LUCIANA GONZALEZ AUAD

**A METANANDAMIDA, UM AGONISTA CANABINÓIDE,
PROTEGE A LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA NEURO2A
DA MORTE CELULAR INDUZIDA POR PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO**

Dissertação de Mestrado 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
2012

LUCIANA GONZALEZ AUAD

**A METANANDAMIDA, UM AGONISTA CANABINÓIDE,
PROTEGE A LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA NEURO2A
DA MORTE CELULAR INDUZIDA POR PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO**

Dissertação de Mestrado 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 Torção

Versão Original

São Paulo
2012

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

Auad, Luciana Gonzalez.

A metanandamida, um agonista canabinóide, protege a linhagem de neuroblastoma neuro 2A da morte celular induzida pelo peróxido de hidrogênio / Luciana Gonzalez Auad. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Andréa da Silva Torrão.

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

Versão do título para o inglês: The methanandamide, a cannabinoid agonist, protects the lineage neuroblastoma neuro 2A of cell death induced by Hydrogen Peroxide.

1. Neuro A2 2. Sistema canabinoide 3. Morte celular 4. Metanandamida
5. Peróxido de Hidrogênio I. Torrão, Profa. Dra. Andréa da Silva II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB068/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luciana Gonzalez Auad.

Título da Dissertação: A metanandamida, um agonista canabinóide, protege a linhagem de neuroblastoma neuro 2A da morte celular induzida pelo peróxido de hidrogênio.

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

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha Mãe que infelizmente não está mais presente entre nós, mas sempre foi minha inspiração e força em todos os momentos da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer inicialmente a Prof^a Andréa da Silva Torrão que me orientou e me auxiliou durante toda a execução do trabalho.

Quero agradecer aos meus amigos do laboratório: Em especial a Gabriela que sempre me ajudou e foi uma grande amiga, mas também a Taisa, ao Caio e a Hadassa que formaram sempre uma equipe prazerosa de trabalho.

Também agradeço ao Jorge que muitas vezes esteve presente aos finais de semana ou madrugada me incentivando.

Agradeço também a todos do laboratório do Prof^o Britto que também estiveram presentes durante a execução do meu trabalho.

Aos amigos, familiares e todos presentes.

RESUMO

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

As doenças neurodegenerativas são desordens progressivas que afetam determinadas populações neuronais do sistema nervoso central, levando a morte neuronal e a ruptura de circuitos neurais. Fatores genéticos, ambientais e a idade contribuem para o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas. Além destes também são apontados como fatores de risco, deficiências de fatores neurotróficos, defeito mitocondrial, acúmulo de elementos neurotóxicos, aumento da formação de radicais livres e/ou estresse oxidativo, defeito no metabolismo energético e defeitos genéticos. O sistema canabinóide vem sendo sugerido como um importante sistema neuroprotetor em diversos modelos de neurodegeneração como, hipóxia aguda e epilepsia, isquemia cerebral, lesão cerebral, excitotoxicidade e modelos de estresses oxidativos. Uma vez que o encéfalo é especialmente vulnerável a danos dos radicais livres, o seu envelhecimento parece estar intimamente associado aos efeitos das ROS. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a participação do sistema canabinóide em um modelo de morte celular *in vitro* induzida pelo peróxido de hidrogênio. O modelo celular utilizado foi a linhagem Neuro 2A. Iniciamos com as padronizações de tempo e curva concentração-resposta do peróxido de hidrogênio e dos agentes canabinóides. Posteriormente realizamos os tratamentos conjugados para verificar a possível função neuroprotetora do sistema canabinóide. Obtivemos resultados de neuroproteção da Metanandamida revertendo o quadro de morte celular induzido pelo peróxido de hidrogênio. Acreditamos que esta neuroproteção seja via CB₁ que inibe os canais de cálcio dependentes de voltagem talvez contribuindo para a redução da progressão da excitotoxicidade. Além disso, um dos mecanismos neuroprotetores do sistema canabinóide comumente proposto é a inibição da liberação de glutamato mediada pelo receptor CB₁.

Palavras-Chave: Neuro 2A. Peróxido de Hidrogênio. Sistema Canabinóide. Morte Celular. Metanandamida.

ABSTRACT

AUAD, L. G. **The methanandamide, a cannabinoid agonist, protect the lineage of neuro 2A cell death induced by hydrogen peroxide.** 2012. 57 p. Master thesis (Human Fisiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Neurodegenerative diseases are progressive disorder affecting specific neuronal populations in the central nervous system, leading to neuronal death and disruption of neural circuits. Genetic, environmental and age contribute to the development of neurodegenerative diseases. In addition to these are also identified as risk factors, neurotrophic factor deficiencies, defective mitochondrial accumulation of neurotoxic elements, increased formation of free radicals and / or oxidative stress, defects in energy metabolism and genetic defects. The cannabinoid system has been suggested as an important system neuroprotective in several models of neurodegeneration such as acute hypoxia and epilepsy, cerebral ischemia, brain injury, excitotoxicity and oxidative stress models. Once the brain is especially vulnerable to free radical damage, its aging seems to be closely associated with the effects of ROS. The objectives of this study were to evaluate the participation cannabinoid system in a model of in vitro cell death induced by hydrogen peroxide. The model used was the cell line neuro 2A. We begin with the standardization of time and concentration-response curve of hydrogen peroxide and cannabinoid agents. Later we performed the treatments combined to verify the possible neuroprotective effects of the cannabinoid system. We obtained results of neuroprotection methanandamide reversing the framework of cell death induced by hydrogen peroxide. We believe that this is via neuroprotection CB₁ that inhibits calcium channels of voltage-dependent perhaps contributing to the reduction of the progression of excitotoxicity. Furthermore, one of the neuroprotective mechanisms commonly proposed system is the cannabinoid inhibits the release of glutamate mediated by the CB₁ receptor.

Key words: Neuro 2A. Hydrogen Peroxide. Cannabinoid System. Cell Death. Methanandamide.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 ASPECTOS GERAIS	10
1.2 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	10
1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DEFESAS ANTIOXIDANTES	11
1.3.1 ESTRESSE OXIDATIVO E MORTE CELULAR	12
1.4 SISTEMA CANABINÓIDE	14
1.4.1 CANABINÓIDES ENDÓGENOS E RECEPTORES	14
1.4.2 MECANISMOS DE AÇÃO DO SISTEMA CANABINÓIDE	16
1.4.3 SISTEMA CANABINÓIDE, NEUROPROTEÇÃO E NEURODEGENERAÇÃO	18
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO	23
3.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO E DE CONCENTRAÇÕES DE H₂O₂	23
3.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS COMPOSTOS CANABINÓIDES	24
3.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CONJUGADOS DO H₂O₂ E DOS COMPOSTOS CANABINÓIDES	24
3.5 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR	25
3.6 IMMUNOBLOTTING	26
4 RESULTADOS	27
4.1 VIABILIDADE CELULAR APÓS DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO H₂O₂	27
4.2 CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA DA EXPOSIÇÃO AO H₂O₂	29
4.3 CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA DA EXPOSIÇÃO AO AGONISTA E ANTAGONISTA CANABINÓIDE	31
4.4 EFEITOS DO TRATAMENTO CONJUGADO DE H₂O₂ COM CANABINÓIDES	34
4.4.1 METANANDAMIDA	34

4.4.2 AM 251	38
4.5 IMMUNOBLOTTING	41
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

Com o aumento da expectativa de vida da população, existe um grande interesse no estudo das doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Vários desses estudos têm implicado o estresse oxidativo como fator importante na progressão ou mesmo no desencadeamento do processo neurodegenerativo, uma vez que os neurônios são extremamente susceptíveis ao estresse oxidativo.

O estresse oxidativo é definido como a situação na qual a formação de espécies reativas excede a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, tendo como consequência o aumento de danos a moléculas de DNA, lipídios e proteínas. Estes danos, quando não reparados, podem comprometer o funcionamento celular e ocasionar a morte das células por apoptose ou até mesmo necrose, de acordo com o estímulo (HALLIWELL, 2001).

Neste contexto, muitos estudos investigam o papel do sistema canabinóide como neuroprotetor nas doenças neurodegenerativas (SHEN; THAYER, 1999) em modelos de hipóxia aguda e epilepsia (WALLACE et al., 2003), isquemia cerebral (NAGAYAMA et al., 1999), lesão cerebral (PANIKASHVILI et al., 2001), excitotoxicidade (MARSICANO et al., 2003; VELDHUIS et al., 2003) e de diferentes paradigmas de estresse oxidativo (MARSICANO et al., 2003).

1.2 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

As doenças neurodegenerativas são desordens progressivas que afetam determinadas populações neuronais do sistema nervoso central, levando a morte neuronal e a ruptura de circuitos neurais. Um mecanismo comum no desenvolvimento de processos neurodegenerativos parece ser a presença de componentes protéicos anormais que se acumulam no encéfalo, levando à perda neuronal. O acúmulo de β -amilóide (A β) nas placas senis e de proteína tau hiperfosforilada nos emaranhados neurofibrilares da Doença de Alzheimer; acúmulo da α -sinucleína nos corpos de Lewy na Doença de Parkinson, agregados da proteína huntingtina na Doença de Huntington e corpos de Pick na demência de

Pick, são alguns exemplos. Essa alteração na conformação de proteínas (por oxidação protéica ou dano oxidativo de RNA), gerando estruturas intermediárias, que formam oligômeros solúveis (considerados os mais tóxicos), que posteriormente agregam-se, formando protofibrilas e por fim fibrilas, que são consideradas marcadores de processos neurodegenerativos (CASTELLANI et al., 2007; MANCUSO et al., 2007; MATTSON, 2004; MOLINA-HOLGADO et al., 2007).

Fatores genéticos e ambientais parecem contribuir para o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas, sendo a idade o principal fator de risco. Além da idade, são apontados como fatores de risco, deficiências de fatores neurotróficos, defeito mitocondrial, acúmulo de elementos neurotóxicos, aumento da formação de radicais livres e/ou estresse oxidativo, defeito no metabolismo energético e defeitos genéticos (KAR et al., 2004; SPIRES; HYMAN, 2005). Várias evidências sugerem que a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo estão fortemente envolvidos na patogênese de muitas doenças neurodegenerativas relacionadas com o envelhecimento, especialmente a doença de Alzheimer (LEUNER et al., 2007; MATTSON et al., 2008).

