Gabriela Pena Chaves Kirsten

O receptor canabinóide CB_1 nos núcleos da base e a sua participação no processo degenerativo em modelos da Doença de Parkinson

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

São Paulo
2013

Gabriela Pena Chaves Kirsten

O receptor canabinóide CB_1 nos núcleos da base e a sua participação no processo degenerativo em modelos da Doença de Parkinson

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Andréa da Silva Torrão

Versão original.

São Paulo
2013

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

Chaves-Kirsten, Gabriela Pena.
O receptor canabinóide CB1 nos núcleos da base e a sua participação no processo degenerativo em modelos da Doença de Parkinson / Gabriela Pena Chaves-Kirsten. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Andréa da Silva Torrão.

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

Versão do título para o inglês: Cannabinoid receptor CB1 in the basal ganglia and its participation in the degenerative process in Parkinson's Disease models.

1. Neurofisiologia 2. Doença de Parkinson 3. Plasticidade neuronal 4. Sistema canabinóide 5. Receptor CB1 6. Núcleos da base 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/SBIB026/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gabriela Pena Chaves-Kirsten.

Título da Tese: O receptor canabinóide CB1 nos núcleos da base e a sua participação no processo degenerativo em modelos da Doença de Parkinson.

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

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

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

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) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.009 .12
WTL/mcgn

São Paulo, 06 de março de 2012.

REF.: Protocolo nº 027/09.

"O sistema canabinóide e seu possível papel neuroprotetor na doença de Parkinson induzida por 6-hidroxi-dopamina em ratos"

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 27.03.2015.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma.Sra.
Profa Dra.. Andréa da Silva Torrão
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Aos meus pais, Dilson e Rosana.

Aos meus irmãos, Alexandre e Carolina.

Ao meu marido Thiago.

AGRADECIMENTOS

Durante todo o processo dessa intensa caminhada eu pude contar com o apoio de diversas pessoas. Esse apoio veio de várias formas, como, por exemplo, auxílio nos experimentos, conselhos, conversas formais e informais, orientações intelectuais, ideias, discussões científicas, discussões filosóficas, entre outros. Por isso sei que eu não conseguiria desenvolver este trabalho sem essas preciosas ajudas e por este motivo tenho muitas pessoas a agradecer.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pois eu tenho muita fé que Ele estava o tempo todo olhando por mim, me ajudando a fazer as escolhas certas.

À minha orientadora Andréa da Silva Torrão, que esteve comigo desde meus primeiros passos na pesquisa e me recebeu no Laboratório de Comunicação Neuronal no Mestrado e agora do Doutorado, com muita solicitude, paciência e dedicação. A Andréa me mostrou o quanto é importante a boa relação orientador-aluno e o quanto é importante investirmos na nossa formação em diversos aspectos dentro da Universidade! Com certeza eu aprendi muita coisa ao longo desses quatro anos e levarei essa experiência para o resto de minha vida!

Ao meu marido Thiago, que é excelente em absolutamente TUDO o que faz! Obrigada por estar junto comigo nessa caminhada, por ser meu companheiro, meu amigo, meu equilíbrio, minha razão e meu exemplo de cientista! Com certeza as coisas ficaram muito mais fáceis por ter você ao meu lado!

Aos meus pais que sempre me ensinaram a fazer tudo com muito amor, respeito e responsabilidade. Obrigada pai e mãe, pela minha excelente formação, por me mostrarem que conseguimos tudo o que queremos com trabalho, esforço e dedicação! Obrigada ainda, pelo carinho e apoio durante esses quatro anos!

Aos meus familiares, Alexandre, Carolina, Denise e Alex, por me apoiarem quando necessário e por fazerem os meus dias mais felizes com a convivência em família. Agradeço ainda ao meu afilhado Antônio, que me mostra o valor das coisas importantes da vida! Agradeço também aos meus mais novos familiares da família Kirsten, por todo o carinho e apoio! E aos meus “filhos”, Queri, Mudela, Juma, Theo e Darwin pelo amor incondicional e por me deixarem mais feliz só de olhar pra eles!

Ao professor Luiz R. G. Britto, grande profissional, pelo apoio, atenção e paciência de sempre! Ele foi o responsável pela minha iniciação na pesquisa me acolhendo em seu

laboratório para uma iniciação científica e essa acolhida permaneceu durante o Mestrado e agora o Doutorado.

