Santa Cruz) nas mesmas membranas, seguindo-se o mesmo protocolo de incubação descrito acima. Após a normalização com GAPDH, o valor obtido para todos os grupos foi dividido pela média do controle e multiplicado por 100 para a obtenção das porcentagens.

4.4 Análises estatísticas

Os dados quantitativos obtidos nas técnicas citadas acima foram submetidos à análise estatística com o uso do software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados obtidos com os ensaios de viabilidade celular e *immunoblotting* foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de uma via,

seguido do pós-teste de Dunnett ou Tukey. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) e o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado suficiente para mostrar as diferenças significativas em todos os dados analisados.

5 RESULTADOS

5.1 Curva concentração-resposta de H₂O₂

Inicialmente avaliamos a viabilidade celular da linhagem Neuro 2a, após 3 e 6 horas de exposição à diferentes concentrações de H₂O₂, diluído no meio de cultivo DMEM com piruvato (gráficos não apresentados). Devido à alta variabilidade encontrada nos experimentos não foi possível obter resultados significativos. Neste contexto, encontramos alguns trabalhos que mostraram um efeito protetor do piruvato (componente padrão do meio de cultivo celular) em modelos de estresse oxidativo desencadeado pelo H₂O₂ (DESAGHER; GLOWINSKI; PRE'MONT, 1997; GIANDOMENICO et al., 1997).

Assim, uma nova série de experimentos de curva concentração-resposta foi realizada utilizando o meio de cultivo DMEM sem piruvato ainda nos intervalos de 3 e 6 horas.

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para a toxicidade de diferentes concentrações de H₂O₂ utilizando o meio de cultivo DMEM sem piruvato, na linhagem Neuro 2a, são mostrados na **Figura 3**. Observamos que após 3 horas de exposição às concentrações de 10 e 20 µM de H₂O₂ não apresentaram toxicidade significativa, porém as concentrações de 30, 40, 50, 60 e 70 µM apresentaram uma diminuição na viabilidade de celular de 45,9% (p<0,001); 57,7%; 70,9%; 76,5% e 81,4% (p<0,0001), respectivamente, quando comparada ao grupo controle (**Figura 3A**). Após 6 horas, apenas a concentração de 10 µM de H₂O₂ não se mostrou tóxica, porém as concentrações de 20, 30, 40, 50, 60 e 70 µM apresentaram uma diminuição na viabilidade celular de 36,5% (p<0,01); 31,8% (p<0,05); 47,9% (p<0,001); 60,5%; 75,1% e 72% (p<0,0001), respectivamente, em relação ao grupo controle (**Figura 3B**). As concentrações escolhidas para os tratamentos conjugados com os compostos canabinoides foram de 40 µM de H₂O₂ para os tratamentos de 3 horas e 20 µM de H₂O₂ para os tratamentos de 6 horas.

Figura 3 - Curva concentração-resposta de H₂O₂, diluído em meio de cultivo sem piruvato, em linhagem de células Neuro 2a. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT após 3 e 6 horas de exposição.

Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de quatro experimentos independentes. Os asteriscos denotam o nível de significância; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs grupo controle - CTL (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Dunnet).

5.2 Curva concentração-resposta de LPS

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para a toxicidade de diferentes concentrações de LPS na linhagem Neuro 2a são mostrados na **Figura 4**. A exposição ao LPS diminui gradualmente a viabilidade celular de maneira concentração-dependente. Podemos observar que após 3 horas de exposição (**Figura 4A**), as concentrações de 45 µg/mL, 60 µg/mL e 75 µg/mL de LPS apresentaram uma diminuição na viabilidade celular de 27,8% ($p < 0,001$); 37,9% e 54,5% ($p < 0,0001$), respectivamente. Após 6 horas (**Figura 4B**), as concentrações de 30 µg/mL, 45 µg/mL, 60 µg/mL e 75 µg/mL de LPS apresentaram uma diminuição de 16% ($p < 0,05$); 30,3%; 41,5% e 42,9% ($p < 0,0001$) na viabilidade celular. Finalmente, observamos uma diminuição de 27,7% ($p < 0,01$); 37% e 44% ($p < 0,001$) na viabilidade celular nas concentrações de 45 µg/mL, 60 µg/mL e 75 µg/mL, respectivamente, após 12 horas de exposição (**Figura 4C**). Todos os resultados obtidos foram em relação ao grupo controle (CTL). A partir desses resultados, optamos por utilizar o período de 6 horas e a concentração de 60 µg/mL de LPS para os experimentos subsequentes.

Figura 4 - Curva concentração-resposta de LPS em linhagem de células Neuro 2a. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT após 3, 6 e 12 horas de exposição.

Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de quatro experimentos independentes. Os asteriscos denotam o nível de significância; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs grupo controle - CTL (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Dunnet).

5.3 Curva-concentração resposta de tunicamicina

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para a toxicidade de diferentes concentrações de tunicamicina na linhagem Neuro 2a são mostrados na **Figura 5**. Podemos observar, na **Figura 5A**, que após 3 horas de exposição, apenas a concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou diminuição significativa na viabilidade celular, as concentrações de 1, 3, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram uma diminuição na

viabilidade celular de 16,5% ($p<0,05$), 20,7%, 19,3% ($p<0,01$) e 29,2% ($p<0,001$), respectivamente. Após 6 horas (**Figura 5B**), todas as concentrações apresentaram morte celular significativa, com diminuição na viabilidade celular de 6,7% ($p<0,05$); 17% ($p<0,001$); 28,1%; 35% e 37% ($p<0,0001$), nas concentrações de 1, 3, 5, 8 e 10 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Após 12 horas de exposição, apenas a menor concentração de tunicamicina (1 $\mu\text{g/mL}$) não apresentou diminuição na viabilidade celular. Já as concentrações de 3, 5, 8, e 10 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diminuição na viabilidade celular de 27,1%; 28,1% ($p<0,05$); 48,2% e 52,5% ($p<0,001$), respectivamente (**Figura 5C**). Todos os resultados obtidos foram em relação ao grupo controle (ETN). A partir desses resultados, optamos por utilizar o período de 6 horas e a concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$ de tunicamicina para os experimentos subsequentes.

Figura 5 - Curva concentração-resposta de tunicamicina em linhagem de células Neuro 2a. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT após 3, 6 e 12 horas de exposição.

Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de quatro experimentos independentes. Os asteriscos denotam o nível de significância; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs grupo controle - ETN (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Dunnet).

5.4 Curva concentração-resposta de ACEA

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para a toxicidade de diferentes concentrações de ACEA na linhagem Neuro 2a são mostrados na **Figura 6**. Nenhuma das concentrações estudadas (0,5; 1; 1,5 e 2 μ M) apresentou toxicidade, ou seja, não houve diminuição na viabilidade celular em nenhum dos grupos tratados com ACEA quando comparados ao grupo controle (ETN) ($p > 0,05$). Assim todas as concentrações foram utilizadas para os tratamentos conjugados.

Figura 6 - Curva concentração-resposta de ACEA em linhagem de células Neuro 2a. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT após 3 e 6 horas de exposição.

Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de quatro experimentos independentes. ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Dunnet.

5.5 Curva concentração-resposta de AM 251

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para a toxicidade de diferentes concentrações de AM 251 na linhagem Neuro 2a são mostrados na **Figura 7**. No tratamento de 3 horas, nenhuma das concentrações estudadas apresentou toxicidade, ou seja, não houve diminuição da viabilidade celular em nenhum dos grupos tratados com AM 251 quando comparados ao grupo controle (ETN) ($p > 0,05$). No entanto, no intervalo de 6 horas, a concentração de 10 µM apresentou uma diminuição na viabilidade celular de 33% ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle (ETN). A concentração escolhida para os tratamentos de 3 horas foi 3 µM e para os tratamentos de 6 horas foram escolhidas as concentrações de 3; 4,5 e 6 µM.

Figura 7 - Curva concentração-resposta de AM 251 em linhagem de células Neuro 2a. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT após 3 (A) e 6 horas de exposição (B).

Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de quatro experimentos independentes. Os asteriscos denotam o nível de significância, ** $p < 0,01$ vs grupo controle - ETN (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Dunnet).

5.6 Efeitos dos tratamentos com os compostos canabinoides sobre a viabilidade celular da linhagem Neuro 2a exposta ao H₂O₂

Após a escolha das concentrações de H₂O₂ (40 e 20 μ M, para os ensaios de 3 e 6 horas, respectivamente) e dos compostos canabinoides (ACEA 2 μ M e AM 251 3 μ M), o próximo passo foi realizar os tratamentos conjugados. Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para os tratamentos com os compostos canabinoides na linhagem Neuro 2a exposta ao H₂O₂ são mostrados na **Figura 8**. Após 3 horas de exposição, o H₂O₂ causou uma diminuição na viabilidade celular de 60% ($p < 0,0001$) e neste alto nível de toxicidade não foi possível observar nenhuma melhora na viabilidade celular produzida pelos tratamentos conjugados com os compostos canabinoides (**Figura 8A**). Já, após 6 horas de exposição, o H₂O₂ causou uma diminuição de 30% ($p < 0,001$) na viabilidade celular, enquanto que os grupos H₂O₂ + ACEA 2 μ M; H₂O₂ + AM 251 3 μ M e H₂O₂ + ACEA 2 μ M + AM 251 3 μ M apresentaram uma diminuição de 26% ($p < 0,01$); 36,8% e 49,4% ($p < 0,0001$), respectivamente, em relação com grupo controle (ETN). Neste mesmo período também não foi possível observar melhora na viabilidade celular após os tratamentos conjugados com os compostos canabinoides, porém observamos que o grupo tratado com ACEA (H₂O₂ +

ACEA 2 μM) apresentou uma melhora na viabilidade celular de 23,2% ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo H_2O_2 + ACEA 2 μM + AM 251 3 μM (**Figura 8B**).

Figura 8 - Tratamento da linhagem de células Neuro 2a com os compostos canabinoides, ACEA e AM 251, exposta ao H_2O_2 . Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT, após 3 (A) e 6 horas (B).

Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de seis experimentos independentes. Os asteriscos denotam o nível de significância; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs grupo controle – ETN; e & $p < 0,05$ grupo H_2O_2 + ACEA 2 μM vs o grupo H_2O_2 + ACEA 2 μM + AM 251 3 μM (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey).