1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DEFESAS ANTIOXIDANTES

As células vivas presentes em uma atmosfera rica em oxigênio estão constantemente expostas aos possíveis danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS – “reactive oxygen species”), que podem ser originadas tanto exógena quanto endogenamente. As fontes exógenas de ROS incluem luz ultravioleta (UV), principalmente nos comprimentos de onda maiores que 280nm, irradiação ionizante e agentes químicos. Já as ROS formadas endogenamente podem ser originadas como consequência do próprio metabolismo celular, uma vez que elétrons provenientes da cadeia de transportes de elétrons, localizada na mitocôndria, podem interagir com várias moléculas intracelulares. ROS são também produzidas durante processos patológicos como, por exemplo, o que ocorre em uma resposta inflamatória celular (BERRA; MENCK; DI MASCIIO, 2006). É importante salientar que as ROS nem sempre são o resultado do metabolismo celular, mas podem ser também geradas por oxidases (enzimas específicas da membrana plasmática) como resposta a fatores de crescimento e citocinas e, conseqüentemente, podem servir como segundos mensageiros em alguns

processos específicos de sinalização celular. A geração intracelular de ROS, considerada normal em níveis fisiológicos, tem um papel vital uma vez que essas espécies, nesses casos, produzidas de forma controlada, atuam na regulação da sinalização celular e da expressão gênica (BARZILAI; YAMAMOTO, 2004).

Durante as reações fisiológicas do metabolismo celular aeróbio são gerados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$) e hidroxila (OH), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apesar de não ser um radical livre, apresenta efeito extremamente deletério, porque participa da reação que produz o OH. O H_2O_2 tem vida longa e é capaz de atravessar camadas lipídicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O equilíbrio entre a produção de ROS e o sistema antioxidante é essencial no metabolismo de oxigênio e as células possuem um sistema de defesa que pode atuar como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esse sistema é constituído por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. No caso de a lesão já estar instalada, também pode entrar em ação um sistema de reparação constituído pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros. A maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

1.3.1 ESTRESSE OXIDATIVO E MORTE CELULAR

Apesar da existência desses agentes e mecanismos antioxidantes, quando a formação de ROS excede a capacidade antioxidante celular, pode haver a geração de uma condição conhecida como estresse oxidativo, cujos resultados podem ser bastante danosos às células. Essa condição pode variar bastante entre organismos, tipos celulares e até mesmo entre células de um mesmo tecido, uma vez que a capacidade antioxidante das células pode ser bastante diversificada (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006).

Uma grande quantidade de estudos suporta o papel do estresse oxidativo no desencadeamento de morte por apoptose (MCCONKEY, 1998). O mecanismo de indução pode ser via exposição a peróxido de hidrogênio (IKEDA et al., 1999; MATSURA et al., 1999), ciclização-redox de quinonas ou agentes tiol-alquilantes (SLATER et al., 1995). Assim como o cálcio, o estresse oxidativo pode inibir ou

promover apoptose e até necrose, dependendo da intensidade do estímulo (FERNANDEZ; COTTER, 1994). Slater et al. (1995) postularam que a morte celular apoptótica pode sofrer uma transição para a necrótica durante uma situação de estresse oxidativo através de dois mecanismos principais. O primeiro é desencadeado pela inativação de caspases devido à oxidação do grupo tiol de seus sítios ativos por agentes oxidantes ou S-nitrosilação. No segundo mecanismo ocorre uma redução nos níveis de ATP, portanto, na produção de energia, devido à diminuição de função mitocondrial causada pela ação de agentes oxidantes, levando à liberação de citocromo c e alteração de permeabilidade de membrana mitocondrial (CHANDRA; SAMALI; ORRENIUS, 2000; MCCONKEY, 1998). O processo apoptótico envolve a participação ativa das células afetadas na cascata de autodestruição que culmina em degradação do DNA via ativação de endonucleases, desintegração nuclear e formação de “corpos apoptóticos”. Estes corpos apoptóticos são rapidamente retirados do tecido por macrófagos e esta sinalização ocorre devido a translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana “marcando” as células que deverão ser fagocitadas (ARENDS et al., 1990; COMPTON, 1992; WYLLIE et al., 1980; WYLLIE, 1985).

O sistema nervoso central é especialmente sensível a sofrer lesões por estresse oxidativo e isto se dá por vários fatores. O SNC tem capacidade reduzida de regeneração celular devido à reposição de um neurônio ser um processo muito mais lento que a regeneração de outros tipos celulares. Desta forma, a morte de neurônios induzida por toxinas ou pelo processo normal de envelhecimento pode causar sérios comprometimentos ao sistema nervoso. Outro fator são as características intrínsecas do SNC e de seu metabolismo que o tornam mais propenso a danos causados por espécies oxidantes, como por exemplo, o consumo de oxigênio (O_2) pelo cérebro ser muito elevado (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2002) e a utilização extensa do glutamato como neurotransmissor (HALLIWELL, 2001). A grande demanda por O_2 deve-se ao alto consumo de ATP pelos neurônios, para manter o potencial de membrana e o fluxo de neurotransmissores (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2002).

A morte celular e disfunções metabólicas podem causar aumento de glutamato extracelular, elevando a concentração de cálcio (Ca^{+2}) intracelular a níveis patológicos. Isto resulta na superativação da fosfolipase A_2 e da óxido nítrico sintase

(NOS) neuronal, levando à liberação de ácidos graxos e produção elevada de óxido nítrico (NO•) (HALLIWELL, 2001).

1.4 SISTEMA CANABINÓIDE

Cânabis é a designação comum às plantas do gênero *Cannabis*, da família das Canabináceas, mais conhecida como cânhamo ou maconha. O Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), ou simplesmente THC, é o princípio ativo mais potente e é o responsável pelo efeito psicoativo da *Cannabis sativa* (MECHOULAM, 1970). Desde a caracterização do THC, vários estudos têm focado os seus efeitos psicotrópicos e terapêuticos como anti-emético, anti-convulsivante, anti-inflamatório e analgésico (AMERI, 1999; FRIDE et al., 2004; HOWLETT, 2002, 2004). Além disso, o potencial uso terapêutico da cânabis tem sido explorado em diversas patologias, tais como a epilepsia (CARLINI; CUNHA, 1981; CORTESI; FUSAR-POLI, 2007; CUNHA et al., 1980), transtorno bipolar (ASHTON et al., 2005), doença de Alzheimer (EUBANKS et al., 2006), como terapia substitutiva do alcoolismo e crack (LABIGALINI et al., 1999; SCHER, 1971), entre outros usos.

1.4.1 CANABINÓIDES ENDÓGENOS E RECEPTORES

O THC e os outros componentes canabinóides são moléculas lipofílicas que exercem seus efeitos centrais por se ligarem a receptores de membrana. O então denominado sistema endocanabinóide, constituído pelos componentes canabinóides endógenos, suas enzimas de síntese e degradação e seus receptores, parece desempenhar uma função modulatória em vários processos neurobiológicos, tais como funções motoras e cognitivas, anticoncepção, sono e comportamento alimentar (AMERI, 1999; FRIDE et al., 2004).

Três compostos canabinóides endógenos foram bem caracterizados até o momento: anandamida (etanol amida do ácido araquidônico), 2-araquidonoil-glicerol (2-AG – éster também derivado do ácido araquidônico) e 2-araquidonoil-glicerol-éter (éter derivado do ácido araquidônico). As concentrações dos tipos de canabinóides endógenos no sistema nervoso são diferentes sendo a de 2-AG 200 vezes maior que a de anandamida. Entretanto, no encéfalo a distribuição é muito semelhante, pois ambos existem em maiores concentrações no tronco encefálico, estriado e

hipocampo e em menores concentrações no córtex, diencéfalo e cerebelo (FRIDE, 2002).

De modo geral, os endocanabinóides são liberados por neurônios pós-sinápticos após uma estimulação, e agem nos receptores de neurônios pré-sinápticos, resultando em uma inibição da liberação de outros neurotransmissores, como, por exemplo, o GABA e o glutamato (FREUND et al., 2003; FREUND; HAJOS, 2003; HASHIMOTODANI et al., 2007).

Os efeitos dos canabinóides dependem em grande parte dos receptores canabinóides (CB) nomeados CB₁ (MATSUDA et al., 1990) e CB₂ (MUNRO et al., 1993). Esses receptores apresentam estrutura protéica de sete alças transmembrânicas e agem através de vias de transdução envolvendo a proteína G_{i/o} da superfamília das proteínas G, que diminui a atividade da adenililciclase resultando na redução dos níveis intracelulares de AMPc (FELDER et al., 1993; VOGEL et al., 1993). A ativação dos receptores CB₁ ainda pode aumentar a condutância ao K⁺ por interferir em canais de K⁺ do tipo A (HENRY; CHAVKIN, 1995) ou inibir diretamente a condutância ao Ca²⁺ através de canais de Ca²⁺ do tipo N (MACKIE; HILLE, 1992).

Os receptores canabinóides do tipo CB₁ estão entre os receptores mais abundantes no sistema nervoso e a sua distribuição foi bem caracterizada no encéfalo de ratos e humanos. Em estudo com métodos de auto-radiografia, hibridização *in situ* e imuno-histoquímica, as maiores densidades foram encontradas nos gânglios da base (substância negra, globo pálido, núcleo entopeduncular e estriado lateral) e no cerebelo. Altas densidades também foram encontradas nas células piramidais do hipocampo, no giro denteado e nas camadas I e IV do córtex e densidades intermediárias no núcleo acumbens (AMERI, 1999). Também foram descritas populações de CB₁ em astrócitos perivasculares (GLASS et al., 1997; HERKENHAM et al., 1991).

Os receptores canabinóides do tipo CB₂ foram primeiramente relacionados ao sistema imune (PAZOS et al., 2004). No sistema nervoso apresentam um aumento de sua expressão em microglia e astrócitos ativados em situações patológicas, participando do controle de produção local de mediadores inflamatórios, reduzindo os processos neuroinflamatórios. Assim, esses receptores participam de maneira importante de mecanismos que favorecem a sobrevivência neuronal (EHRHART et al., 2005; FERNANDEZ-RUIZ et al., 2000). Esses mecanismos

parecem envolver a regulação de fatores de transcrição (PANIKASHVILLI et al., 2005).

Outros estudos mostram que o endocanabinóide anandamida, além de ligar a receptores canabinóides CB₁ e CB₂, também se liga a outros receptores como VR1 (receptor vanilóide 1), TASK-1 (canal de potássio) e outros receptores não canabinóides acoplados à proteína G ainda não identificados (LUTZ, 2002; ROSS, 2003; SZALLASI; DI MARZO, 2000; VAN DER STELT; DI MARZO, 2005).

1.4.2 MECANISMOS DE AÇÃO DO SISTEMA CANABINÓIDE

Após uma estimulação, os endocanabinóides são liberados por neurônios pós-sinápticos e agem no receptor CB₁ de neurônios pré-sinápticos. Essa ligação desencadeia uma redução da liberação de outros neurotransmissores, como o GABA e o glutamato. Para inativar os endocanabinóides existe uma molécula transportadora de membrana, o transportador de anandamida da membrana celular (AMT), que os leva para dentro das células para que ocorra a degradação enzimática intracelular pela enzima ácido graxo amina hidroxilase (FAAH). O 2-AG também é captado pelo AMT e sofre degradação enzimática intracelular pela monoacilglicerol lipase (MAGL) ou pela FAAH (BASAVARAJAPPA, 2007; FREUND et al., 2003; FRIDE, 2002; HASHIMOTODANI et al., 2007).