Ao técnico do laboratório do professor Britto, Adilson, pela paciência e auxílio em diversos procedimentos. Agradeço ao Adilson ainda, por tornar o ambiente de trabalho mais descontraído e bem menos estressante, graças ao seu bom humor!

À técnica do laboratório de Comunicação Neuronal, Andressa, por cuidar do laboratório e, apesar do pouco tempo de convivência, por me ajudar em diversos aspectos.

Aos meus colegas do Laboratório de Comunicação Neuronal, Hadassa, Caio, Luciana, Monalisa, Taísa, Bruna, Priscila, Luna, pela boa convivência no laboratório e pelas horas de discussões/conversas formais e informais.

Aos meus colegas do laboratório de Neurobiologia Celular e colaboradores, Daniel, Marina, Rosana, Ana, Rafaela, Érika, Kallene, Vivian, Cecília, Mauro, Carol Real, Carol Alencar, Vivian, Priscila, Jáfia, Katherine, Danilo, André, Graziela, Angélica (Juju), Juliana, Samira e Raquel, que tornaram os meus dias de trabalho mais agradáveis e prazerosos.

Agradeço a Ana, a Marina, a Hadassa e ao Caio pela excelente amizade, que vai muito além das paredes do laboratório! Obrigada queridos amigos pelas intermináveis horas de conversa, pelos cafés, pelos desabafos, pela cumplicidade, pelas risadas, pelos conselhos, pelas discussões científicas e não científicas!

Agradeço aos colegas que colaboraram diretamente com meu trabalho. Agradeço a Carol Real pela colaboração na padronização do modelo animal da Doença de Parkinson; ao Caio pelas colaborações com os estudos de imunofluorescência e de decurso temporal; a Hadassa por todo apoio com a cultura de células; e a Bruna pela ajuda com experimentos de imunohistoquímica nos estudos de decurso temporal.

À Profa. Maria Martha Bernardi e ao Prof. Luciano Freitas Felício do departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP) por emprestarem gentilmente a arena de Campo Aberto e o aparelho Rota Count. Agradeço a Profa. Martha ainda pelo carinho e pelas oportunidades de colaborações!

À Profa. Rosana Camarini do departamento de farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP), e à Profa. Sara Joyce Shammah Lagnado do departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB, pelos espaços concedidos em seus laboratórios para o desenvolvimento dos testes comportamentais.

À Profa. Nancy Amaral Rebouças do departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB, pelo uso da sala de revelação.

Ao Roberto Cabado, técnico do Laboratório de Microscopia Confocal do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB, pelas preciosas ajudas na microscopia confocal.

Aos componentes da banca de qualificação, Profa. Sara Lagnado, Dra. Rosana Pagano e Prof. Emer Ferro pelas contribuições para a finalização deste trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB em especial aos funcionários do biotério, que sempre cuidaram muito bem de nossos animais! E aos funcionários das secretarias do departamento e da pós-graduação sempre muito solícitos e prontos para ajudar com as documentações necessárias.

Aos vários animais que foram essenciais para o desenvolvimento da pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisado Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos auxílios financeiros, sem os quais este projeto não seria desenvolvido.

A todos os parentes e amigos que tornaram a vida mais agradável e a todos aqueles que apesar de não terem sido mencionados individualmente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!!!

“A ciência não é uma ilusão, mas seria uma ilusão acreditar que poderemos encontrar noutro lugar o que ela não nos pode dar”