5.7 Efeitos dos tratamentos com compostos canabinoides sobre a viabilidade celular da linhagem Neuro 2a exposta ao LPS

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para os tratamentos com os canabinoides na linhagem Neuro 2a exposta ao LPS são mostrados na **Figura 9**. Nosso primeiro passo foi avaliar os efeitos das diferentes concentrações de ACEA nas células expostas ao LPS. Observamos que o grupo LPS + ETN apresentou uma diminuição na viabilidade celular de 36,1% ($p < 0,001$); os grupos LPS + ACEA 0,5 μM e LPS + ACEA 1 μM , de 27,9% e 30% ($p < 0,01$), respectivamente, e o grupo LPS + ACEA 2 μM , de 38,2% ($p < 0,001$), quando comparados ao grupo controle (ETN). O grupo LPS + ACEA 1,5 μM não apresentou diminuição significativa na viabilidade celular quando comparado ao grupo controle (ETN), isso nos mostra que o tratamento com ACEA 1,5 μM foi capaz de prevenir a morte celular causada pelo LPS, onde

apresentou uma melhora de 25,7% ($p < 0,05$) na viabilidade celular quando comparado ao grupo LPS + ETN. A concentração de ACEA 1,5 μM foi escolhida para o experimento subsequente.

Figura 9 - Tratamento da linhagem Neuro 2a com os compostos canabinoides, ACEA e AM 251, exposta ao LPS. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT, após 6 horas.

Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de seis experimentos independentes. Os asteriscos denotam o nível de significância; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs grupo controle – ETN; # $p < 0,05$ grupo LPS + ETN vs grupo LPS + 1,5 μM ; e & $p < 0,05$ grupo LPS + 1,5 μM vs grupo LPS + ACEA 2 μM (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey).

Após a escolha da concentração de ACEA 1,5 μM , que apresentou melhora na viabilidade celular, os tratamentos conjugados com o antagonista CB1, AM 251 foram realizados. Observamos na **Figura 10** que os grupos LPS + ETN; LPS + AM 251 4,5 μM e LPS + ACEA 1,5 μM + AM 251 4,5 μM apresentaram diminuição na viabilidade celular de 40,1%, 51,9% e 57,6% ($p < 0,0001$), respectivamente, quando comparados ao grupo controle (ETN). Já, o grupo tratado com LPS + ACEA 1,5 μM preveniu a morte celular desencadeada pelo LPS, onde apresentou um aumento na viabilidade celular de 24,4% ($p < 0,01$) quando comparamos ao grupo controle (ETN). Além disso, os grupos LPS + AM 251 4,5 μM e LPS + ACEA 1,5 μM + AM 251 4,5 μM apresentaram uma diminuição na viabilidade celular de 36,1% e 41,9% ($p < 0,0001$), respectivamente quando comparados com o grupo tratado com ACEA (LPS e ACEA 1,5 μM).

Figura 10 - Tratamento da linhagem Neuro 2a com os compostos canabinoides, ACEA e AM 251, exposta ao LPS. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT, após 6 horas.

Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de seis experimentos independentes. Os asteriscos denotam o nível de significância; **** $p < 0,0001$ vs grupo controle (ETN); ## $p < 0,01$ grupo LPS + ETN vs grupo LPS + ACEA 1,5 μ M, e &&&& $p < 0,0001$ grupo LPS + ACEA 1,5 μ M vs grupo LPS + AM 251 4,5 μ M e LPS + ACEA 1,5 μ M + AM 251 4,5 μ M (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey).

5.8 Efeitos dos tratamentos com compostos canabinoides sobre a viabilidade celular da linhagem Neuro 2a exposta à tunicamicina

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para os tratamentos com os compostos canabinoides na linhagem Neuro 2a exposta a tunicamicina (T) são mostrados na **Figura 11**. Inicialmente começamos os tratamentos com as concentrações de 2 μ M de ACEA e 3 μ M de AM 251. Após 6 horas de tratamento o grupo T + ETN apresentou uma diminuição na viabilidade celular de 47% ($p < 0,0001$), o grupo T + ACEA 2 μ M, de 24% ($P < 0,01$) e os grupos T + AM 251 3 μ M e T + ACEA 2 μ M + AM 251 3 μ M de 38% ($p < 0,0001$) quando comparados ao grupo controle (ETN). Assim, podemos observar que o grupo tratado com o agonista CB1, ACEA na

concentração de 2 μM foi capaz de melhorar a viabilidade celular em 22% ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo T + ETN, ou seja, o ACEA 2 μM diminuiu os danos causados pela tunicamicina, porém não foi capaz de reverter totalmente esses danos, apenas parcialmente (**Figura 11A**).

O ACEA apresenta uma alta seletividade para os receptores CB1, sendo assim sua afinidade para ligação com os receptores CB1 é maior que a do antagonista CB1, AM 251. Neste contexto, resolvemos aumentar a concentração do AM 251 em uma proporção de 1:3 referente à concentração do ACEA, assim utilizamos a concentração de 6 μM para o AM 251 e avaliamos sua ação antagonista. Observamos na **Figura 11B**, que o grupo T + ETN apresentou uma diminuição na viabilidade celular de 37,2% ($p < 0,0001$); o grupo T + ACEA 2 μM , de 20,8% ($p < 0,01$) e os grupos T + AM 251 6 μM e T + ACEA 2 μM + AM 251 6 μM , de 36,2% e 32,7% ($p < 0,0001$), respectivamente, quando comparados ao grupo controle (ETN). Observamos que o grupo tratado com ACEA 2 μM foi capaz de aumentar a viabilidade celular em 16,5% ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo T + ETN, enquanto que os grupo tratados com AM 251 6 μM apresentaram o mesmo nível de toxicidade que o grupo T + ETN, quando comparados ao grupo controle (CTL). Isso nos mostra que o antagonista foi capaz de bloquear os receptores CB1, onde a ação neuroprotetora do ACEA não pode ser mais observado.

Decidimos também testar uma concentração menor do agonista CB1, ACEA, para avaliarmos seu papel neuroprotetor. Foi utilizado a concentração de 1,5 μM de ACEA e 4,5 μM de AM 251, seguindo a mesma proporção proposta para o antagonista no experimento anterior. Na **Figura 11C**, observamos que todos os grupos apresentaram uma diminuição significativa na viabilidade celular em aproximadamente 65% ($p < 0,001$) e o grupo tratado com ACEA 1,5 μM não foi capaz de prevenir a morte celular causada pela tunicamicina.

Figura 11 - Tratamento da linhagem Neuro 2a com os compostos canabinoides, ACEA e AM 251, exposta à tunicamicina. Viabilidade celular analisada pelo ensaio colorimétrico MTT, após 6 horas.

Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de seis experimentos independentes. Os asteriscos denotam o nível de significância; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs grupo controle (ETN) (Figuras A, B e C); # $p < 0,01$ grupo T + ETN vs grupo T + ACEA 2 μ M (Figuras A e B), e & $p < 0,0001$ grupo T + ACEA 2 μ M vs grupo T + AM 251 6 μ M (Figura B) (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey).

5.9 Análise das proteínas relacionadas ao estresse de retículo endoplasmático

Primeiramente foram avaliadas as proteínas p-PKR, p-eIF2 α após os tratamentos com a tunicamicina e LPS e a proteína p-ERK foi avaliada após os tratamentos com a tunicamicina, LPS e ACEA. As proteínas CHOP e caspase 12 foram avaliadas após 6 horas de tratamento com tunicamicina ou LPS e compostos canabinoides. Para cada quantificação são apresentadas figuras (gráficos) mostrando os valores de normalização (razão = valor absoluto obtido com a quantificação/média do valor absoluto do controle) ou de porcentagem.

5.9.1 Decurso temporal da fosforilação da proteína p-PKR

As análises quantitativas de *immunoblotting* para os níveis de fosforilação da proteína PKR são mostradas na **Figura 12**. Os resultados mostram que não houve variações nos níveis de fosforilação da proteína PKR após a exposição à tunicamicina (T) e ao LPS nos períodos de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos quando comparados ao grupo controle (ETN) ($p < 0,05$).

Figura 12 - Níveis de fosforilação da proteína PKR, na linhagem Neuro 2a, após 5, 10, 15, 20 e 30 minutos de exposição à tunicamicina e ao LPS quantificadas por imunoblotting.

Os dados representam a média da densidade óptica normalizadas com o GAPDH. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes. Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.9.2 Decurso temporal da fosforilação da proteína p-eIF2 α

As análises quantitativas de *immunoblotting* para os níveis de fosforilação da proteína eIF2 α são mostradas na **Figura 13**. Os resultados mostram que também não houve variações nos níveis de fosforilação da proteína eIF2 α após os insultos com a tunicamicina e LPS nos períodos de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos quando comparados ao grupo controle (ETN) ($p < 0,05$).

Figura 13 - Níveis de fosforilação da proteína eIF2 α , na linhagem Neuro 2a, após 5, 10, 15, 20 e 30 minutos de exposição à tunicamicina e ao LPS quantificadas por imunoblotting.

Os dados representam a média da densidade óptica normalizadas com o GAPDH. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes. Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste deTukey.

5.9.3 Decurso temporal da fosforilação da proteína p-ERK

As análises quantitativas de *immunoblotting* para os níveis de fosforilação da proteína ERK são mostradas na **Figura 14**. Os resultados mostram que houve uma diminuição de 67,7% ($p < 0,05$) nos níveis de fosforilação da proteína ERK após 5 minutos de exposição ao LPS quando comparamos ao grupo controle (ETN). Porém, observamos que no grupo tratado com ACEA 2 μ M houve aumento nos níveis de fosforilação da proteína ERK de 82,4% ($p < 0,05$) e 106,3% ($p < 0,01$), após 5 minutos de tratamento quando comparamos aos grupos tunicamicina (T) e LPS, respectivamente. Após 10 minutos também observamos um aumento nos níveis de fosforilação da proteína ERK de 99,4% e 119,9% ($p < 0,01$) no grupo tratado com ACEA 2 μ M comparado aos grupos tunicamicina e LPS, respectivamente. Não houve aumento ou diminuição significativa nos níveis de fosforilação da proteína ERK em nenhum dos grupos após 15 minutos de tratamento.