Ao se ligarem aos receptores CB₁, os canabinóides endógenos desencadeiam uma série de mecanismos intracelulares característicos dos receptores acoplados à proteína G_{i/o}. A maioria dos autores descreve três eventos importantes (1) inibição da adenililciclase, levando a uma diminuição dos níveis de AMP_c intracelular e de proteínas quinases A; (2) estimulação de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP quinase); (3) inibição de canais de Ca²⁺ 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 do efluxo de potássio. As ações dos endocanabinóides nessas vias de sinalização provavelmente contribuem para uma redução na liberação de neurotransmissores em geral (DE PETROCELLIS et al., 2004; DI MARZO et al., 1998; LUTZ, 2002). (**Figura 1**)

Figura 1 - Bases moleculares da ação neuromoduladora dos endocanabinóides

No terminal pré-sináptico a anandamida e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) ativam os receptores CB_1 acoplados a proteína G, modulando a permeabilidade da membrana neuronal aos íons Ca^{2+} e K^+ e a atividade da adenilato ciclase (AC), afetando assim a liberação ou ação do neurotransmissor, ou ambos, e as neurotransmissões lenta e rápida. Dependendo do ensaio utilizado, o 1(3)-araquidonoil glicerol é equipotente ou levemente menos potente que o 2-isômero. Uma vez liberados pela despolarização dos neurônios, os dois compostos, devido às suas propriedades lipofílicas, podem se comportar como outros derivados do ácido araquidônico (AA), com sinais autócrinos ou parácrinos agindo nos mesmos neurônios ou em neurônios vizinhos ou em astrócitos. No hipocampo, a inibição da AC e como consequência da proteína cinase dependente de AMPc (PKA), também pode levar à modulação da plasticidade sináptica, por exemplo, através do aumento da fosforilação de tirosina e subsequente ativação da cinase+ de adesão focal (FAK+). Ativação da AC mediada por proteína G_s foi observada com a inibição de $G_{i/o}$ com toxina pertussis, e estimulação simultânea dos receptores D2 e CB_1 em fatias de estriado levando a estimulação de AC ao invés de inibição. Em fatias de hipocampo, uma potenciação direta de receptores NMDA pela anandamida também tem sido observada. Atuando em canais de K^+ acoplados ao receptor CB_1 , a anandamida pode também hiperpolarizar diretamente células musculares lisas. A anandamida também afeta as concentrações intracelulares de AA e Ca^{2+} nos astrócitos via mecanismos sensíveis à toxina pertussis. Abreviações: AA, ácido araquidônico; FAK+, cinase+ de adesão focal; PLA₂, Fosfolipase A₂; THC, $\Delta^9(-)$ -tetrahydrocannabinol.

Fonte: (DI MARZO et al., 1998).

1.4.3 SISTEMA CANABINÓIDE, NEUROPROTEÇÃO E NEURODEGENERAÇÃO

O sistema canabinóide vem sendo sugerido como um importante sistema neuroprotetor em diversos modelos de neurodegeneração (SHEN e THAYER, 1999) como, hipóxia aguda e epilepsia (WALLACE et al., 2003), isquemia cerebral (NAGAYAMA et al., 1999), lesão cerebral (PANIKASHVILI et al., 2001), excitotoxicidade (MARSICANO et al., 2003; VELDHUIS et al., 2003) e modelos de estresses oxidativos (MARSICANO et al., 2003). Alguns destes estudos têm mostrado tanto níveis elevados de endocanabinóides como aumento de expressão dos receptores CB₁ em modelos de lesões centrais em ratos e camundongos (HANSEN et al., 2001; PANIKASHVILI et al., 2001; VAN DER STELT et al., 2001). Por exemplo, Panikashvili et al. (2001) descrevem um possível envolvimento do endocanabinóide 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) na neuroproteção em estudos com camundongos, uma vez que os níveis desse endocanabinóide apresentam-se aumentados significativamente após lesão no encéfalo. Em alguns estudos os efeitos de neuroproteção foram atenuados pelo SR141716A, um antagonista do receptor CB₁, onde o efeito protetor parece estar relacionado com a inibição da liberação sináptica de glutamato, sugerindo a participação do receptor canabinóide nesse processo (JACKSON et al., 2005; PARMENTIER-BATTEUR et al., 2002; VAN DER STELT et al., 2002). O envolvimento dos receptores CB₁ e seus ligantes endógenos na neuroproteção também tem sido demonstrado em estudos com camundongos *knock-out* para o receptor CB₁, que apresentam maior susceptibilidade à neurodegeneração (MARSICANO et al., 2003; PARMENTIER-BATTEUR et al., 2002). Além disso, o mecanismo neuroprotetor dos canabinóides envolve a regulação da atividade de fatores de transcrição relacionados às citocinas (MOLINA-HOLGADO et al., 2007). Alguns estudos também têm investigado o papel neuroprotetor dos canabinóides em modelos *in vitro* (BOBROV et al., 2008; CHEN et al., 2005; GILBERT et al., 2007; KARANIAN et al., 2005; KIM et al., 2005; MARSICANO et al., 2002; ZHUANG et al., 2005), mas os resultados são conflitantes. Por exemplo, Jackson et al. (2004) investigaram o possível papel neuroprotetor do sistema canabinóide em culturas de células do telencéfalo de camundongos *knock-out* para o receptor CB₁, submetidas ao tratamento agudo com citocinas e observaram que essas células são mais susceptíveis à morte celular por apoptose. Outro estudo realizado com culturas de células de hipocampo de ratos submetidas à

toxicidade por AMPA mostra que a inibição do transporte e da degradação dos endocanabinóides, parece proteger as células e que esse efeito neuroprotetor é via receptor CB₁ que por sua vez mobiliza fatores neurotróficos responsáveis pela manutenção sináptica e sobrevivência celular (KARANIAN et al., 2005). Por outro lado, outro estudo mostra um efeito apoptótico do THC em cultura de córtex de ratos, onde parece haver um bloqueio do ciclo celular (DOWNER et al., 2003).

Muitos desses estudos atribuem os efeitos neuroprotetores dos canabinóides em modelos *in vitro* aos mecanismos dependentes dos receptores CB₁ relacionados à interação com a proteína quinase A (KIM et al., 2005) que pode resultar numa redução ou bloqueio da liberação do cálcio intracelular em condições neurotóxicas (ZHUANG et al., 2005). Guo e Ikeda em 2004 sugerem que a ativação dos receptores CB₁ inibe os canais de cálcio dependentes de voltagem talvez contribuindo para a redução da progressão da excitotoxicidade. Além disso, um dos mecanismos neuroprotetores do sistema canabinóide comumente proposto é a inibição da liberação de glutamato mediada pelo receptor CB₁ (JACKSON et al., 2005; TAKAHASHI; CASTILLO, 2006) possivelmente via mecanismo retrógrado (BREIVOGEL et al., 2004).

Os mecanismos moleculares subjacentes às propriedades neuroprotetoras dos canabinóides são bastante diversos e, freqüentemente, complementares. Estes incluem alguns eventos não mediados por receptores de canabinóides (antagonismo de receptores NMDA, propriedades antioxidantes) e outras, que são definitivamente mediadas tanto por receptor CB₁ como por CB₂, incluindo a sua capacidade para: (a) modular, via receptores CB₁ pré-sinápticos, as transmissões excitatórias glutamatérgicas e a plasticidade sináptica; (b) estimular a ação do GABA; (c) modular as respostas imunes e a liberação de mediadores inflamatórios via receptores CB₁, CB₂ e não CB₁/CB₂, localizados nos neurônios, astrócitos, microglia, macrófagos, neutrófilos e linfócitos; (d) ativar de vias de sinalização citoprotetoras; (e) modular a excitabilidade e a homeostase do Ca²⁺, através de ações sobre os canais do Ca²⁺, K⁺ e Na⁺, e receptores NMDA e; (f) melhorar o suprimento sanguíneo ao cérebro lesionado (DE LAGO et al., 2007) (**Figura 2**).

Figura 2 – Mecanismos Neurais e Gliais da Neuroproteção dos Canabinóides

Resumo esquemático dos mecanismos neuronais e gliais através dos quais canabinóides podem fornecer neuroproteção em distúrbios neurodegenerativos (VDCC= canais de cálcio dependentes de voltagem).

Fonte: (DE LAGO et al., 2007).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os processos de neurodegeneração representam um tema importante nas neurociências e o nosso grupo tem se envolvido ativamente nesses estudos (BRITTO et al., 1994; PIRES et al., 1998, 2000; TORRÃO; BRITTO, 2004), incluindo a participação do sistema canabinóide nos processos neurodegenerativos (CHAVES et al., 2008). Apesar de nos últimos anos muitos estudos sugerirem o papel protetor do sistema canabinóide em processos de morte celular, inclusive em doenças neurodegenerativas, os dados da literatura ainda são bastante controversos.

Uma vez que o encéfalo é especialmente vulnerável a danos dos radicais livres, o seu envelhecimento parece estar intimamente associado aos efeitos das ROS (NUNOMURA et al., 2006). Essa vulnerabilidade se deve ao seu alto consumo de oxigênio e o excesso de ROS leva à peroxidação de proteínas e lipídeos que resultam em efeitos deletérios celulares. O estresse oxidativo pode contribuir para degenerações neuronais, que são observadas nas doenças neurodegenerativas do sistema nervoso central, como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, e em condições patológicas como isquemia e lesão por trauma encefálico (CALDERÓN et al., 1999).

Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar os efeitos do estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) bem como a participação do sistema canabinóide, em uma linhagem de neuroblastoma (Neuro 2A), como forma de adicionar informações aos trabalhos *in vivo* que têm sido conduzidos pelo nosso grupo. A melhor compreensão destes mecanismos pode potencialmente contribuir para o entendimento de eventos relacionados à fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, bem como do potencial terapêutico de agentes canabinóides nesses processos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade das células após diferentes tempos de exposição a H_2O_2 ;
- Avaliar a viabilidade das células após a exposição com diferentes concentrações de H_2O_2 ;

- Avaliar a viabilidade das células após a exposição com o agonista (metanandamida) e/ou o antagonista (AM251) canabinóides;
- Avaliar o possível papel neuroprotetor do sistema canabinóide nas células expostas a H₂O₂.
- Avaliar proteínas de vias de sinalização relacionadas a mecanismos de morte/sobrevivência neuronal pelo método de *immunoblotting*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Utilizamos neste estudo a linhagem celular Neuro 2A (ATCC; Richmond, VA, USA) que é um clone derivado de um neuroblastoma espontâneo de camundongo (KLEBE; RUDDLE, 1969). Essas células produzem grandes quantidades de proteínas microtubulares, que participam do fluxo axoplasmático e da enzima de degradação da acetilcolina, a acetilcolinesterase, e expressam o receptor canabinóide CB₁ (JORDAN et al., 2005). Essa linhagem tem sido muito utilizada como modelo neuronal *in vitro* em estudos com diversos agentes indutores de toxicidade e de morte celular, inclusive os gerados pelo estresse oxidativo (CALDERÓN et al., 1999).