Sigmund Freud

RESUMO

CHAVES-KIRSTEN, G. P. **O receptor canabinóide CB_1 nos núcleos da base e a sua participação no processo degenerativo em modelos da Doença de Parkinson.** 2013. 162 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O sistema canabinóide parece exercer um papel modulador em vários processos neurobiológicos, incluindo processos de neuroproteção, neurodegeneração e plasticidade neuronal. Os receptores canabinóides to tipo 1 (CB_1) são abundantemente expressos nos núcleos da base, porém existem poucos estudos morfológicos detalhados a respeito da localização exata do CB_1 nessa circuitaria. Além disso, este sistema tem sido explorado no contexto da Doença de Parkinson (DP), a segunda doença neurodegenerativa mais comum, e que tem como principal circuitaria afetada os núcleos da base. Dados atuais sobre a modulação do CB_1 em diferentes fases da DP, a relação do sistema canabinóide com outros neurotransmissores, bem como a participação de agentes canabinóides no processo de degeneração ou neuroproteção da DP são bastante controversos. Assim este trabalho teve como objetivos (1) investigar a localização dos receptores CB_1 nos núcleos da base de ratos, (2) avaliar o decurso temporal da expressão dos receptores CB_1 e de marcadores dos sistemas dopaminérgico e GABAérgico em um modelo experimental da DP *in vivo* e, (3) avaliar os efeitos do tratamento com compostos canabinóides em modelos experimentais da DP *in vivo* e *in vitro*. Assim em uma primeira etapa investigamos nos núcleos da base (estriado, substância negra – SN, globo pálido externo – GPe e globo pálido interno - GPi) de ratos intactos, o padrão de distribuição do receptor CB_1 com marcadores de células da glia (astrócitos, microglia e oligodendrócito), de elementos estruturais neurônios (axônios e dendritos), de neurônios dopaminérgicos (TH- tirosina hidroxilase) e de neurônios GABAérgicos (proteínas ligantes de cálcio parvalbumina e calbindina), através de estudos de dupla-marcação com imunofluorescência. Avaliamos o decurso temporal da expressão de $CB_{1,}$ TH, GABA, GAD (descarboxilase do ácido glutâmico), calbindina e parvalbumina nos núcleos da base, por imunohistoquímica e/ou *immunoblotting*, em ratos submetidos à injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA (modelo de DP *in vivo*). Neste mesmo modelo investigamos as alterações comportamentais motoras e histológicas após o tratamento com ACEA (agonista do receptor CB_1) e com AM 251 (antagonista do receptor CB_1). E por fim, avaliamos a viabilidade celular após o tratamento com ACEA, AM 251, AM 404 (inibidor da recaptação de anandamida – canabinóide endógeno) e canabidiol em uma linhagem de neuroblastoma (neuro-2a) diferenciada em neurônios dopaminérgicos e exposta á 6-OHDA (modelo de DP *in vitro*). O estudo de dupla-marcação mostrou que o receptor CB_1 é predominantemente expresso em neurônios nos núcleos da base principalmente em neurônios GABAérgicos. Além disso, no GPe e GPi, encontramos evidências da presença de CB_1 em dendritos. Nos nossos estudos de decurso temporal, observamos um aumento da expressão de CB_1 no GPe em períodos pós-lesão mais curtos, e uma diminuição progressiva na SN e GPi. Nenhuma alteração da expressão do CB_1 ao longo do tempo foi observada no estriado. Não houve variação da expressão de GABA, GAD e parvalbumina em nenhuma dos períodos pós-lesão estudados. Houve aumento de calbindina no estriado nos períodos mais curtos pós-lesão, e diminuição na SN nos períodos mais longos pós-lesão. Os níveis de TH diminuíram no estriado e SN. O tratamento com ACEA nesse modelo de DP parece ter sido prejudicial à lesão, observado tanto nas análises neuroquímicas (discreta diminuição de TH na SN), como nas análises comportamentais. Por outro lado, o tratamento com AM 251, embora não tenha gerado

diferenças neuroquímicas, gerou melhoras nos testes comportamentais. Por fim, dentre os tratamentos com agentes canabinóide em nosso modelo *in vitro*, o AM 404 mostrou uma discreta redução dos níveis de morte celular. Nossos resultados tomados em conjunto mostram a importância do sistema canabinóide na circuitaria dos núcleos da base. O receptor CB_1 é abundantemente expresso nessa circuitaria e parece estar localizado principalmente em neurônios GABAérgicos. No modelo de DP *in vivo* a variação complexa e diferenciada da expressão de CB_1 e calbindina nas diferentes estruturas dos núcleos da base ao longo do tempo, sugerem uma resposta dos neurônios GABAérgicos frente a falta de dopamina, que acreditamos estar relacionada a eventos de neuroplasticidade. Este dado é reforçado ainda, pelo fato de que a ativação aguda do CB_1 parece ter sido prejudicial à lesão, enquanto o bloqueio desse receptor mostrou melhoras comportamentais.