Figura 14 - Níveis de fosforilação da proteína ERK α , na linhagem Neuro 2a, após 5, 10 e 15 minutos de exposição à tunicamicina, ao LPS e ACEA quantificadas por immunoblotting.

Os dados representam a média da densidade óptica normalizadas com o GAPDH. Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes. Os asteriscos denotam o nível de significância; * $p < 0,05$ vs grupo controle (ETN) (5, 10 e 15 min); # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ grupos ACEA 2 μ M vs grupos T e LPS (5, 10 e 15 min) (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey).

5.9.4 Expressão da proteína CHOP após a exposição à tunicamicina

As análises quantitativas de *immunoblotting* para os níveis de expressão da proteína CHOP após a exposição à tunicamicina são mostradas na **Figura 15**. Os resultados mostram que houve aumento de 131,5% ($p < 0,05$), 200% ($p < 0,001$) e 179,5% ($p < 0,01$) na expressão da proteína CHOP nos grupos tunicamicina (T) + ETN, T + AM 251 3 μ M e T + ACEA 2 μ M + AM 251 3 μ M, respectivamente, quando comparados com o grupo controle (ETN). Podemos observar que houve uma diminuição na expressão da proteína CHOP de 148,5% ($p < 0,05$) no grupo tratado com ACEA (T + ACEA 2 μ M) quando comparado com o grupo tratado com o AM 251 (T + AM 251 3 μ M). Observamos também que houve uma diminuição na expressão de

CHOP no grupo T + ACEA 2 μ M quando comparado ao grupo tunicamicina (T) + ETN, porém este não foi estatisticamente significativo ($p=0,423$). No entanto, não há diferenças significativas entre o grupo controle (ETN) e o grupo tratado com ACEA (T + ACEA 2 μ M).

Figura 15 - Expressão da proteína CHOP na linhagem Neuro 2a após 6 horas de tratamento com a tunicamicina e compostos canabinoides quantificadas por imunoblotting.

Os dados representam a média da densidade óptica normalizadas com o GAPDH. Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de oito experimentos independentes. Os asteriscos denotam o nível de significância; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ vs grupo controle (ETN); # $p<0,05$ grupo T + ACEA 2 μ M vs grupo T + AM 251 3 μ M (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste deTukey).

5.9.5 Expressão da proteína caspase 12 após a exposição à tunicamicina

As análises quantitativas de *immunoblotting* para os níveis de expressão da proteína caspase 12 após a exposição à tunicamicina são mostradas na **Figura 16**. Foi analisada a clivagem da proteína caspase 12, já que esta está relacionada com a

ativação desta via pró-apoptótica. Os resultados mostram que houve aumento de 62,6% ($p<0,01$) e 46,9% ($p<0,05$) na expressão da proteína caspase 12 clivada nos grupos tunicamicina (T) + ETN e T + AM 251 3 μ M, respectivamente, quando comparados ao grupo controle (ETN). Observamos que os grupos tratados com ACEA; T + ACEA 2 μ M e T + ACEA 2 μ M + AM 251 3 μ M foram capazes de diminuir a expressão da proteína caspase 12 clivada em 94,4% ($p<0,0001$) e 68,5% ($p<0,001$), respectivamente, quando comparados ao grupo T + ETN. Podemos observar também que os grupos tratados com ACEA diminuíram a expressão da caspase 12 clivada em 78,7% ($p<0,001$) e 52,8% ($p<0,05$) quando comparados ao grupo tratado com o antagonista CB1, AM 251 (T + AM 251 3 μ M). Os grupos tratados com ACEA não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle (ETN), onde a expressão da proteína caspase 12 clivada retorna aproximadamente aos níveis do grupo controle (ETN). Desse modo, observamos que o tratamento com ACEA atenua a ativação desta proteína pró-apoptótica caspase 12 (**Figura 16A**). Não houve diferenças estatisticamente significativas quando avaliamos a razão entre a proteína caspase 12 clivada e a caspase 12 total entre os grupos (**Figura 16B**).

Figura 16 - Expressão da proteína caspase 12 na linhagem Neuro 2a após 6 horas de tratamento com a tunicamicina e compostos canabinoides quantificadas por imunoblotting.

Os dados representam a média da densidade óptica normalizadas com o GAPDH. Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de oito experimentos independentes (**A e B**). Os asteriscos denotam o nível de significância; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs grupo controle (ETN); #### $p < 0,0001$ grupo T + ETN vs T + ACEA 2 μ M; ### $p < 0,001$ grupo T + ETN vs grupo T + ACEA 2 μ M + AM 251 3 μ M; &&& $p < 0,001$ grupo T + ACEA 2 μ M vs grupo T + AM 251 3 μ M; \$ $p < 0,05$ grupo T + AM 251 3 μ M vs T + ACEA 2 μ M + AM 251 3 μ M (**A**) (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey).

5.9.6 Expressão da proteína CHOP após a exposição ao LPS

As análises quantitativas de *immunoblotting* para os níveis de expressão da proteína CHOP após a exposição ao LPS são mostradas na **Figura 17**. Neste experimento o grupo tunicamicina (T) + ETN foi utilizado como controle positivo do estresse de retículo endoplasmático. Desta forma, podemos observar que houve aumento de 133,5% ($p < 0,01$) na expressão da proteína CHOP no grupo tunicamicina (T) + ETN, quando comparado com o grupo controle (ETN), resultado já esperado. No entanto, não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas nos grupos LPS + ETN, LPS + ACEA 1,5 μ M, LPS + AM 251 4,5 μ M e LPS + ACEA 1,5 μ M + AM 251 4,5 μ M, quando comparados ao grupo controle (ETN). Porém observamos uma diminuição na expressão da proteína CHOP nos grupos LPS + ETN,

LPS + ACEA 1,5 μ M e LPS + AM 251 4,5 μ M de 87,8%; 83,3% e 91,5% ($p < 0,05$), respectivamente, quando comparados ao grupo tunicamicina (T) + ETN (controle positivo).

Figura 17 - Expressão da proteína CHOP na linhagem Neuro 2a após 6 horas de tratamento com o LPS e compostos canabinoides quantificadas por imunoblotting.

Os dados representam a média da densidade óptica normalizadas com o GAPDH. Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de quatro experimentos independentes. Os asteriscos denotam o nível de significância; ** $p < 0,01$ vs grupo controle (ETN); # $p < 0,05$ grupos LPS + ETN; LPS + ACEA 1,5 μ M; LPS + AM 251 4,5 μ M e LPS + ACEA 1,5 μ M + AM 251 4,5 μ M vs grupo tunicamicina (T) + ETN (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey).

5.9.7 Expressão da proteína caspase 12 após a exposição ao LPS

As análises quantitativas de *immunoblotting* para os níveis de expressão da proteína caspase 12 após a exposição ao LPS são mostradas na **Figura 18**. Neste experimento o grupo tunicamicina (T) + ETN também foi utilizado como controle positivo do estresse de retículo endoplasmático. Os resultados da caspase 12 clivada

mostram que houve aumento de 73,4% ($p<0,01$); 60,2%; 60,2%; 66% e 60,6% ($p<0,05$) na expressão da proteína caspase 12 clivada nos grupos tunicamicina (T) + ETN, LPS + ETN, LPS + ACEA 1,5 μ M, LPS + AM 251 4,5 μ M e LPS + ACEA 1,5 μ M + AM 251 4,5 μ M, respectivamente, quando comparados ao grupo controle (ETN). Porém não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas nos grupos LPS + ETN, LPS + ACEA 1,5 μ M, LPS + AM 251 4,5 μ M e LPS + ACEA 1,5 μ M + AM 251 4,5 μ M, quando comparados ao grupo tunicamicina (T) + ETN (controle positivo) (**Figura 18A**). Não houve diferenças estatisticamente significativas quando avaliamos a razão entre a proteína caspase 12 clivada e a caspase 12 total entre os grupos (**Figura 18B**).

Figura 18 - Expressão da proteína caspase 12 na linhagem Neuro 2a após 6 horas de tratamento com o LPS e compostos canabinoides quantificadas por imunoblotting.

Os dados representam a média da densidade óptica normalizadas com o GAPDH. Os dados são apresentados como a porcentagem de variação em relação aos controles. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de quatro experimentos independentes (**A e B**). Os asteriscos denotam o nível de significância; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs grupo controle (ETN) (**Figura A**) (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey).

6 DISCUSSÃO

No presente projeto foram utilizados três modelos de neurotoxicidade *in vitro*, através de estímulos que causam o estresse oxidativo, a inflamação e o estresse de retículo endoplasmático, para avaliar o possível papel neuroprotetor do sistema canabinoide. De modo geral, observamos que o agonista canabinoide ACEA foi capaz de proteger as células da linhagem de neuroblastoma (Neuro 2a) contra a morte celular causada pela inflamação e pelo estresse de retículo endoplasmático, porém não pelo estresse oxidativo. Esse efeito neuroprotetor exercido pelo ACEA parece pelo menos em parte ocorrer via receptor CB1 no modelo de inflamação, uma vez que o uso do antagonista do receptor reverte a neuroproteção gerada pelo agonista. Já no modelo de estresse de RE a proteção exercida pelo ACEA é independente do receptor CB1. Além disso, esses efeitos neuroprotetores parecem envolver a modulação dos níveis de proteínas pré-apoptóticas CHOP e Caspase 12 e da proteína relacionada à sobrevivência celular ERK 1/2.

A perda progressiva e irreversível dos neurônios no sistema nervoso central é uma característica das doenças neurodegenerativas, porém suas causas e mecanismos patológicos ainda são desconhecidos. No entanto, compreender os fatores que possam causar a progressão da degeneração celular no sistema nervoso central é de grande importância para uma possível descoberta da etiologia das doenças neurodegenerativas. Dentre estes fatores, a idade, o aumento da formação de radicais livres (estresse oxidativo), o acúmulo de elementos neurotóxicos, defeitos no metabolismo energético e causas genéticas podem contribuir para o desenvolvimento da morte neuronal (KAR et al., 2004).