As células foram cultivadas em meio Dulbecco MEM (DMEM; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 10 U.I./ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomicina e 10% de SFB, 2 mM de glutamina e 5,6 mM de glicose, em uma incubadora com atmosfera umidificada a 37 °C de 5% de CO₂ por 2 dias antes dos tratamentos com H₂O₂ e o agonista e antagonista canabinóides, isoladamente ou conjugados. Cada experimento foi realizado em triplicatas.

3.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO E DE CONCENTRAÇÕES DE H₂O₂

Em uma primeira etapa fizemos a avaliação do tempo de resposta das células ao tratamento com H₂O₂. Após 48 horas do cultivo ($0,8 \times 10^6$), as células foram expostas a 250 µM de H₂O₂ e avaliadas depois de 6 e 12 horas quanto a viabilidade celular pelo ensaio de liberação de LDH. Esses tempos de tratamento com H₂O₂ foram escolhidos de acordo com dados da literatura utilizando a mesma linhagem celular (CALDERÓN et al., 1999; KLETTNER et al., 2001).

Após padronizar o tempo do tratamento das células com H₂O₂ (ver **Figura 3** em RESULTADOS), decidimos por utilizar nos tratamentos seguintes o tempo de 6 horas. Então, em uma etapa posterior, realizamos experimentos de curva concentração-resposta do H₂O₂, para determinar concentrações capazes de induzir morte moderada das células, uma vez que essa linhagem parece exibir um potente

mecanismo antioxidante (ROJO et al., 2008). Assim, as células (2×10^4) foram expostas a 50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM e 1 mM de H_2O_2 (ICHIMURA; KASAI, 1993; PAN et al., 2010), por 6 h e então analisadas pelos ensaios de LDH e MTT. A partir desses experimentos de curva concentração-resposta do H_2O_2 , decidimos por utilizar as concentrações de 250 μM e 500 μM de H_2O_2 (ver **Figura 4** em RESULTADOS).

3.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS COMPOSTOS CANABINÓIDES

Uma vez que os dados da literatura sobre os efeitos dos canabinóides são ainda controversos e que alguns têm mostrado efeitos apoptóticos destes compostos, como por exemplo, do THC em cultura de córtex de ratos (DOWNER et al., 2003), antes de conjugar o tratamento do H_2O_2 com os compostos canabinóides, avaliamos os efeitos per se desses compostos. A Metanandamida e o N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM251) são agonista e antagonista, respectivamente, do sistema canabinóide e foram adquiridos da Sigma, St. Louis, MO, USA. As células cultivadas da maneira anteriormente descrita, foram expostas a 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM e 10 μM por 6 horas e avaliadas pelos ensaios LDH e MTT.

Após avaliar os dados do tratamento das células com os canabinóides (ver **Figuras 5 e 6** em RESULTADOS), decidimos por utilizar nos tratamentos seguintes as concentrações de 1 μM e 2 μM de ambos, agonista e antagonista canabinóides.

3.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CONJUGADOS DO H_2O_2 E DOS COMPOSTOS CANABINÓIDES

Na tentativa de avaliar um possível efeito neuroprotetor do sistema canabinóide, realizamos então o tratamento conjugado de H_2O_2 a 250 μM e 500 μM e 1 μM e 2 μM dos compostos canabinóides por 6 horas. As células eram tratadas por 30 minutos com o agonista (metanandamida) e/ou o antagonista (AM251) canabinóide a 1 μM e 2 μM , diluídos em etanol ou DMSO, respectivamente, ou os veículos. As concentrações finais de etanol ou de DMSO não ultrapassaram 0,07%.

Após meia hora, as células eram expostas a 250 μ M e 500 μ M de H_2O_2 pelo período de 6 horas e avaliadas quanto a viabilidade celular pelos os ensaios de LDH e MTT.

3.5 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

A metodologia de análise empregada foi a de viabilidade celular pelo ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH; Roche, Mannheim, Germany) e do 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide – (MTT; Millipore Corporation, USA).

O ensaio de LDH se baseia na quantificação da liberação da enzima lactato desidrogenase citoplasmática liberada no meio de cultivo como consequência da ruptura da membrana plasmática gerada por um agente indutor de morte celular (KOH; CHOI, 1987). Em uma placa de ELISA foram utilizados 50 μ l de cada amostra em triplicatas e adicionado a elas 100 μ l de uma mistura contendo solução catalisadora (Mistura de NAD^+ / Diaforase) e solução cromófora (Cloreto de Iodo Tetrozólí e Lactato de Sódio) e incubada por 5 à 10 minutos na ausência de luz. Em seguida, foram adicionados 50 μ l da solução STOP (solução com pH ácido), sob agitação, cuja função é desnaturar a enzima. Após 10 segundos os valores de absorbância nos comprimentos de 490-492 nm foram determinados em um espectrofotômetro para placas (μ Quant, Biotek).

O ensaio de MTT é um método utilizado para mensurar a atividade da enzima que reduz MTT. É um dos métodos mais utilizados para determinar a sensibilidade das células ao estresse oxidativo (LIU et al., 1997; LIU; SCHUBERT, 1997; SHEARMAN et al., 1994), e detecta células vivas e não as mortas, onde o sinal gerado é dependente do grau de ativação das células (MOSMANN, 1983). Após o tratamento, o meio de cultura foi descartado e as células incubadas por 2 horas e 30 minutos com uma solução de MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide) a 5 mg/mL (em PB, 0,1 M; pH 7.4) diluída 10 vezes em meio DMEM sem soro. O sobrenadante foi então descartado e o produto dissolvido em DMSO. Os valores de absorbância nos comprimentos de 540-650 nm foram determinados em um espectrofotômetro para placas (μ Quant, Biotek).

3.6 IMMUNOBLOTTING

As células ($0,5-1,0 \times 10^6$ células/compartimento) dos experimentos de exposição ao H_2O_2 foram avaliadas pelo método de *immunoblotting*.

As células foram lavadas com PBS gelado e homogeneizadas em tampão Tris pH 7.4 , contendo 10% de glicerol, 1% de Nonidet P-40, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM e um coquetel de inibidores de proteases. Os homogenatos foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C e a concentração protéica do sobrenadante foi determinada usando-se uma solução para ensaio colorimétrico (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Amostras contendo 30-40 µg de proteína foram separadas por eletroforese em géis de acrilamida a 10% contendo dodecil sulfato de sódio. Após a separação eletroforética, as proteínas foram eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose e bloqueadas em solução de TBS contendo 0,1% de Tween 20 (TTBS) e 5% de leite desnatado durante pelo menos duas horas sob leve agitação. Após esse período, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos com TTBS e incubadas à 4 °C, durante toda a noite com os seguintes anticorpos: anti-iNOS (1:1.000; BD Biosciences Pharmingen), anti-nNOS (1:1.000; Chemicon International INC) e anti-β-actina (1:20.000; Sigma-Aldrich) como controle da quantidade de proteína. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos em TTBS e incubadas por 1 hora com um anticorpo secundário anti-coelho ou anti-camundongo conjugados com peroxidase (Vector) diluídos a 1:8.000. Novamente as membranas foram lavadas em TTBS por 3 vezes de 10 minutos e a ligação específica do anticorpo com a proteína revelada utilizando o kit quimioluminescente ECL (Amersham Biosciences). Finalmente, as bandas foram analisadas quanto à densidade óptica da imunorreatividade com o programa Scion Image 4,0,2 (Scion Corporation; Frederick, MD, USA).

4 RESULTADOS

4.1 VIABILIDADE CELULAR APÓS DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO H_2O_2

Com citado anteriormente, em uma etapa inicial as células foram expostas a concentração de 250 μM de H_2O_2 e avaliadas quanto a viabilidade celular pelo ensaio de liberação de LDH, após 6 e 12 horas. Esse protocolo de tratamento baseou-se em dados da literatura (CALDERÓN et al., 1999; KLETTNER et al., 2001) com a mesma linhagem celular.

Nossos resultados com esses períodos de exposição ao H_2O_2 mostraram uma resposta tempo-dependente nos níveis de morte celular. O controle apresentou 14,4% de morte celular, e os grupos expostos a 250 μM de H_2O_2 pelos períodos de 6 e 12 horas, apresentaram 30,6% e 45,7% de morte, respectivamente, em relação ao controle ($n=9$, $p<0,001$ H_2O_2 vs controle; $p<0,01$ 6 h vs 12 h; **Figura 3**).

Figura 3 - Análise da viabilidade celular pelo método de liberação de LDH, na linhagem Neuro-2A exposta a 250 μ M de H_2O_2 pelos períodos de 6 e 12 horas.

Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey. $n=9$, *** $p<0,001$ H_2O_2 vs controle; ** $p<0,01$ 6 horas vs 12 horas.

Fonte: (AUAD, 2012).

Com base nesses experimentos iniciais decidimos usar o tempo de exposição de 6 horas ao H_2O_2 nas etapas seguintes, quando se observa níveis de morte celular moderada, porém não muito extensa, o que acreditamos ser ideal para estudos de neuroproteção.

4.2 CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA DA EXPOSIÇÃO AO H₂O₂

De maneira geral, a exposição ao H₂O₂ gerou efeitos com característica concentração-dependente sobre a viabilidade da linhagem Neuro 2A, com um aumento progressivo e gradual da morte celular (**Figura 4**).

Os resultados apresentados na **Tabela 1** e na **Figura 4** ilustram os efeitos da exposição a 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM e 1 mM de H₂O₂ por 6 horas, sobre a viabilidade celular avaliada pelos métodos de LDH (**Figura 4A**) e de MTT (**Figura 4B**). A viabilidade celular não foi significativamente alterada após a exposição das células a 50 µM ou 100 µM de H₂O₂. Já a exposição a 250 µM, 500 µM e 1 mM de H₂O₂ quando comparadas ao controle causou 21,8%, 32,8% e 38,3% de morte celular quando avaliada pelo método de LDH. No entanto, valores muito maiores foram observados pelo método de MTT, onde o mesmo protocolo de exposição levou a morte de 28%, 56,3% e 65,1% das células quando comparadas ao controle.

Tabela 1 - Viabilidade celular avaliada pelos métodos de LDH e MTT, após a exposição a diferentes concentrações de H₂O₂.

Grupos	LDH % Morte Celular	n=9; <i>P</i>	MTT % Morte Celular	n=11; <i>P</i>
Controle	14,4			
50 µM	16,3	<i>p</i> >0,05	21,4	<i>p</i> >0,05
100 µM	21,8	<i>p</i> >0,05	19,7	<i>p</i> >0,05
250 µM	36,2	** <i>p</i> <0,01	42,4	*** <i>p</i> <0,001
500 µM	47,2	*** <i>p</i> <0,001	70,7	*** <i>p</i> <0,001
1 mM	52,7	*** <i>p</i> <0,001	79,5	*** <i>p</i> <0,001

Análise estatística por análise de variância ANOVA (uma via) com pós teste de Tukey.

Fonte: AUAD, 2012.

Figura 4 - Curva concentração-resposta do H_2O_2

As células foram expostas a 50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM e 1 mM de H_2O_2 , por 6 horas e avaliadas pelos métodos de liberação de LDH (**A**) e pelo método de redução do MTT (**B**). Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ vs controle; *** $p < 0,001$ vs controle.

Fonte: (AUAD, 2012).

4.3 CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA DA EXPOSIÇÃO AO AGONISTA E ANTAGONISTA CANNABINÓIDES

De maneira geral, os nossos resultados mostraram um efeito concentração-dependente dos compostos canabinóides sobre a viabilidade das células. Esses efeitos foram distintos quando se compara o agonista e o antagonista canabinóides. O antagonista apresentou efeitos negativos sobre a viabilidade celular já nas menores concentrações (**Figuras 5 e 6**).

Os resultados apresentados nas **Figuras 5 e 6** ilustram os efeitos da exposição a 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M e 10 μ M do agonista (metanandamida) e do antagonista (AM251) canabinóides por 6 horas, sobre a viabilidade celular avaliada pelos métodos de LDH (**Figuras 5A e 6A**) e de MTT (**Figuras 5B e 6B**).

A exposição das células às menores concentrações (0,5-2 μ M) de metanandamida não alterou a viabilidade celular de maneira significativa. Já as concentrações de 5 μ M e 10 μ M causou 9,4% (n=8, $p<0,05$ vs controle) e 15,1% (n=8, $p<0,001$ vs controle) de morte celular quando comparadas ao controle, pelo método de LDH. Como observado anteriormente, valores maiores de morte celular foram observados pelo método de MTT, onde o mesmo protocolo levou a morte de 26,6% (n=5, $p<0,01$ vs controle) e 55,8% (n=5, $p<0,001$ vs controle) das células quando comparados ao controle (**Figura 5**).

Diferente do observado para o agonista, nós observamos efeitos negativos sobre a viabilidade celular já com menores concentrações de AM251. As concentrações de 2 μ M e 5 μ M causaram 7,6% (n=5, $p<0,05$ vs controle) e 8,4% (n=5, $p<0,05$ vs controle) de morte celular quando comparadas ao controle, avaliada pelo método de LDH. Neste caso também, valores maiores de morte celular foram observados pelo método de MTT, onde o mesmo protocolo, comparados ao controle, levou a morte crescente de 11,7% (n=4, $p<0,05$ vs controle), 10,6% (n=4, $p<0,01$ vs controle), 13,3% (n=4, $p<0,01$ vs controle), 36,7% (n=4, $p<0,001$ vs controle) e 56% (n=4, $p<0,001$ vs controle) das células, em todas as concentrações testadas (**Figura 6**).

Figura 5 - Curva concentração-resposta da metanandamida

Curva Concentração-Resposta de Metanandamida

As células foram expostas a 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M e 10 μ M de metanandamida e avaliadas após 6 horas pelos métodos de liberação de LDH (**A**) e pelo método de redução do MTT (**B**). Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: (AUAD, 2012).

Figura 6 - Curva concentração-resposta do AM251

As células foram expostas a 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M e 10 μ M de AM251 e avaliadas após 6 horas pelos métodos de liberação de LDH (**A**) e pelo método de redução do MTT (**B**). Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: (AUAD, 2012).

4.4 EFEITOS DO TRATAMENTO CONJUGADO DE H_2O_2 COM CANABINÓIDES

Uma vez que os dois métodos de análise de viabilidade celular empregados em nosso estudo parecem gerar resultados algumas vezes discrepantes e baseado nos nossos resultados obtidos nos experimentos anteriores, definimos o seguinte protocolo para o tratamento conjugado de H_2O_2 e canabinóides: as células eram pré-tratadas com 1 μ M ou 2 μ M de metanandamida e AM251 por 30 minutos e expostas por 6 horas as concentrações de 250 μ M ou 500 μ M de H_2O_2 , e avaliadas quanto a viabilidade celular por LDH e MTT.

4.4.1 METANANDAMIDA

De maneira geral, os nossos resultados mostram que o pré-tratamento da linhagem Neuro 2A com o agonista canabinóide metanandamida foi capaz de resgatar as células da morte induzida pelo H_2O_2 .

Os resultados apresentados nas **Figuras 7 e 8** ilustram os efeitos da exposição a 250 μ M ou 500 μ M de H_2O_2 nas células pré-tratadas com 1 μ M ou 2 μ M do agonista (metanandamida) por 6 horas, sobre a viabilidade celular avaliada pelos métodos de LDH (**Figura 7**) e de MTT (**Figura 8**).

Os dados da análise do LDH mostraram que a exposição das células a 250 μ M e 500 μ M de H_2O_2 produziu 21,5% e 35,1% de morte celular quando comparados ao controle. No entanto, o pré-tratamento dessas células com 1 μ M de metanandamida, não foi capaz de reverter ou atenuar significativamente, em nenhum dos casos, a morte celular (**Figura 7A e B**). Por outro lado, o pré-tratamento com 2 μ M de metanandamida, foi capaz de reverter a morte das células expostas a 250 μ M de H_2O_2 praticamente aos valores do controle ($n=6$, $p<0,001$ Meta + H_2O_2 vs H_2O_2 ; **Figura 7C**). Além disso, esse efeito protetor foi inibido pela adição do antagonista do receptor CB_1 (AM251). Como observado anteriormente, a metanandamida aplicada isoladamente, não apresentou efeitos sobre a viabilidade celular em nenhuma das duas concentrações utilizadas. Os dados da análise do MTT mostraram novamente, níveis de morte celular mais elevados quando comparados aos valores obtidos pelo LDH, mas que seguiram na mesma direção. A exposição das células a 250 μ M e 500 μ M de H_2O_2 produziu 45,6% e 35,5% de

morte celular quando comparadas ao controle. O pré-tratamento dessas células com 1 μM de metanandamida, não foi capaz de reverter ou atenuar significativamente, em nenhum dos casos, a morte celular (**Figura 8A e B**). Por outro lado, e de acordo com os dados obtidos pelo método de LDH, o pré-tratamento com 2 μM de metanandamida, foi capaz de reverter parcialmente a morte das células expostas a 250 μM de H_2O_2 ($n=6$, $p<0,05$ Meta + H_2O_2 vs H_2O_2 ; **Figura 8C**). Como visto anteriormente, esse efeito protetor foi inibido pela adição do antagonista do receptor CB_1 (AM251).

Figura 7 - Tratamento conjugado de metanandamida e H_2O_2

H_2O_2 + Metanandamida (LDH)

As células foram tratadas com 1 μ M (A e B) ou 2 μ M (C e D) de metanandamida e após 30 minutos foram expostas a 250 μ M ou 500 μ M de H_2O_2 . A viabilidade celular foi avaliada após 6 horas pelo método de liberação de LDH. Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey. Estatisticamente significante ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.
Fonte: (AUAD, 2012).

Figura 8 - Tratamento conjugado de metanandamida e H₂O₂

H₂O₂ + Metanandamida (MTT)

As células foram tratadas com 1 μM (A e B) ou 2 μM (C e D) de metanandamida e após 30 minutos foram expostas a 250 μM ou 500 μM de H₂O₂. A viabilidade celular foi avaliada após 6 horas pelo método de liberação de LDH. Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey. Estatisticamente significante * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Fonte: (AUAD, 2012).

4.4.2 AM251

De maneira geral, os nossos resultados mostram que o pré-tratamento da linhagem Neuro 2A com o antagonista canabinóide não foi capaz de resgatar as células da morte induzida pelo H_2O_2 .

Os resultados apresentados nas **Figuras 9 e 10** ilustram os efeitos da exposição a 250 μM ou 500 μM de H_2O_2 nas células pré-tratadas com 1 μM ou 2 μM do antagonista (AM251) por 6 horas, sobre a viabilidade celular avaliada pelos métodos de LDH (**Figura 9**) e de MTT (**Figura 10**).

Os dados da análise do LDH mostraram que a exposição das células a 250 μM e 500 μM de H_2O_2 produziu 21,5% e 35,1% de morte celular quando comparada ao controle. No entanto, o pré-tratamento dessas células com 1 μM e 2 μM de AM251, não foram capazes de reverter ou atenuar significativamente, em nenhum dos casos, a morte celular (**Figura 9**). Os dados da análise do MTT mostraram novamente, níveis de morte celular mais elevados quando comparados aos valores obtidos pelo LDH, mas que seguiram na mesma direção. A exposição das células a 250 μM e 500 μM de H_2O_2 produziu 45,6% e 35,5% de morte celular quando comparadas ao controle. O pré-tratamento dessas células com 1 μM e 2 μM de AM251, não foram capazes de reverter ou atenuar significativamente, em nenhum dos casos, a morte celular (**Figura 10**).

Figura 9 - Tratamento conjugado de AM251 e H₂O₂

H₂O₂ + AM 251 (LDH)

Tratamento conjugado de AM251 e H₂O₂. As células foram tratadas com 1 μM (**A** e **B**) ou 2 μM (**C** e **D**) de AM251 e após 30 minutos foram expostas a 250 μM ou 500 μM de H₂O₂. A viabilidade celular foi avaliada após 6 horas pelo método de liberação de LDH. Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey. Estatisticamente significante ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: (AUAD, 2012).

Figura 10 - Tratamento conjugado de AM251 e H₂O₂

H₂O₂ + AM 251 (MTT)

As células foram tratadas com 1 μ M (**A** e **B**) ou 2 μ M (**C** e **D**) de AM251 e após 30 minutos foram expostas a 250 μ M ou 500 μ M de H₂O₂. A viabilidade celular foi avaliada após 6 horas pelo método de liberação de LDH. Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey. Estatisticamente significativa ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: (AUAD, 2012).

4.5 IMMUNOBLOTTING

Após os métodos de LDH e MTT com os tratamentos conjugados dos agentes canabinóides e H₂O₂, realizamos o método de *immunoblotting* nas amostras para 2 anticorpos: iNOS e nNOS. Com estes dois anticorpos não obtivemos resultados positivos (n=4).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, utilizamos um modelo *in vitro* de neuroblastoma como forma de avaliar um possível papel neuroprotetor do sistema canabinóide em uma condição de estresse oxidativo. Nós observamos que a metanandamida, um agonista canabinóide foi capaz de proteger as células da morte celular induzida pelo peróxido de hidrogênio.