Sendo assim, estudos têm utilizado diversos modelos de morte celular para compreender melhor seus mecanismos e descobrir novos alvos terapêuticos através da ação neuroprotetora que algumas substâncias podem desenvolver. A morte celular por estresse oxidativo, por exemplo, gerada por um aumento na oxidação proteica e peroxidação lipídica, parece estar relacionada com a presença de emaranhados neurofibrilares e de placas do peptídeo β -amiloide no encéfalo, características encontradas na DA (PERRY et al., 2000). Deste modo, diversos estudos utiliza o peróxido de hidrogênio como modelo de morte celular por estresse oxidativo tanto em modelos *in vitro* como *in vivo* (CALDERÓN et al., 1999; CHAN; MONG; YIN, 2009; CRISPO et al., 2010; PAN et al., 2010).

Iniciamos nosso estudo com o modelo *in vitro* (linhagem Neuro 2a) de estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Dados da literatura mostraram que somente altas concentrações de H_2O_2 , como 1 e 50mM, foram capazes de causar aproximadamente 50% de morte celular na linhagem Neuro 2a, após 4 horas de exposição (CALDERÓN et al., 1999). Porém, dados do nosso laboratório demonstraram que menores concentrações de H_2O_2 , como 250 e 40 μ M, já causaram níveis moderados de morte celular, na mesma linhagem celular, após 6 e 24 horas de exposição, respectivamente (AUAD, 2012; BATINGA; ZÚÑIGA-HERTZ; TORRÃO, 2016). Assim, baseado nas concentrações encontradas na literatura e nos dados do laboratório, uma curva concentração-resposta foi realizada, a fim de avaliarmos os efeitos do H_2O_2 em relação à viabilidade celular, porém nossos dados mostraram uma grande variabilidade em relação aos níveis de morte celular.

Consultando cuidadosamente a literatura, encontramos que o piruvato, componente padrão do meio de cultivo celular DMEM, protege os neurônios contra o H_2O_2 exógeno e endógeno, através de um mecanismo não enzimático, podendo ser transportado para dentro ou secretado pelas células através de um co-transportador específico, o H1 monocarboxilato, podendo atuar como captador intracelular e extracelular de H_2O_2 . Além disso, estudos sugerem que o efeito protetor do piruvato pode estar relacionado com a sua capacidade de reagir com o H_2O_2 formando acetato, água ou dióxido de carbono (DESAGHER; GLOWINSKI; PRE'MONT, 1997; LONG; HALLIWELL, 2009). Após este importante dado, optamos por realizar os experimentos de estresse oxidativo, induzido pelo H_2O_2 , utilizando o meio de cultivo DMEM sem o componente piruvato, na tentativa de diminuir a variabilidade dos resultados. Desta forma, a curva concentração-resposta se tornou mais consistente, diminui a variabilidade dos resultados e foi possível observar que sem a presença do piruvato, até menores concentrações de H_2O_2 causaram uma toxicidade celular significativa.

Os danos em células neuronais causados pelo estresse oxidativo, parecem aumentar a produção de endocanabinoides (MARSICANO et al., 2003; STELLA; SHWEITZER; PIOMELLI, 1997) e as células que não expressam os receptores CB1 são mais susceptíveis aos danos celulares (MARSICANO et al., 2003). Além disso, estudos sugerem que o sistema endocanabinoide tem um papel importante relacionado à neuroproteção após danos neuronais agudos como na isquemia e trauma, e também em casos crônicos, como os encontrados nas doenças neurodegenerativas (FOWLER et al., 2010). Em um modelo *in vivo* da DA induzida

pelo peptídeo β -amiloide em hipocampo de ratos, foi observado o aumento do endocanabinoide 2-AG, o que sugere a participação do sistema canabinoide neste modelo (VAN DER STELT et al., 2005). Desta forma, agonistas e antagonistas canabinoides têm sido utilizados em estudos de neurodegeneração para um melhor entendimento dos seus mecanismos. Estudos mostram que os compostos canabinoides podem tanto inibir como estimular a entrada de cálcio nas células, dependendo de sua concentração e, portanto, podem determinar a ativação de mecanismos de sobrevivência ou morte celular (RUBOVITCH; GAFNI; SARNE 2002). Assim, os canabinoides podem causar efeitos benéficos ou deletérios em diferentes tipos celulares (GUZMÁN, 2003). Nesse contexto, dados da literatura e dados anteriores do nosso laboratório mostraram que o agonista do receptor CB1, ACEA, foi capaz de proteger a linhagem Neuro 2a diferenciada em neurônios dopaminérgicos da morte celular induzida por H_2O_2 , após 24 horas de tratamento (BATINGA; ZÚÑIGA-HERTZ; TORRÃO, 2016). A metanandamida, outro agonista canabinoide, também foi capaz de proteger a linhagem Neuro 2a da morte celular desencadeada pelo H_2O_2 (AUAD, 2012). Porém, nossos resultados demonstraram que o ACEA não foi capaz de proteger a mesma linhagem celular em períodos mais curtos de tratamento, como 3 e 6 horas, após a exposição ao H_2O_2 . Entretanto, quando conjugamos os tratamentos com o antagonista CB1, AM 251, há uma diminuição na viabilidade celular, isso nos mostra que quando bloqueamos o receptor CB1, as células ficam mais susceptíveis aos danos causados pelo H_2O_2 . Apesar disso, devido às dificuldades encontradas no modelo de estresse oxidativo, optamos por utilizar outros modelos de neurotoxicidade, como a inflamação e o estresse de retículo endoplasmático.

A inflamação crônica também pode estar presente nas doenças neurodegenerativas onde os níveis citotóxicos de EROs, ERNs e citocinas pró-inflamatórias podem iniciar a morte celular (STEINER et al., 2015). Durante os processos inflamatórios no cérebro, a micróglia prolifera e migra até os locais acometidos pela inflamação (KETTENMANN et al., 2011). A micróglia quando ativada pode remover agregados tóxicos assim como regular uma variedade de receptores e outras moléculas envolvidas na resposta inflamatória e na fagocitose. No entanto, nas inflamações crônicas a micróglia permanece ativa por longos períodos, e isso faz com que haja um aumento na produção de citocinas como as interleucinas, resultando em morte celular (MCGEER; YASOJIMA; MCGEER, 2004). Sendo assim, a

neuroinflamação e a ativação da micróglia se tornaram interessantes alvos de tratamento e prevenção de doenças neurodegenerativas.

Com a descoberta da presença de receptores do sistema canabinoide em células do sistema imune, muitas pesquisas têm sido realizadas para uma melhor compreensão da função e do papel desses receptores em células imunológicas. Estudos sugerem que os canabinoides podem exercer efeitos imunomodulatórios e imunossupressores, que podem tanto modular a função como a secreção de citocinas ou até mesmo diminuir a proliferação dos linfócitos, a produção de anticorpos e a atividade dos macrófagos (CROXFORD; YAMAMURA, 2005; FRIEDMAN; SHIVERS S.; KLEIN, 1994). Em níveis moleculares, essa modulação ocorre através da inibição da produção de citocinas como o interferon, TNF- α e interleucinas (NAKANO; PROSS; FRIEDMAN, 1992; ZHENG; SPECTER, 1996). Desta maneira, a literatura sugere que os canabinoides podem ter um grande potencial terapêutico em processos inflamatórios (CROXFORD et al., 2005). Por exemplo, o composto canabinoide Δ^9 -THC, é capaz de diminuir os níveis de interleucinas como as IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e o TNF- α em cultura primária de micróglia de ratos expostas ao LPS em um período de 6 horas (PUFFENBARGER; BOOTHE; CABRAL, 2000). Os compostos canabinoides sintéticos, WIN55,212-2 e HU210, também protegem os neurônios dopaminérgicos após a injeção de LPS na substância negra de ratos e a neuroproteção observada parece estar relacionada com a capacidade dos canabinoides de suprimir a micróglia, a produção de EROs e de citonas pró-inflamatórias (CHUNG et al., 2011).

Nossos resultados mostraram que o agonista do receptor CB1 apresentou um papel neuroprotetor no modelo *in vitro* de inflamação induzido pelo LPS, em que a viabilidade celular foi parcialmente revertida após 6 horas de tratamento com 1,5 μ M de ACEA. Entretanto, concentrações menores de ACEA como 0,5 e 1 μ M e uma concentração maior como 2 μ M não foram capazes de melhorar a viabilidade celular no mesmo período de tratamento. Isso nos mostra que em relação aos compostos canabinoides, diferenças como concentração, o tipo de composto canabinoide, o tipo de agente indutor de morte celular, o tempo de exposição, entre outras variáveis, podem gerar respostas opostas entre neuroproteção e neurotoxicidade (DI MARZO, 2008; FOWLER; ROJO; RODRIGUEZ-GAZTELUMENDI, 2010; SARNE; MECHOULAM, 2005). Da mesma maneira, dados anteriores do laboratório mostram que o ACEA também protege a linhagem Neuro 2a diferenciada em neurônios dopaminérgicos, da morte celular induzida pelo LPS após 24 horas de tratamento,

porém, na concentração de 2 μ M (BATINGA; ZÚÑIGA-HERTZ; TORRÃO, 2016). Isso nos mostra que, apesar das diferenças entre as concentrações do agonista do receptor CB1, dos tempos propostos e do fenótipo das células, o ACEA apresenta um papel neuroprotetor, com a capacidade de reverter ou prevenir os danos causados pelo LPS.

A fim de avaliarmos se a neuroproteção exercida pelo ACEA estava sendo mediada pelo receptor CB1, um antagonista deste receptor foi utilizado, o AM 251. BATINGA e colaboradores (2016), demonstraram que o AM 251 não foi capaz de reverter o efeito neuroprotetor do ACEA, nas proporções de 1:1 (1 μ M de ACEA para 1 μ M de AM 251) ou 2:1. Porém, avaliando as constantes de dissociação (K_i) do agonista e antagonista do receptor CB1, percebemos que o ACEA possui uma afinidade maior pelo receptor CB1, com um K_i de 1,4 nM, enquanto que o antagonista AM 251 apresenta uma afinidade menor pelo mesmo receptor com um K_i de 7,49 nM. Desta forma, em nosso estudo utilizamos uma concentração maior de AM 251, na proporção de 1:3, para que este fosse capaz de competir pelo receptor CB1 de maneira mais eficiente com o agonista ACEA. Assim, encontramos em nossos resultados, que nesta proporção, o AM 251 foi capaz de bloquear o efeito neuroprotetor do ACEA, no modelo de inflamação causado pelo LPS. Assim, concluímos que neste caso, o efeito do neuroprotetor do agonista CB1, ACEA, estava sendo mediado via receptor CB1.

Alguns trabalhos sugerem que, além da neuroinflamação, as doenças neurodegenerativas parecem ter mecanismos celulares e moleculares em comum, principalmente o acúmulo de proteínas malformadas e a formação de agregados proteicos (ROSS; POIRIER, 2004). Os neurônios são muito sensíveis aos agregados proteicos e um grande número de estudos indicam que o estresse de RE pode estar envolvido no desenvolvimento das doenças neurodegenerativas (FORMAN et al., 2003). Os distúrbios causados pelo estresse de retículo endoplasmático podem levar as células a uma série de respostas, especialmente a ativação de vias de sinalização de morte celular, que têm sido reconhecidas em muitas patologias incluindo hipóxia, isquemia, diabetes e doenças neurodegenerativas (XU; BAILLY-MAITRE; REED et al., 2005). Assim, esses estudos indicam que estas vias ativadas durante o estresse de RE podem ser novos alvos terapêuticos para o tratamento destas doenças (FORMAN et al., 2003).

Poucos dados da literatura mostram a participação do sistema canabinoide em modelos de estresse de RE. Um estudo do nosso grupo, no entanto, mostra que o canabidiol, um composto fitocanabinoide, diminuiu a morte celular de oligodendrócitos de ratos desencadeada pela tunicamicina e pelo LPS bem como a expressão das proteínas CHOP e da caspase 12 após 24 horas de tratamento (MECHA et al., 2012), sugerindo a participação do sistema canabinoide nesses processos. No presente trabalho, nossos dados também demonstraram um efeito neuroprotetor do sistema canabinoide diante de um evento de estresse de RE causado pela tunicamicina. O ACEA na concentração de 2 μM foi capaz de reverter a diminuição da viabilidade celular da linhagem Neuro 2a causada pela tunicamicina após 6 horas de tratamento. Interessante ressaltar, que uma concentração um pouco menor de ACEA, como 1,5 μM , não foi capaz de melhorar a viabilidade celular neste mesmo modelo. Isso nos mostra novamente que os canabinoides exercem efeitos diferentes na mesma linhagem celular dependendo da concentração e do tipo de agente indutor de morte celular.

Do mesmo modo que no modelo de neuroinflamação, para avaliarmos se este efeito neuroprotetor estava sendo mediada pelo receptor CB1, foi utilizado o antagonista, AM 251. As duas proporções utilizadas do antagonista CB1 (1:1,5 e 1:3), no entanto, não foram capazes de reverter os efeitos neuroprotetores proporcionados pelo ACEA. No modelo de estresse de RE, o agonista ACEA parece exercer seus efeitos neuroprotetores independentes do receptor CB1, diferente do observado para a neuroinflamação. A literatura nos mostra que o ACEA e a anadamida podem ativar tanto o receptor CB1 como o TRPV1, associando assim este receptor valinoide ao sistema canabinoide (LISBOA, GUIMARÃES, 2012; DI MARZO, DE PETROCELLIS, 2012). Além disso, a neuroproteção exercida pelo canabidiol em oligodendrócitos, após o insulto com o LPS, também foi através de mecanismos que não envolveram os receptores CB1, CB2 ou TRPV1 (MECHA, 2012).

O estresse de RE ativa uma série de respostas intracelulares chamada de UPR (SHERMAN, GOLDBERG, 2001). De modo geral, a ativação dessas vias de sinalização leva a uma diminuição na síntese proteica, um aumento na expressão dos genes que codificam as chaperonas, e também na degradação de proteínas localizadas no RE. Estas respostas celulares minimizam o acúmulo e os agregados de proteínas mal dobradas através do aumento da capacidade do RE em degradar ou dobrar corretamente as proteínas (BERTOLOTTI et al., 2000; RAO; ELLERBY;

BREDESEN, 2004). As principais vias de sinalização da UPR são a PERK, ATF6 e a IRE1. A presença de proteínas mal dobradas e a ativação da UPR promove a autofosforilação da proteína PERK que por sua vez, fosforila a proteína eIF2 α , onde sua ação final é inativar e bloquear a tradução das proteínas. Por outro lado, a inativação da proteína eIF2 α previne o influxo de proteínas no lúmen do RE, evitando assim o seu acúmulo (HARDING et al., 2000; SHI et al., 1998). Desse modo, procuramos avaliar a fosforilação das proteínas, PERK e eIF2 α , nos modelos de estresse de RE e neuroinflamação, como forma de entender as vias de sinalização relacionadas a esses processos. Mecha e colaboradores (2012) observaram que em cultura primária de oligodendrócitos, os modelos de estresse de RE e inflamação, induzidos pela tunicamicina e pelo LPS, respectivamente, levaram a fosforilação das proteínas PKR e eIF2 α , após 5 minutos de exposição. Entretanto, em nosso estudo, utilizando o mesmo estímulo de estresse de RE e inflamação, não conseguimos observar o aumento na fosforilação destas mesmas proteínas, nos tempos de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos, na linhagem de neuroblastoma (Neuro 2a). Contudo, outros estudos sugerem que a fosforilação das proteínas PKR e eIF2 α pode ocorrer de uma maneira tempo-dependente, podendo variar de minutos, horas ou até mesmo dias para observamos a fosforilação, dependendo assim do tipo celular ou tecidual analisado (WANG et al., 2007). Outra possibilidade para o fato de não termos observado a fosforilação dessas proteínas nos tempos analisados, é que o estresse de RE induzido pela tunicamicina ou pelo LPS, na linhagem Neuro 2a, poderia ativar os outros sensores do ER, como a ATF6 ou a IRE1.

De qualquer maneira, a ativação destes três sensores de estresse de RE também pode levar a morte celular programada, através da transcrição de vários genes pró-apoptóticos como a CHOP e as caspases (FORMAN, et al., 2003). A proteína CHOP é um fator de transcrição pró-apoptótico que pode ser regulado pela ATF4, via PERK, ou pela via ATF6 (MA et al., 2002). Estudos sugerem que as células que não expressam a proteína CHOP são mais resistentes as consequências letais causadas pelo estresse de RE (OYADOMARI et al. 2002; ZINSZNER et al. 1998). Deste modo, procuramos avaliar a expressão da proteína CHOP nos modelos de estresse de RE e inflamação. Nossos dados mostraram que, no modelo de estresse de RE, um aumento significativo na expressão da proteína CHOP foi observado, após o estímulo com a tunicamicina, substância que promove o estresse de RE, e foi ainda mais incrementado quando conjugado ao antagonista CB1, o AM 251. No entanto, o

tratamento com ACEA não foi capaz de reverter o aumento da CHOP produzido pela tunicamicina. Apesar disso, acreditamos que um número maior de experimentos poderia resultar em uma diminuição da CHOP após o tratamento com o ACEA, o que iria de acordo com a melhora na viabilidade celular mostrada anteriormente, quando as células foram expostas a tunicamicina e tratadas com ACEA.

A proteína CHOP, também foi avaliada no modelo de inflamação, onde a tunicamicina foi utilizada como controle positivo para o estresse de RE. O LPS leva a ativação da proteína CHOP em cultura primária de oligodendrócitos de ratos, após 24 horas de exposição (MECHA et al., 2012). Apesar de observarmos o aumento na expressão da proteína CHOP após a exposição à tunicamicina, resultado já esperado, nós não observamos a ativação da proteína CHOP após 6 horas de exposição ao LPS.

A proteína caspase 12, assim como a proteína CHOP, também foi avaliada em ambos os modelos e após os tratamentos com os compostos canabinoides. As caspases são componentes pró-apoptóticos bem conhecidos, sendo que as caspases 2, 3, 4, 7, 9 e 12 estão envolvidas na morte celular induzida pelo estresse de RE (CHEUNG et al., 2006; DAHMER, 2005; DI SANO et al., 2006; HITOMI et al., 2004; MORISHIMA et al., 2002; MOMOI, 2004). A caspase 12 está localizada na membrana do RE e através da interação com as proteínas IRE1 e TRAF2 pode ser ativada pelo estresse de RE (TAN et al., 2006). A ativação da caspase 12 desencadeia a ativação das caspases 9 e 3, levando a morte celular por apoptose (MORISHIMA et al., 2002). Estudos mostraram que camundongos *knock out* para a proteína caspase 12 são resistentes a apoptose provocada pelo estresse de RE, e isto sugere que a caspase 12 é um regulador específico da apoptose desencadeada por este tipo de estresse (NAKAGAWA, YUAN, 2000). A ativação da caspase 12 pelo estresse de RE pode ser observada em modelos da doença de Alzheimer, isquemia e infecção viral (BITKO; BARIK, 2001; NAKAGAWA et al., 2000).

Nossos dados mostraram que, tanto a exposição da linhagem à tunicamicina quanto ao LPS, produziram a clivagem da proteína caspase 12. Este dado está de acordo com os estudos que sugerem o envolvimento dos mecanismos de inflamação com as vias de estresse de RE (DENG et al., 2004; HU et al., 2006; JIANG et al., 2003; KANEKO et al., 2003; NGUYEN et al., 2000; THOMAS et al., 1995; SANO, 2013). No entanto, o tratamento com 2 μ M de ACEA foi capaz de atenuar esse efeito completamente, retornando os níveis da caspase 12 aos do grupo controle, apenas

no modelo de estresse de retículo e não no de inflamação. Além disso, diferente da proteína CHOP, no tratamento conjugado com o ACEA e o AM 251, na mesma proporção (1:1,5), o efeito protetor do ACEA não foi bloqueado pelo antagonista AM 251. Este resultado sugere algumas possibilidades, como por exemplo, a concentração do AM 251 na proporção de 1:1,5, pode não ter sido suficiente para bloquear os receptores CB1, devido a sua menor afinidade por esse receptor quando comparado ao ACEA ou o agonista CB1, ACEA, poderia estar atuando através de outros receptores além do receptor CB1, como citado anteriormente.