O estresse oxidativo vem sendo muito estudado nos mecanismos de indução de morte celular por apoptose. Entender os fatores que contribuem para a indução e a progressão desse processo no sistema nervoso é de extrema importância para definir a etiologia das doenças neurodegenerativas. Tecidos em processo de morte celular por estresse oxidativo apresentam aumento de oxidação protéica e peroxidação lipídica, o que parece estar relacionado à presença de emaranhados neurofibrilares e de placas do peptídeo A β no encéfalo (PERRY et al., 2000). Além disso, alterações nos níveis das enzimas antioxidantes como as catalases, Cu/Zn-SOD e Mn-SOD, que teriam consequências sobre o metabolismo mitocondrial, observado em tecidos pós-morte e em modelos animais, sugerem que o estresse oxidativo possa constituir pelo menos parte do mecanismo relacionado à etiologia da doença de Alzheimer (AKSENOV et al., 1998; SCHUESSEL et al., 2006). Deste modo, a compreensão destes mecanismos tem sido amplamente investigada tanto em modelos *in vivo* como *in vitro*. Vários estudos têm utilizado o peróxido de hidrogênio em modelos de morte celular por estresse oxidativo (CALDERÓN et al., 1999; CHAN et al., 2009; CRISPO et al., 2010; KLETTNER et al., 2001; KWAK et al., 2007; PAN et al., 2010; ROJO et al., 2008; TANAKA et al., 2010). A utilização de modelos *in vitro* fornece uma série de vantagens e parece ser uma metodologia adequada para o entendimento dos mecanismos de morte celular e do papel protetor que alguns agentes podem desempenhar.

Neste contexto, na primeira etapa de nosso projeto, buscamos avaliar os efeitos do tratamento da linhagem Neuro 2A com H₂O₂ como um modelo de morte celular gerado por estresse oxidativo. Dados prévios da literatura mostraram que apenas o tratamento dessa linhagem com concentrações altas de H₂O₂, 1 mM e 50 mM, foram capazes de gerar 40% e 70% de morte celular, respectivamente, após 4 horas de exposição (CALDERÓN et al., 1999). Essas concentrações eram da ordem de 300 vezes maiores do que as necessárias para causar os mesmos efeitos na

linhagem de células cromafins tumorais PC12. Os autores sugeriram assim, que a linhagem Neuro 2A tem um sistema de defesa contra o estresse oxidativo mais eficiente, como altos níveis de GSH e, portanto, seria mais resistente ao tratamento com agentes geradores de ROS. No entanto, nós observamos níveis moderados de morte celular com concentrações menores de H_2O_2 . Aproximadamente 30% e 45% de morte celular já foi observada após a exposição a 250 μM de H_2O_2 depois de 6 e 12 horas, respectivamente. Como em nossos estudos, Klettner et al. (2001), diferentemente de Calderón et al. (1999), não puderam confirmar a resistência da linhagem Neuro 2A ao dano oxidativo e observaram que o tratamento com 200 μM de H_2O_2 foi capaz de gerar níveis de morte celular semelhantes aos encontrados por nós.

É importante ressaltar que em nossos estudos buscamos avaliar a viabilidade celular sempre utilizando dois métodos, o de liberação do LDH e o de redução do MTT, uma vez que o estresse oxidativo pode desencadear morte por apoptose ou necrose. O ensaio de LDH se baseia na quantificação da liberação da enzima lactato desidrogenase citoplasmática liberada no meio de cultivo como consequência da ruptura da membrana plasmática gerada por um agente indutor de morte celular. Este ensaio foi originalmente utilizado para avaliar morte neuronal por necrose (KOH; CHOI, 1987), mas posteriormente foi considerado sensível também para avaliar morte neuronal por apoptose em células corticais em cultivo (LOBNER, 2000). Já o ensaio de MTT é um método utilizado para mensurar a atividade da enzima que reduz MTT. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial pela medida da formação de um produto de cor escura gerado pela redução do MTT, que se acredita ocorrer principalmente na mitocôndria, fornecendo, portanto, uma medida da função mitocondrial. É um dos métodos mais utilizados para determinar a sensibilidade das células ao estresse oxidativo (LIU et al., 1997; LIU; SCHUBERT 1997; SHEARMAN et al., 1994), e detecta células vivas e não as mortas, onde o sinal gerado é dependente do grau de ativação das células (MOSMANN, 1983). Assim, de modo geral, o método de LDH parece ser mais indicado para avaliar morte por necrose e o MTT para morte por apoptose. Em nossos estudos, os níveis de morte celular obtidos pelo ensaio de MTT, foram sempre maiores do que os observados com a análise de LDH. Desta forma, ambos os métodos mostram-se complementares expressando vias de morte celular diferentes, o que nos auxiliou a sugerir que em nosso modelo ocorre um predomínio de morte por apoptose.

Os processos de neurodegeneração representam um tema importante nas neurociências e o entendimento de seus mecanismos pode propiciar o desenvolvimento de terapias para o tratamento de doenças neurodegenerativas. O sistema canabinóide tem sido implicado em processos neuroprotetores em diversos modelos de morte neuronal *in vivo* (NAGAYAMA et al., 1999; PANIKASHVILI et al., 2001; SHEN; THAYER, 1999; VELDHUIS et al., 2003; WALLACE et al., 2003) inclusive aqueles envolvendo modelos de estresse oxidativo (MARSICANO et al., 2003). Parte desses efeitos protetores parece ainda envolver a participação do receptor CB₁ (JACKSON et al., 2005; PARMENTIER-BATTEUR et al., 2002; VAN DER STELT et al., 2002). Esse papel neuroprotetor dos canabinóides também tem sido investigado em modelos *in vitro* (BOBROV et al., 2008; CHEN et al., 2005; GILBERT et al., 2007; KARANIAN et al., 2005; KIM et al., 2005; MARSICANO et al., 2002; ZHUANG et al., 2005), mas os dados da literatura são ainda bastante conflitantes.

Os mecanismos moleculares subjacentes às propriedades neuroprotetoras dos canabinóides incluem alguns eventos não mediados por receptores de canabinóides (antagonismo de receptores NMDA, propriedades antioxidantes) e outras, que são definitivamente mediadas tanto por receptor CB₁ como por CB₂ (DE LAGO et al., 2007). Os nossos resultados confirmam a participação do sistema canabinóide em processos de morte/sobrevivência neuronal e sugere o papel neuroprotetor do agonista metanandamida no modelo de estresse oxidativo. A metanandamida poderia modular, via receptores CB₁, a excitabilidade e a homeostase do Ca²⁺, através de ações sobre os canais do Ca²⁺, K⁺ e Na⁺, e receptores NMDA (DE LAGO et al., 2007), uma vez que a adição do antagonista reverte o efeito protetor. Outro estudo (MOVSESYAN et al., 2004) mostra que a anandamida (o análogo endógeno da metanandamida) provoca morte celular de neurônios corticais e de células granulares cerebelares de rato em cultura, de forma dependente da concentração. Como nossos resultados, os autores desse estudo observaram que concentrações mais altas do canabinóide geravam morte celular, porém esse efeito não era via receptores CB₁ ou CB₂. Não podemos excluir, no entanto, que os efeitos protetores observados por nós possa ser via outros receptores como, por exemplo, o receptor CB₂, não avaliado em nosso estudo.

Danos neuronais, como o estresse oxidativo, podem aumentar a produção de endocanabinóides (MARSICANO et al., 2003; STELLA et al., 1997) e células que

não expressam receptores CB₁ são mais vulneráveis ao dano celular (MARSICANO et al., 2003). Estes estudos indicam que canabinóides modificam as respostas sobre a sobrevivência neuronal e sugere que o sistema canabinóide pode oferecer proteção a consequências deletérias das moléculas patogênicas tal como A β . O aumento nos níveis do endocanabinóide 2-AG observado após indução da degeneração do hipocampo pelo A β , sugere o papel neuroprotetor do sistema canabinóide (VAN DER STELT et al., 2006). A anandamida também tem sido apontada como protetora em modelos de toxicidade gerada pelo A β *in vitro* e esse efeito parece ser via ativação de receptores CB₁ e as vias de regulação extracelular de quinases (MILTON, 2002). Os mecanismos neuroprotetores do sistema canabinóide incluem a regulação na atividade de fatores de transcrição que induzem as citocinas pro-inflamatórias como também a estimulação da produção de moléculas anti-inflamatórias (MOLINA-HOLGADO et al., 2007). Alguns canabinóides clássicos, como o canabidiol, Δ 9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC), cannabinol, nabilona, levonantradol, dexanabinol e outros, que contêm grupos fenólicos na sua estrutura química, são capazes de diminuir o estresse oxidativo (MARSICANO et al., 2002). Esses canabinóides são compostos antioxidantes potentes contra espécies reativas de oxigênio, formadas durante o metabolismo ou em várias patologias cerebrais crônicas, nas quais o estresse oxidativo representa um evento crítico na sua patogênese. Deve ser realçado que essas propriedades antioxidantes de alguns canabinóides específicos devem ser independentes do receptor CB₁ (CHEN et al., 2000; HAMPSON et al., 1998; MARSICANO et al., 2002). Hampson et al. (1998), usando culturas de neurônios corticais de rato expostos a níveis tóxicos de glutamato, verificou que tanto o Δ 9-THC como o canabidiol (CBD), geram neuroproteção através um mecanismo independente do receptor CB₁, presumivelmente baseado nas propriedades antioxidantes de ambos os compostos, que são quase equivalentes.

Guo e Ikeda em 2004 sugerem que a ativação dos receptores CB₁ inibe os canais de cálcio dependentes de voltagem talvez contribuindo para a redução da progressão da excitotoxicidade. Além disso, um dos mecanismos neuroprotetores do sistema canabinóide comumente proposto é a inibição da liberação de glutamato mediada pelo receptor CB₁ (JACKSON et al., 2005; TAKAHASHI; CASTILLO, 2006) possivelmente via mecanismo retrógrado (BREIVOGEL et al., 2004). A excitotoxicidade, refletida em níveis extracelulares excessivos de glutamato e

hiperativação de receptores de glutamato, principalmente o subtipo de receptor NMDA, que por sua vez promove o influxo de Ca^{2+} e conseqüente disrupção da homeostase do cálcio intracelular, é um evento crítico em neurodegeneração aguda ou crônica (DOBLE, 1999). A elevação mantida da concentração de Ca^{2+} intracelular induz apoptose, em parte por ativar a calcineurina que, por sua vez ativa a caspase 3 pró-apoptótica, através da proteína Bcl-2 e do citocromo c (POLSTER; FISKUN, 2004). Os agonistas canabinóides são capazes de fechar esses canais iônicos sensíveis à voltagem, reduzindo desta forma a grande corrente de Ca^{2+} e a ativação de cascatas citotóxicas dependentes de Ca^{2+} , prevenindo desta forma danos neuronais (FOWLER, 2007; GRUNDY et al., 2001; MECHOULAM et al., 2002). Em suporte a essa hipótese, vários estudos demonstraram que o aumento do influxo de Ca^{2+} produzido por diferentes estímulos neurotóxicos, foi reduzido por diferentes canabinóides (HAMPSON et al., 1998; SHEN; THAYER, 1998; VAN DER STELT et al., 2001; ZHUANG et al., 2005), e que a maioria desses efeitos foram revertidos pelo SR-14176, um antagonista do receptor CB_1 (HAMPSON et al., 1998; SHEN; THAYER, 1998; ZHUANG et al., 2005). Vários tipos de canais de cálcio, os do tipo N, L e P/Q estão acoplados aos receptores CB_1 , e são inibidos pela ativação desses receptores (PAN et al., 1996). Os agonistas canabinóides também afetam as correntes de K^+ através da abertura de canais retificadores de K^+ , um efeito que também poderá fazer parte da ação neuroprotetora dos canabinóides (VASQUEZ et al., 2003).