Os efeitos protetores dos canabinoides podem estar relacionados com a ativação da proteína ERK 1/2 da família das MAP quinases dependendo do nível de toxicidade celular. A via ERK 1/2 possui um papel importante na sobrevivência celular por estar presente nas vias de sinalização relacionadas à proliferação, diferenciação e morte celular (BOUABOULA et al., 1995; SUBRAMANIAM; UNSICKER, 2010; TURU; HUNYADY, 2010). Dessa maneira, avaliamos a fosforilação da proteína ERK 1/2, após o tratamento com o agonista CB1, ACEA. Nossos resultados mostraram a ativação da via de sinalização ERK 1/2 após 5 e 10 minutos de tratamento com o ACEA, sugerindo a modulação das vias de sobrevivência celular pelo sistema canabinoide.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam uma ação neuroprotetora do agonista canabinoide ACEA na linhagem Neuro 2a em processos relacionados a inflamação e ao estresse de retículo endoplasmático. Esse efeito neuroprotetor do agonista envolve, pelo menos em parte, a participação do receptor CB1 no processo inflamatório, mas parece ser independente deste receptor no processo de estresse de RE. Além disso, esses efeitos neuroprotetores envolvem a modulação do balanço entre proteínas pré-apoptóticas e relacionadas à sobrevivência celular. Esses dados em conjunto sugerem um importante papel do sistema canabinoide em mecanismos relacionados aos processos neurodegenerativos e propõem a manipulação desse sistema como possível alvo terapêutico.

REFERÊNCIAS*

AMERI, A. The effects of cannabinoids on the brain. **Prog. Neurobiol.**, v. 58, p. 315-348, 1999.

AUAD, L. G. **A metanandamida, um agonista canabinóide, protege a linhagem de neuroblastoma neuro 2a da morte celular induzida por peróxido de hidrogênio.** 2012. 57f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BASAVARAJAPPA, B. S. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. **Protein. Pept. Lett.**, v. 14, p. 237-246, 2007.

BATINGA, H.; ZÚÑIGA-HERTZ, J. P.; TORRÃO, A. S. Cannabinoid receptor ligands prevent dopaminergic neurons death induced by neurotoxic, inflammatory and oxidative stimuli *in vitro*. **J. Biomed. Sci.**, v. 5, n. 1:2, 2016.

BAUABOULA, M.; POINOT-CHAZEL, C.; BOURRIÉ, B.; CANAT, X.; CALANDRA, B. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. **Biochem. J.**, v. 312, p. 637-641, 1995.

BERRA, C.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BERTOLOTTI, A.; ZHANG, Y.; HENDERSHOT, L. M.; HARDING, H. P.; RON, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, p. 326-332, 2000.

BITKO, V.; BARIK, S. An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus. **Journ. Cell. Biochem.**, v. 80, p. 441-454, 2001.

BLANCHARD, D. K.; NEWTON, C.; KLEIN, T. W.; STEWART, W. E.; FRIEDMAN, H. In vitro and in vivo suppressive effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on interferon production by murine spleen cells. **Int J Immunopharmacol.**, v. 8, p. 819-824, 1986.

CALDERÓN, F. H.; BONNEFONT, A.; MUÑOZ, F. J.; FERNÁNDEZ, V.; VIDELA, L. A.; INESTROSA, N. C. PC12 and neuro 2a cells have different susceptibilities to acetylcholinesterase-amyloid complexes, amyloid25-35 fragment, and hydrogen peroxide. **J. Neurosci. Res.**, v. 56, p. 620-631, 1999.

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

CHAN, K. C.; MONG, M. C.; YIN, M. C. Antioxidative and anti-inflammatory neuroprotective effects astaxanthin and canthaxanthin in nerve growth factor differentiated PC12 cells. **J. Food Sci.**, v.74, n. 7, p. H225-H231, 2009.

CHAVES, G.P.; NOGUEIRA, T.C.A.; BRITTO, L.R.G.; BORDIN, S.; TORRÃO, A. S. Retinal removal up-regulates cannabinoid CB1 receptors in the chick optic tectum. **J. Neurosci. Res.**, v. 86, p. 1626-1634, 2008.

CHAVES-KIRSTEN, G. P.; MAZUCANTI, C. H. Y.; REAL, C. C.; SOUZA, B. M.; BRITTO, L. R. G.; TORRÃO, A. S. Temporal changes of CB1 cannabinoid receptor in the basal ganglia as a possible structure-specific plasticity process in 6-OHDA lesioned rats. **Plos One.**, v.8, n. 10, 2013.

CHEUNG, H. H.; LYNN, K. N.; LISTON, P.; KORNELUK, R. G. Involvement of caspase-2 and caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: A role for the IAPs. **Exp Cell Res**, v. 312, p. 2347–2357, 2006.

CHUNG, Y. C.; BOK, E.; HUH, S. H.; PARK, J. Y.; YOON, S. H.; KIM, S. R.; KIM, Y. S.; MAENG, S.; PARK, S. H.; JIN, B. K. Cannabinoid receptor type 1 protects nigrostriatal dopaminergic neurons against MPTP neurotoxicity by inhibiting microglial activation. **J. Immunol.**, v. 187, p. 6508-6517, 2011.

CRISPO, J. A.G.; ANSELL, D. R.; PICHE, M.; EIBL, J. K., KHAPER, N.; ROSS, G. M.; TAI, T. C. Protective effects of polyphenolic compounds on oxidative stress-induced cytotoxicity in PC12 cells. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 88, p. 429-438, 2010.

CROXFORD, J. L.; YAMAMURA, T. Cannabinoids and the immune system: Potential for the treatment of inflammatory diseases? **J. Neuroimmun.**, v. 166, p. 3-18, 2005.

DAHMER, M. K. Caspases-2, -3, and -7 are involved in thapsigargin-induced apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells. **J. Neurosci. Res.**, v. 80, p. 576–583, 2005.

DENG, J.; LU, P. D.; ZHANG, Y.; SCHEUNER, D.; KAUFMAN, R. J.; SONENBERG, N. HARDING, H. P.; RON, D. Translational repression mediates activation of nuclear factor- κ B by phosphorylated translation initiation factor 2. **Mol.Cell. Biol.**, v. 24, p. 10161–10168, 2004.

DESAGHER, S.; GLOWINSKI, J.; PRE´MONT, J. Pyruvate Protects Neurons against Hydrogen Peroxide-Induced Toxicity. **J. Neurosci.**, v.17 (23), p. 9060–9067, 1997.

DE PETROCELLIS, L.; CASCIO, M. G.; DI MARZO, V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, p. 765-774, 2004.

DEWEY, W. L. Cannabinoid pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 38, p. 151-178, 1986.

DI MARZO, V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? **Nat. Ver. Drug Discov.**, v. 7, p. 338-455, 2008.

DI MARZO, V.; MATIAS, I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. **Nat. Neurosci.**, v. 8, p. 585-589, 2005.

DI MARZO, V.; MELCK, D.; BISOGNO, T.; DE PETROCELLIS, L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. **Trends Neurosci.**, v. 21, p. 521-528, 1998.

DI MARZO, V.; DE PETROCELLIS, L. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v. 367, p. 3216-3228, 2012.

DI SANO, F.; FERRARO, E.; TUFI, R.; ACHSEL, T.; PIACENTINI, M.; CECCONI, F. Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis by an apoptosome-dependent but caspase 12-independent mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 2693–2700, 2006.

EGERTOVÁ, M. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. **Proc Biol Sci.**, v. 265, n. 1410, p. 2081-2085, 1998.

ELJASCHEWITSCH, E.; WITTING, A.; MAWRIN, C.; LEE, T.; SCHMIDT, P. M.; WOLF, S.; HOERTNAGL, H.; RAINE, C. S.; SCHENEIDER-STOCK, R.; NITSCH, R.; ULLRICH, O. The Endocannabinoid Anandamide Protects Neurons during CNS Inflammation by Induction of MKP-1 in Microglial Cells. **Neuron**, v. 49, p. 67-79, 2006. FERNANDEZ, R. S.; COTTER, T. G. Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. **Biochem. Pharmacol.**, n. 48, p. 675-681, 1994.

FERNANDÉZ-RUIZ, J.; BERRENDERO, F.; HERNÁNDEZ, M. L.; RAMOS, J. A. The endogenous cannabinoid system and brain development. **Trends Neurosci.**, v. 23, p. 14-20, 2000.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FILIPPIN, L. I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N. P.; XAVIER, R. M. Redox Influence on the Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis. **Rev Bras Reumatol.**, v. 48, n.1, p. 17-24, 2008.

FLAMMENT. M.; HAJDUCH, E.; FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. **Trends Endocri. Metab.**, v. 23., p. 381-390, 2012.

FLOYD, R. A. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 26, p. 1346–1355, 1999.

FORMAN, M. S.; LEE, V. M.; TROJANOWSKI, J. Q. "Unfolding" pathways in neurodegenerative disease. **Trends Neurosci.**, v. 26, p. 407-410, 2003.

FOWLER, C. J.; ROJO, M. L.; RODRIGUEZ-GAZTELUMENDI, A. Modulation of the endocannabinoid system: neuroprotective or neurotoxicity? **Exp. Neurol.**, v. 224, p. 37-47, 2010.

FRIDE, E.; SHOHAMI, E. The endocannabinoid system: function in survival of the embryo, the newborn and the neuron. **Neuroreport**, v. 13, p. 1833-1840, 2002.

FRIEDMAN, H.; SHIVERS S.; KLEIN, T. W.; Drugs of abuse and the immune system. **Immunotoxicology and immunopharmacology.**, v. 2, p. 303-322, 1994.

FREUND, T. F.; KATONA, I.; PIOMELLI, D.; Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. **Physiol. Rev.**, v.83, p. 1017-1066, 2003.

GAO, H. M.; JIANG, J.; WILSON, B.; ZHANG, W.; HONG, J. S.; LIU, B. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. **J. Neurochem.**, v. 81, p. 1285–1297, 2002.

GERHARD, A., PAVESE, N., HOTTON, G., TURKHEIMER, F., MELTEM, E., HAMMERS, A., EGGERT, K., OERTEL, W., BANATI, R.B., BROOKS, D.J. In vivo imaging of microglial activation with [11C] (R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. **Neurobiol. Dis.**, v. 21, p. 404-412, 2006.

GIANDOMENICO, A. R.; CERNIGLIA, G. E.; BIAGLOW, T. E.; STEVENS, C. W.; KOCH, C. J. The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, p. 426 – 434, 1997.

GILBERT, G. L.; KIM, H. J.; WAATAJA, J. J.; THAYER, S. A. Delta (9)-Tetrahydrocannabinol protects hippocampal neurons from excitotoxicity. **Brain Res.**, v. 1128, p. 61-69, 2007.

GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 120, p. 885–890 , 1984.

GRUNDY, R. I.; RABUFFETTI, M.; BELTRAMO, M. Cannabinoids and Neuroprotection. **Mol. Neurobiol.**, v.24, p. 29-51, 2001.

GUZMÁN, M. Neurons on cannabinoids: dead or alive? **Br. J. Pharmacol.**, v.140, p. 439-440, 2003.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v. 18, p.685, 2001.

HANSEN, H. H.; SCHMID, P. C.; BITTIGAU, P.; LASTRES-BECKER, I.; BERRENDERO, F.; MANZANARES, J.; IKONOMIDOU, C.; SCHMID, H. H.; FERNANDEZ-RUIZ, J. J.; HANSEN, H. S. Anandamide, but not 2-arachidonoylglycerol, accumulates during in vivo neurodegeneration. **J. Neurochem.**, v. 78, p. 1415-1427, 2001.

HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; BERTOLOTI, ZENG, H.; RON, D. **Perk** Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. **Mol. Cell.** v, 5, p. 897-904, 2000.

HARRY, G. J; KRAFT, A. D. Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.**, v. 4, p. 1265–1277, 2008.

HASHIMOTODANI, Y.; OHNO-SHOSAKU, T.; KANO, M. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. **Neuroscientist.**, v. 13, p. 127-137, 2007.

HICKMAN, S.; KULCZYCKI, A.; LYNCH, R. G.; KORNFELD, S. Studies of mechanism of tunicamycin inhibition of IgA and IgE secretion by plasma cells. **J. Biol. and Chem.**, vol. 252, n. 12, p. 4402-4408, 1977.

HITOMI, J.; KATAYAMA, T.; EGUCHI, Y.; KUDO, T.; TANIGUCHI, M.; KOYAMA, Y.; MANABLE, T.; YAMAGISHI, S.; BANDO, Y.; IMAIZUMI, K. Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. **J. Cell. Biol.**, v. 165, p. 347–356, 2004.

HOOZEMANS, J. J.; VAN HAASTERT, E. S.; NIJHOLT, D. A., ROZEMULLER, A. J., SCHEPER, W. Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease. **Neurodegener. Dis.**, v. 10, p. 212-215, 2012.

HUANG, C. C.; FABER, P. W.; PERSICHETTI, F.; MITTAL, V.; VONSATTEL, J. P.; MACDONALD, M. E.; GUSELLA, J. F. Amyloid Formation by Mutant Huntingtin: Threshold, Progressivity and Recruitment of Normal Polyglutamine Proteins. **Somat. Cell Mol. Genet.**, v. 24, p. 217-233, 1998.

HU, P. HAN., Z.; COUVILLON, A. D.; KAUFMAN, R. J.; EXTON, J. H. Autocrine tumor necrosis factor- α links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and downregulation of TRAF2 expression. **Mol. Cell. Biol.**, v. 26, p. 3071–3084, 2006.

JIANG, H. Y.; WEK, S. A. MCGRATH, B. C., SCHEUNER, D.; KAUFMAN, R. J.; CAVENER, D. R.; WEK, R. C. Phosphorylation of the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF- κ B in response to diverse cellular stresses. **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, p. 5651–5663, 2003.

JORDAN, J. D.; HE, J. c.; EUNG DAMRONG, N. J.; GOMES, I.; ALI, W.; NGUYEN, T.; BINOVA, T. G.; PHILIPS, M. R.; DEVI, L. A.; IYERNGAR, R. Cannabinoid receptor-induced neurite outgrowth is mediated by Rap1 activation through G(α)o/i-triggered proteasomal degradation of Rap1GAPII. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 11413-11421, 2005.

KANEKO, M.; NIINUMA, Y.; NOMURA, Y. Activation signal of nuclear factor- κ B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, p. 931–935, 2003.

KAR, S.; SLOWIKOWSKI, S. P.; WESTAWAY, D.; MOUNT, H. T. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. **J. Psychiatry Neurosci.**, v.29, p. 427-441, 2004.

KAUFMAN, R. J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. **Journ. Clin. Invest.**, v.110, p. 1389–1398, 2002.

KAUFMAN, R. J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. **Genes Dev.**, v. 13, p. 1211–1233, 1999.

KETTENMANN, H.; UWE-KARSTEN H.; NODA, M.; VERKHRATSKY. A. Physiology of Microglia. **Amer. Physiol. Soc.**, v. 91, p. 461-553, 2011.

KITAMURA, M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 295, p. F323–F334, 2008.

KLEBE, R. J.; RUDDLE F. H. Neuroblastoma: Cell culture analysis of a differentiating stem cell system. **J. Cell. Biol.**, v. 43, p.43, p. 69A, 1969.

LEE, A. S.; The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. **Trends Biochem. Sci.**, v. 26, p. 504–510, 2001.

LIN, W.; HARDING, H. P.; RON, D.; POPKO, B. Endoplasmic reticulum stress modulates the response of myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon-gamma. **J. Cell. Biol.**, v. 169, p. 603–612, 2005.

LINDERGREN, H. Loss of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in scrapie-infected N2a cells. **J. Neurosci. Res.**, v. 71, n. 2, p. 291-299, 2003.

LING, Z.; ZHU, Y.; TONG, C. W.; SNYDER, J. A.; LIPTON, J. W.; CARVEY, P. M. Progressive dopamine neuron loss following supra-nigral lipopolysaccharide (LPS) infusion into rats exposed to LPS prenatally. **Experim. Neurology**, v. 199, p. 499–512, 2006.

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. *Neuropharm.*, v. 62, p. 2455-2462, 2012.

LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. The mechanism of cellular 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J. Neurochem.*, v. 69, p. 581-593, 1997.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles, and alpha-synuclein. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 3, p. 932-942, 2002.

LUTZ, B. Molecular biology of cannabinoid receptors. Prostaglandins Leukot Essent. *Fatty Acids*, v. 66, p. 123-142, 2002.

MANCUSO, C.; SCAPAGINI, G.; CURRO, D.; GIUFFRIDA STELLA, A. M.; DE MARCO, C.; BUTTERFIELD, D. A.; CALABRESE, V. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front. Biosci.*, v. 12, p. 1107-1123, 2007.

MARSICANO, G.; GOODENOUGH, S.; MONORY, K.; HERMANN, H.; EDER, M.; CANNICH, A.; AZAD, S. C.; CASCIO, M. G.; GUTIERREZ, S. O.; VAN DER STELT, M.; LOPEZ-RODRIGUEZ, M. L.; CASANOVA, E.; SCHUTZ, G.; ZIEGLGANSBERGER, W.; DI MARZO, V.; BEHL, C.; LUTZ, B. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*, v. 302, p. 84-88, 2003.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J.; YOUNG, A. C.; BONNER, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, v. 346, p. 561-564, 1990.

MATTSON, M. P. Metal-catalyzed disruption of membrane protein and lipid signaling in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 1012, p. 37-50, 2004.

MCGEER, P. L.; YASOJIMA, K.; MCGEER, E. G. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Park. Rel. Disor.*, v. 10, p. S3-S7, 2004.

MCGEER, P. L.; ITAGAKI, S.; BOYES, B. E.; MCGEER, E. G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, v. 38, p. 1285-1291, 1998.

MECHA, M.; TORRAO, A. S.; MESTRE, L.; CARRILLO-SALINAS, F. J.; MECHOULAM, R.; GUAZA, S. Cannabidiol protects oligodendrocyte progenitor cells from inflammation-induced apoptosis by attenuating endoplasmatic reticulum stress. *Cell Death and Disease*, v. 3, p. 331, 2012.

MECHOULAM, R.; GAONI, Y. A total synthesis of dl-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 20; 87, p. 3273-3275, 1965.

MENG, F.; LOWELL, C. A. Lipopolysaccharide (LPS) -induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 1661-1670, 1997.

MOLINA-HOLGADO, F.; HIDER, R. C.; GAETA, A.; WILLIAMS, R.; FRANCIS, P. Metals ions and neurodegeneration. **Biometals.**, v. 20, p. 639-654, 2007.

MOMOI, T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 28, p. 101-105, 2004.

MORISHIMA, N.; NAKANISHI, K.; TAKENOUCHI, H.; SHIBATA, T.; YASUHIKO, Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c independent activation of caspase-9 by caspase-12. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 34287-34294, 2002.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature.**, v. 365, p. 61-65, 1993.

NAKANO, Y.; PROSS, S. H.; FRIEDMAN, H. Modulation of interleukin 2 activity by delta 9-tetrahydrocannabinol after stimulation with concanavalin A, phytohemagglutinin, or anti-CD3 antibody. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 201, p. 165-168, 1992.

NAKAGAWA, T.; YUAN, J. Cross-Talk between Two Cysteine Protease Families Activation of Caspase-12 by Calpain in Apoptosis. **Journ. Gener. Phys.**, v. 150, p. 887-894, 2000.

NAKAGAWA, T.; ZHU, H.; MORISHIMA N.; Li, E.; XU., J.; YANKNER, B. A.; YUAN, J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . **Nature.** v. 403, p. 98-103, 2000.

NGUYEN, T.; HUANG, H. C.; PICKETT, C. B. Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 15466-15473, 2000.

OKTYABRSKY, O. N.; SMIRNOVA, G.V. Redox regulation of cellular functions. **Biochemistry.**, v. 72, p. 132-145, 2007.