6 CONCLUSÕES

Com este estudo podemos concluir que a metanandamida, um agonista do sistema canabinóide, reduziu a morte celular da linhagem Neuro 2A induzida pelo estresse oxidativo. Este efeito protetor parece ser pelo menos em parte via receptores CB₁ expressos na linhagem Neuro 2A. O modelo *in vitro* utilizado em nossos estudos parece ser útil tanto para a avaliação de mecanismos relacionados aos processos neurodegenerativos, como para o entendimento da participação do sistema canabinóide nesses processos.

REFERÊNCIAS*

- AKSENOV, M. Y. et al. The expression of key oxidative stresshandling genes in different brain regions in Alzheimer's disease. **J. Mol. Neurosci.**, v. 11, p. 151-164, 1998.
- AMERI, A. The effects of cannabinoids on the brain. **Prog. Neurobiol.**, v. 58, p. 315-348, 1999.
- ARENDS, M. J.; MORRIS, R. G.; WYLLIE, A. H. Apoptosis: the role of the endonuclease. **Am. J. Pathol.**, v. 136, p. 593-608, 1990.
- ASHTON, C. H.; MOORE, P. B.; GALLAGHER, P.; YOUNG, A. H. Cannabinoids in bipolar affective disorder: a review and discussion of their therapeutic potential. **J. Psychopharmacol.**, v. 19, p. 293-300, 2005.
- BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. I. **DNA Repair**. Elsevier, v.3, p. 1109, 2004.
- BASAVARAJAPPA, B. S. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. Protein. **Pept. Lett.**, v. 14, p. 237-246, 2007.
- 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.
- BOBROV, M. Y.; LIZHIN, A. A.; ANDRIANOVA, E. L.; GRETSKAYA, N. M.; FRUMKINA, L. E.; KHASPEKOV, L. G.; BEZUGLOV, V. V. Antioxidant and neuroprotective properties of N-arachidonoyldopamine. **Neurosci. Lett.**, v. 24, p. 6-11, 2008.
- BREIVOGEL, C. S.; WALKER, J. M.; HUANG, S. M.; ROY, M. B.; CHILDERS, S. R. Cannabinoid signaling in rat cerebellar granule cells: G-protein activation, inhibition of glutamate release and endogenous cannabinoids. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 81-91, 2004.
- BRITTO, L. R.; TORRÃO, A. S.; HAMASSAKI-BRITTO, D. E.; MPODOZIS, J.; KEYSER, K. T.; LINDSTROM, J. M.; KARTEN, H. J. Effects of retinal lesions upon the distribution of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the chick visual system. **J. Comp. Neurol.**, v. 15, p. 473-484, 1994.
- 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.
- CARLINI, E. A.; CUNHA, J. M. Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 21, p. 417S-427S, 1981.

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

CASTELLANI, R. J.; MOREIRA, P. I.; LIU, G. et al. Iron: the redoxactive center of oxidative stress in Alzheimer disease. **Neurochem. Res.**, v. 32, p. 1640-1645, 2007.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Rad. Biol & Méd.**, n. 29, p. 323-333, 2000.

CHAN, K. C.; MONG, M. C.; YIN, M. C. Antioxidative and Anti-Inflammatory Neuroprotective Effects os Astaxanthin and Canthaxanthin in Nerve Growth Factor Differentiated PC12 Cells. **Journal of Food Science**, 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. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, p. 1626-1634, 2008.

CHEN, X.; HILLER, M.; SANCAK, Y.; FULLER, M. T. Tissue-specific TAFs counteract Polycomb to turn on terminal differentiation. **Science**, v. 4, p. 869-872, 2005.

CHEN, Y.; MCCARRON, R. M.; OHARA, Y.; BEMBRY, J.; AZZAM, N.; LENZ, F. A.; SHOHAMI, E.; MECHOULAM, R.; SPATZ, M. Human brain capillary endothelium: 2 arachidonoglycerol (endocannabinoid) interacts with endothelin-1. **Circ. Res.**, v. 87, p. 323-327, 2000.

COMPTON, M. M. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. **Cancer Metastasis Rev.**, n. 11, p. 105-119, 1992.

CORTESI, M.; FUSAR-POLI, P. Potential therapeutic effects of cannabidiol in children with pharmaco-resistant epilepsy. **Med. Hypotheses**, v. 68, p. 920-921, 2007.

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.

CUNHA, J. M.; CARLINI, E. A.; PEREIRA, A. E.; RAMOS, O. L.; PIMENTEL, C.; GAGLIARDI, R.; SANVITO, W. L.; LANDER, N.; MECHOULAM, R. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. **Pharmacology**, v. 21, p.175-185, 1980.

DE LAGO E.; FERNÁNDEZ-RUIZ J. J. Cannabinoids and Neuroprotection in Motor-Related Disorders, CNS & Neurological Disorders. **Drug Targets**, v. 6, p. 377-387, 2007.

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.

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

DOBLE, A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. **Pharmacol. Ther.**, v. 81, p. 163–221, 1999.

DOWNER, E. J.; FOGARTY, M. P.; CAMPBELL, V. A. Tetra-hydrocannabinol-induced neurotoxicity depends on CB₁ receptor mediated c-Jun N-terminal kinase activation in cultured cortical neurons. **Br. J. Pharmacol.**, v. 140, p. 547–557, 2005.

EHRHART, J.; OBERGON, D.; MRI, T.; HOU, H.; SUN, N.; BAI, Y. et al. Stimulation of CB₂ suppresses microglial activation. **J. Neuroinflamm.**, v. 12, p. 22-29, 2005.

EUBANKS, L. M.; ROGERS, C. J.; BEUSCHER, A. E. 4TH; KOOB, G. F.; OLSON, A. J.; DICKERSON, T. J.; JANDA, K. D. A molecular link between the active component of marijuana and Alzheimer's disease pathology. **Mol. Pharm.**, v. 3, p. 773-777, 2006.

FELDER, C. C.; BRILEY, E. M.; AXELROD, J.; SIMPSON, J. T.; MACKIE, K. E.; DEVANE, W. A. Anandamide, an endogenous cannabinimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 7656-7660, 1993.

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.

FERNANDEZ-RUIZ, J.; BERRENDERO, F.; HERNANDEZ, M. L.; JA, R. 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.

FOWLER, C. J. The contribution of cyclooxygenase-2 to endocannabinoid metabolism and action. **Br. J. Pharmacol.**, v. 152, p. 594-601, 2007.

FREUND, T. F.; HAJOS, N. Excitement reduces inhibition via endocannabinoids. **Neuron.**, v. 38, p. 362-365, 2003.

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

FRIDE, E. Endocannabinoids in the central nervous system – an overview. Prostaglandins Leukot Essent. **Fatty. Acids**, v.66, p. 221-233, 2002.

FRIDE, E.; FEIGIN, C.; PONDE, D. E.; BREUER, A.; HANUS, L.; ARSHAVSKY, N.; MECHOULAM, R. (+)-Cannabidiol analogues which bind cannabinoid receptors but exert peripheral activity only. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 506, p. 179-188, 2004.

GILBERT, G.; KIM, H.; WAATAJA, J.; THAYER, S. Delta9-tetrahydrocannabinol protects hippocampal neurons from excitotoxicity. **Brain Res.**, v. 12, p. 61-69, 2007.

GLASS, M.; DRAGUNOW, M.; FAULL, R. L. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. **Neuroscience**, v. 77, p. 299-318, 1997.

GRUNDY, R. I.; RABUFFETI, M.; BELTRAMO, M. Cannabinoids and neuroprotection. **Mol. Neurobiol.**, v. 24, p. 29-52, 2001.

GUO, J.; IKEDA, S. R. Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. **Mol. Pharmacol.**, v. 65, p. 665-674, 2004.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 2002.

HAMPSON, A. J.; BORNHEIM, L. M.; SCANZIANI, M.; YOST, C. S.; GRAY, A. T.; HANSEN, B. M.; LEONOUKAKIS, D. J.; BICKLER, P. E. Dual effects of anandamide on NMDA receptor mediated responses and neurotransmission. **J. Neurochem.**, v. 70, p. 671-676, 1998.

HAMPSON, A. J.; GRIMALDI, M.; AXELROD, J.; WINK, D. Cannabidiol and (-) Δ^9 tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 8268-8273, 1998.

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.

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

HENRY, D. J.; CHAVKIN, C. Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. **Neurosci. Lett.**, v. 186, p. 91-94, 1995.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; DE COSTA, B. R.; RICE, K. C. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat

brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. **J. Neurosci.**, v. 11, p. 563-583, 1991.

HOWLETT, A. C. The cannabinoid receptors. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 68-69, p. 619-631, 2002.

HOWLETT, A. C.; BARTH, F.; BONNER, T. I.; CABRAL, G.; CASELLAS, P.; DEVANE, W. A.; FELDER, C. C.; HERKENHAM, M.; MACKIE, K.; MARTIN, B. R.; MECHOULAM, R.; PERTWEE, R. G. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 54, p. 161-202, 2002.

HOWLETT, A. C. Efficacy in CB1 receptor-mediated signal transduction. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, p. 1209-1218, 2004.

ICHIMURA, K.; KASAI, K. A simple assay of peroxidase activity in cultured thyroid follicles using tetramethylbenzidine as substrate. **Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi.**, v. 69, p. 541-555, 1993.

IKEDA, K. et al. Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in chemically induced apoptosis of HL60 cells. **Biochem. Pharm.**, n. 57, p. 1361-1365, 1999.

JACKSON, S. J.; BAKER, D.; CUZNER, M.; L.; DIEMEL, L. T. Cannabinoid-mediated neuroprotection following interferon-gamma treatment in a three-dimensional mouse brain aggregate cell culture. **Eur. J. Neurosci.**, v. 20, p. 2267-2275, 2004.

JACKSON, S.; DIEMEL, L.; PRYCE, G.; BAKER, D. Cannabinoids and neuroprotection in CNS inflammatory disease. **J. Neurol. Sci.**, v. 15, p. 21-25, 2005.

JORDAN, J. D.; HE, J. C.; EUNG DAMRONG, N. J.; GOMES, I.; ALI, W.; NGUYEN, T.; BIVONA, T. G.; PHILIPS, M. R.; DEVI, L. A.; IYENGAR, 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.

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.

KARANIAN, D. A.; BROWN, Q. B.; MAKRIYANNIS, A.; KOSTEN, T. A.; BAHR, B. A. Dual Modulation of Endocannabinoid Transport and Fatty Acid Amide Hydrolase Protects against Excitotoxicity. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 7813-7820, 2005.

KIM, S. H.; WON, S. J.; MAO, X. O.; JIN, K.; GREENBERG, D. A. Involvement of protein kinase A in cannabinoid receptor-mediated protection from oxidative neuronal injury. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 313, p. 88-94, 2005.

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

KLETTNER, A.; BAUMGRASS, R.; ZHANG, Y.; FISCHER, G.; BÜRGER, E.; HERDEGEN, T.; MIELKE, K. The Neuroprotective actions of FK506 binding protein ligands: neuronal survival is triggered by de novo RNA synthesis, but is independent of inhibition of JNK and calcineurin. **Molecular Brain Research**, v. 97, p. 21-31, 2001.

KOH, J. Y.; CHOI, D. W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. **J. Neurosci. Methods**, v. 20, p. 83–90, 1987.

KWAK, M. K.; CHO, J. M.; HUANG, B.; SHIN, S.; KENSLER, T. W. Role of increase expression of the proteasome in the protective effects of sulforaphane against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in murine neuroblastoma cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 809-817, 2007.

LABIGALINI, E. J.; RODRIGUES, L. R.; DA SILVEIRA, D. X. Therapeutic use of cannabis by crack addicts in Brazil. **J. Psychoactive Drugs**, v. 31, p. 451-455, 1999.

LEUNER, K. et al. Mitochondrial dysfunction: the first domino in brain aging and Alzheimer's disease? **Antioxid Redox Signal**, v. 9, p. 1659–1675, 2007.

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

LIU, Y.; SCHUBERT, D. Cytotoxic Amyloid Peptides Inhibit Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction by Enhancing MTT Formazan Exocytosis. **J. Neuroche.**, v. 69, n. 6, p. 2285-2293, 1997.

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

LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? **Journal of Neuroscience Methods.**, v. 96, p. 147-152, 2000.

MACKIE, K.; HILLE, B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastomaglioma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 3825-3829, 1992.

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.

MARSICANO, G.; MOOSMANN, B.; HERMANN, H.; LUTZ, B.; BEHL, C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, p. 448–456, 2002.

MATSURA, T. et al. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL60 cells requires caspase-3 activation. **Free Rad. Res.**, n. 30, p. 73-83, 1999.

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.

MATTSON, M. P. et al. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. **Neuron**, v. 60, p. 748–766, 2008.

MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, n. 99, p. 157-168, 1998.

MECHOULAM, R. Marijuana Chemistry. **Science**, v. 168, n. 936, p. 1159-1166, 1970.

MECHOULAM, R.; PANIKASHIVILI, A.; SHOHAMI, E. Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. **Trends Mol. Med.**, v. 8, p. 58–61, 2002.

MECHOULAM, R.; SPATZ, M.; SHOHAMI, E. Endocannabinoids and neuroprotection. **Sci. STKE**, v. 129/RE5, 2002.

MILTON, N. G. N. Anandamide and noladin ether prevent excitotoxicity of the human amyloid- β -peptide. **Neurosci. Lett.**, v. 332, p. 127-130, 2002.

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

MOSMANN, B. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOVSESYAN, V. A.; STOICA, B. A.; YAKOVLEV, G. A.; KNOBLACH, S. M.; LEA, P. M.; CERNAK, I.; VINK, R.; FADEN, A. I. Anandamide-induced cell death in primary neuronal cultures: role of calpain and caspase pathways. **Cell Death and Differentiation**, v. 11, p. 1121-1132, 2004.

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

NAGAYAMA, T.; SINOR, A. D.; SIMON, R. P.; CHEN, J.; GRAHAM, S. H.; JIN, K.; GREENBERG, D. A. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 2987-2995, 1999.

NUNOMURA, A. et al. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 65, p. 631–641, 2006.

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

PAN, X.; IKEDA, S. R.; LEWIS, D. L. Rat brain cannabinoid receptor modulates N type Ca²⁺ channels in a neuronal expression system. **Mol. Pharmacol.**, v. 49, p. 707–714, 1996.

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.

PANIKASHVILI, D.; MECHOULAM, R.; BENI, S. M.; ALEXANDROVICH, A.; SHOHAMI, E. CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-kappa B inhibition. **J. Cereb. Blood. Flow. Metab.**, v. 25, p. 477-484, 2005.

PARMENTIER-BATTEUR, S.; JIN, K.; MAO, X.; XIE, L.; GREENBERG, D. Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 9771-9772, 2002.

PAZOS, M. R.; NUNEZ, E.; BENITO, C.; TOLON, R. M.; ROMERO, J. Role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: new perspectives. **Life Sci.**, v. 75, p. 1907-1915, 2004.

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

PIRES, R. S.; FERRO, E. S.; BRITTO, L. R. Expression of the AMPA-type glutamate receptor subunits in the chick optic tectum changes biphasically after retinal deafferentation. **Brain Res.**, v. 810, p. 283-287, 1998.

POLSTER, B. M.; FISKUM, G. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. **J. Neurochem.**, v. 90, p. 1281-1289, 2004.

ROJO, A. I.; SAGARRA, M. R.; CUADRADO, A. GSK-3 β down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. **J. Neurochem.**, v. 105, p. 192-202, 2008.

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

SCHER, J. Marijuana as an agent in rehabilitating alcoholics. **AM. J. Psychiatry**, v. 127, p. 971-972, 1971.

SCHUESSEL, K. et al. Aging sensitizes toward ROS formation and lipid peroxidation in PS1M146L transgenic mice. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 40, p. 850–862, 2006.

SHEARMAN, M. S.; RAGAN, C. I.; IVERSEN, L. L. Inhibition of PC-12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of β -amyloid-mediated cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 1470-1474, 1994.

SHEN, M.; THAYER, S. A. Delta9-tetrahydrocannabinol acts as a partial agonist to modulate glutamatergic synaptic transmission between rat hippocampal neurons in culture. **Mol. Pharmacol.**, v. 55, p. 8-13, 1999.

SHEN, M.; THAYER, S. A. Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. **Mol. Pharmacol.**, v. 54, p. 459-462, 1998.

SLATER, A. F. G. et al. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. **Toxicol. Letters**, n. 82/83, p. 149-153, 1995.

SPIRES, T. L.; HYMAN, B. T. Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. **NeuroRx**, v. 2, p. 423-437, 2005.

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

SZALLASI, A.; DI MARZO, V. New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. **Trends Neurosci.**, v. 23, p. 491-497, 2000.

TAKAHASHI, K. A.; CASTILLO, P. E. The CB1 receptor mediates glutamatergic synaptic depression in the hippocampus. **Neuroscience**, v. 139, p. 795–802, 2006.

TANAKA, A.; HAMADA, N.; FUJITA, Y.; ITOH, T.; NOZAWA, Y.; LINUMA, M.; ITO, M. A novel kavalactone derivative protects against H_2O_2 -induced PC12 cell death via Nrf2/ARE activation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 3133-3139, 2010.

TORRÃO, A. S.; BRITTO, L. R. Increased expression of nitric oxide synthase in visual structures of the chick brain after retinal removal. **J. Neurosci. Res.**, v. 78, p. 123-131, 2004.

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

VAN DER STELT, M.; MAZZOLA, C.; ESPOSITO, G.; MATHIAS, J.; PETROSINO, S.; DE FILIPPIS, D. et al. Endocannabinoids and β -amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 63, p. 1410-1424, 2006.

VAN DER STELT, M.; VELDHUIS, W. B.; BAR, P. R.; VELDINK, G. A.; VLIEGENTHART, J. F.; NICOLAY, K. Neuroprotection by D9-tetrahydrocannabinol,

the main active compound in marijuana, against ouabain-induced in vivo excitotoxicity. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 6475–6579, 2001.

VAN DER STELT, M.; VELDHUIS, W. B.; VAN HAAFTEN, G. W.; FEZZA, F.; BISOGNO, T.; BAR, P. R.; VELDINK, G. A.; VLIEGENTHART, J. F.; DI MARZO, V.; NICOLAY, K. Exogenous anandamide protects rat brain against acute neuronal injury in vivo. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 8765-8771, 2001.

VAN DER STELT, M.; VELDHUIS, W.; MACCARRONE, M.; BAR, P.; NICOLAY, K.; VELDINK, G.; DI MARZO, V.; VLIEGENTHART, J. Acute neuronal injury, excitotoxicity, and the endocannabinoid system. **Mol. Neurobiol.**, v. 26, p. 317-346, 2002.

VASQUEZ, C.; NAVARRO-POLANCO, R. A.; HUERTA, M.; TRUJILLO, X.; ANDRADE, F.; TRUJILLO HERNANDEZ, B.; HERNANDEZ, L. Effects of cannabinoids on endogenous K⁺ and Ca²⁺ currents in HEK293 cells. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 81, p. 436-442, 2003.

VELDHUIS, W. B.; VAN DER STELT, M.; WADMAN, M. W.; VAN ZADELHOFF, G.; MACCARRONE, M.; FEZZA, F.; VELDINK, G. A.; VLIEGENTHART, J. F.; BAR, P. R.; NICOLAY, K.; DI MARZO, V. Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in vivo excitotoxicity in the rat: role of vanilloid receptors and lipoxygenases. **J. Neurosci.**, v. 23, p. 4127-4133, 2003.

VOGEL, Z.; BARG, J.; LEVY, R.; SAYA, D.; HELDMAN, E.; MECHOULAM, R. Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. **J. Neurochem.**, v. 61, p. 352-355, 1993.

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. 129-37, 2003.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. K.; CURRIE, A. R. Cell Death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, n. 68, p. 251-305, 1980.

WYLLIE, A. H. The biology of cell death in tumors. **Anticancer Res.**, n. 5, p. 131-142, 1985.

ZHUANG, S. Y.; BRIDGES, D.; GRIGORENKO, E.; MCCLOUD, S.; BOON, A.; HAMPSON, R. E.; DEADWYLER, S. A. Cannabinoids produce neuroprotection by reducing intracellular calcium release from ryanodine-sensitive stores. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 1086-1096, 2005.