OYADOMARI, S.; KOIZUMI, A.; TAKEDA, K.; GOTOH, T.; AKIRA, S.; ARAKI, E.; MORI, M. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. **Journ. Clin. Invest.** v, 109, v. 525-532, 2002.

PAN, C.; GIRALDO, G. S.; PRENTICE, H.; WU, J. Y. Taurine protection of PC12 cells against endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress. **J. Biomed. Sci.**, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2010.

PANIKASHVILI, D.; SIMEONIDOU, C.; BEN-SHABAT, S.; HANUS, L.; BREUER, A.; MECHOULAM, R.; SHOHAMI, E. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. **Nature**, v. 413, p. 527-531, 2001.

PARMENTIER-BATTEUR, S.; JIN, K.; MAO, X. O.; XIE, L.; GREENBERG, D. A. Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor Knock-out mice. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 9771-9775, 2002.

PERRY, G. et al. Oxidative damage in Alzheimer's disease: the metabolic dimension. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 18, p. 417-421, 2000.

PRELL, T.; LAUTENSCHLÄGER, J.; WEIDEMANN, L.; RUHMER, J.; WITTE, O. W.; GROSSKREUTZ, J. Endoplasmatic reticulum stress is accompanied by activation of NF- κ B in amyotrophic lateral sclerosis. **J. Neuroim.**, v. 270, p. 29-36, 2014.

PUFFENBARGER, R. A.; BOOTHE, C.; CABRAL, G. A. Cannabinoids Inhibit LPS-Inducible Cytokine mRNA Expression in Rat Microglial Cells. **Glia**, v. 29, p. 58-69, 2000.

QIN, L.; WU, X.; BLOCK, M. L.; LIU, Y.; BREESE, G. R.; HONG, J. S.; KNAPP, D. J.; CREWS, F. T. Systemic LPS Causes Chronic Neuroinflammation and Progressive Neurodegeneration. **Glia**, v. 55, p. 453-462, 2007.

QUAN, N.; SUNDAR, S. K.; WEISS, J. M. Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. **J. Neuroimmunol.** v. 49, p. 125–134, 1994.

RAO, R. V.; ELLERBY, H. M.; BREDESEN, D. E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. **Cell Deat. Differ.**, v. 11, p. 372-380, 2004.

RAMOS, J. A.; DE MIGUEL, R.; CEBEIRA, M.; HERNANDEZ, M.; FERNANDEZ-RUIZ, J. J. Exposure to cannabinoids in the development of endogenous cannabinoid system. **Neurotox. Res.**, v. 4, p. 363-372, 2002.

REINER, A.; ALBIN, R. L.; ANDERSON, K. D.; D'AMATO C. J.; PENNEY, J. B.; YOUNG, A. B. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 5733-5737, 1988.

ROSS, S. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 140, p. 790-801, 2003.

ROSS, C. A.; POIRIER, M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. **Nat. Med.**, p. s10-s17, 2004.

ROTHWELL, N. J.; RELTON, J. K. Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the CNS. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.17, p. 217–227, 1993.

RUBOVITCH, V.; GAFNI, M.; SARNE, Y. The cannabinoid agonist DALN positively modulates L-type voltage-dependent calcium channels in N18TG2 neuroblastoma cells. **Brain Res Mol Brain Res.**, v. 101, p. 93–102, 2002

RUTKOWSKI, D. T.; KAUFMAN, R. J. A trip to the ER: coping with stress. **Trends in Cell Biol.**, v. 14, p. 20-28, 2004.

SAITO, V. M.; WOTJAK, C. T.; MOREIRA, F. A. Pharmacological exploitation of the endocannabinoid system: new perspectives for the treatment of depression and anxiety disorders? **Ver. Bras. Psi.**, v. 32, p. s7-s14, 2010.

SANO, R.; REED, J. C. ER stress-induced cell death mechanisms. **Mol. Cell Res.**, v. 1833, p. 3460-3470, 2013.

SAGREDO, O.; GARCÍA-ARENCIBIA, M.; DE LAGO, E.; FINETTI, S.; DECIO, A.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. **Mol. Neurobiol.**, v. 36, p. 82-91, 2007.

SARNE, Y.; ASAF, F.; FISHBEIN, M.; GAFNI, M.; KEREN, O. The dual neuroprotective-neurotoxic profile of cannabinoid drugs. **Br. J. Pharmacol.**, v. 163, p. 1391-1401, 2011.

SARNE, Y.; MECHOULAM, R. Cannabinoids: between neuroprotection and neurotoxicity. **Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.**, v. 4, p. 677-684, 2005.

SHI, Y.; VATTEM, K. M.; SOOD, R.; NA, J.; LIANG, J.; STRAMM, L.; WEK, R. C. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, p. 7499–7509, 1998).

SHERMAN, M. Y.; GOLDBERG, A. L. Cellular Defenses against Unfolded Proteins: A Cell Biologist Thinks about Neurodegenerative Diseases. **Neuron.** v. 29, p. 15-32, 2001.

SPILLANTINI, M. G.; SCHMIDT, M. L.; LEE, V. M. Y.; TROJANOWSKI, J. Q.; JAKES, R.; GOEDERT, M. α – Synuclein in Lewy bodies. **Nature.**, v. 388, p. 839-840, 1997.

STEFANI, I. C.; WRIGHT, D.; POLIZZI, K. M.; KONTORAVDI, C. The role of ER stress-induced apoptosis in neurodegeneration. **Curr Alzheimer Res.**, v. 9, p. 373–387, 2012.

STEINER, N.; RACHELLE, B.; KARUNaweera, N.; LIND, J. M.; MÜNCH, G.; LEZANNE, O. Neuroprotection of Neuro2a cells and the cytokine suppressive and anti-inflammatory mode of action of resveratrol in activated RAW264.7 macrophages and C8eB4 microglia. **Neurochem. Inter.**, v, xxx, p. 1-9, 2015.

STELLA, N.; SHWEITZER, P.; PIOMELLI, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. **Nature.** v. 388, p. 773-778, 1997.

SUBRAMARIAM, S.; UNSICKER, K. ERK and cell death: ERK 1/2 in neuronal death. *FEBS J.*, v. 277, p. 22-29, 2010.

TAKATSUKI, A.; KAWAMURA, K.; OKINA, M.; KODAMA, Y.; ITO, T.; TAMURA, G. The structure of tunicamycin. *Agric. Biol. Chem.*, v. 41, p- 2307-2309, 1977.

THOMAS, P. J.; QU, B. H.; PEDERSEN, P. L. Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.*, v. 20, p. 456-459, 1995.

TORRÃO, A. S.; CAFÉ-MENDES, C. C.; REAL, C. C.; HERNANDES, M. S.; FERREIRA, A. F. B.; SANTOS, T. O.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; MAZUCANTI, C. H. Y.; FERRO, E. S.; SCAVONE, C.; BRITTO, L. R. G. Different Approaches, One Target: Understanding Cellular Mechanisms of Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Ver. Bras. Psiquiatr.*, v. 34, p. 194-218, 2012.

TURU, G.; HUNYADY, L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Mol. Endocr.*, v. 44, n.2, p. 75-85, 2010.

TYAGI, E.; AGRAWAL, R.; NATH, C.; SHUKLA R. Influence of LPS-induced neuroinflammation on acetylcholinesterase activity in rat brain. *J. Neuroimmunol.*, v. 205, p. 51-56, 2008.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZU. M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Inter.*, v. 160, p. 1-40, 2006.

VANDENABEELE, P.; FIERIS, W. Is amyloidogenesis during Alzheimer's disease due to an IL-1-/IL-6-mediated 'acute phase response' in the brain? *Immunol. Today.* v.12, p. 217-219; 1991.

VAN DER STELT, M.; DI MARZO, V. Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. *Prostaglan. Other Lipid Mediat.*, v. 77, p. 111-122, 2005.

VAN DER STELT, M.; DI MARZO, V. Endovanilloids. *Eur. J. Biochem.*, v. 271, p. 1827-1834, 2004.

VAN DER STELT, M.; VELDHUIS, W. B.; BAR, P. R.; VELDINK, G. A.; Vliegenthart, J. F.; NICOLAY, K. Neuroprotection by D9-tetrahydrocannabinol, the main compound in marijuana, against oarbain-induced in vivo excitotoxicity. *J. Neurosci.*, v. 21, p. 6475-6579, 2001.

WANG, X.; FAN, Z.; WANG, B.; LUO, J.; ZUN-LI, K. Activation of double-stranded RNA-activated protein kinase by mild impairment of oxidative metabolism in neurons. *Journ. Neurochem.*, v. 103, p. 2380-2390, 2007.

WALLACE, M. J.; BLAIR, R. E.; FALENSKI, K. W.; MARTIN, B. R.; DELORENZO, R. J. The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 307, p. 129-137, 2003.

WISCHIK, C. M.; HARRINGTON, C. R.; MUKAETOVA-LADINSKA, E. B.; NOVAK, M.; EDWARDS, P. C.; MCARTHUR, F. K. Molecular Characterization and Measurement of Alzheimer's Disease Pathology: Implications for Genetic and Environmental Aetiology. **Ciba Found. Symp.**, v. 169, p. 268-293, 1992.

YOSHIDA, H. ER stress and diseases. **FEBS Journal.**, v. 274, p. 630-658, 2007.

XU, C.; BAILLY-MAITRE, B.; REED, J. C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. **The Journal of Clinical Investigation.**, v. 115, p. 2656-2664, n.10, 2005.

ZHANG, K.; KAUFMAN, R.J. The unfolded protein response – A stress signaling pathway critical for health and disease. **Neurology.**, v.66, p. S102-S109, 2006.

ZHAO, L.; ACKERMAN, S. L. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. **Cur. Opin. Cell Biol.**, v. 18, p. 444–452, 2006.

ZHENG, Z. M.; SPECTER, S. C. Delta-9-tetrahydrocannabinol suppresses tumor necrosis factor alpha maturation and secretion but not its transcription in mouse macrophages. **Int J Immun.**, v. 18, p. 53-68, 1996.

ZINSZNER, H.; KURODA, M.; WANG, X. Z.; BATCHVAROVA, N.; LIGHTFOOD, R. T.; STEVENS, J. L.; RON, D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. **Gen. Devel.**, v. 12, p. 982-995, 1998.