Palavras-chave: Sistema canabinóide. Receptor $CB_{1.}$ Núcleos da base. Doença de Parkinson. 6-OHDA. Neuroplasticidade.

ABSTRACT

CHAVES-KIRSTEN, G. P. **Cannabinoid receptor CB_1 in the basal ganglia and its participation in the degenerative process in Parkinson's Disease models.** 2013. 162 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The cannabinoid system seems to play a modulatory role in several neurobiological processes, including processes of neuroprotection, neurodegeneration and neuronal plasticity. Cannabinoid receptors type 1 (CB_1) are abundantly expressed in the basal ganglia, but there are few detailed morphological studies regarding the exact location of CB_1 in this circuitry. Moreover, this system has been explored in the context of Parkinson's Disease (PD), the second most common neurodegenerative disease, which has the basal ganglia as main circuitry affected. Current data on the modulation of CB_1 in different stages of PD, the relationship between the cannabinoid system with other neurotransmitters, as well as the involvement of cannabinoid agents in the process of degeneration or neuroprotection in the PD are quite controversial. Thus this study aimed to (1) investigate the localization of CB_1 receptors in the basal ganglia of rats, (2) evaluate the time course expression of CB_1 receptors and markers of dopaminergic and GABAergic systems in an *in vivo* experimental model of PD and, (3) evaluate the effects of treatment with cannabinoid compounds in *in vivo* and *in vitro* experimental models of PD. Thus in a first stage we investigated in the basal ganglia (striatum, substantia nigra - SN, external globus pallidus - EGP and internal globus pallidus - IGP) of intact rats, the distribution pattern of CB_1 receptor with markers for glial cells (astrocytes, oligodendrocyte and microglia), for structural neurons elements (axons and dendrites), for dopaminergic neurons (tyrosine hydroxylase, TH) and GABAergic neurons (calcium binding proteins parvalbumin and calbindin) by double-labeling studies with immunofluorescence. We evaluated the time course expression of CB_1, TH, GABA, GAD (glutamic acid decarboxylase), calbindin and parvalbumin in the basal ganglia, by immunohistochemistry and/or immunoblotting in rats subjected to unilateral intrastriatal injection of 6-OHDA (*in vivo* model of PD). In this same model we investigate the behavioral motor and histological changes following treatment with ACEA (CB_1 receptor agonist) and AM 251 (CB_1 receptor antagonist). Finally, we evaluated the cell viability after treatment with ACEA, AM 251, AM 404 (endogenous cannabinoid anandamide transport inhibitor) and cannabidiol in neuroblastoma (neuro-2A) cells differentiated into dopaminergic neurons and exposed to 6-OHDA (*in vitro* model of DP). Study of double-labeling showed that the CB_1 receptor is predominantly expressed in neurons in the basal ganglia, mainly in GABAergic neurons. Furthermore, IGP and EGP, we found evidence for the presence of CB_1 in dendrites. In our time course studies, we observed an increased expression of CB_1 in EGP in shorter periods post-lesion, and a progressive decrease in the SN and IGP. No change in the expression of CB1 over time was observed in the striatum. There was no variation in the expression of GABA, GAD and parvalbumin in any post-lesion periods studied. There was an increase in calbindin in the striatum in shorter periods post-lesion and a reduction in the SN in longer periods post-lesion. The TH levels decreased in the striatum and SN. Treatment with ACEA in this PD model seems to be harmful to the lesion, observed in both, neurochemical analysis (discrete TH decrease in SN), and in behavioral analysis. Moreover, treatment with AM 251, although no neurochemical differences were observed, it generated improvement in behavioral tests. Lastly, among the

treatments with cannabinoid agents in our *in vitro* model, the AM 404 showed a slight reduction in the cell death levels. Our results taken together show the importance of cannabinoid system in the basal ganglia circuitry. The CB_1 receptor is abundantly expressed in this circuitry and seems to be located mainly in GABAergic neurons. In the *in vivo* PD model the complex and differentiated variation of CB_1 and calbindina expression in the different structures of the basal ganglia over time, suggests a response of GABAergic neurons to the lack of dopamine, which we believe to be related to neuroplasticity events. This finding is reinforced further by the fact that acute activation of CB_1 seems to have been detrimental to the lesion, while the receptor blockade showed behavioral improvements.

Keywords: Cannabinoid system. CB_1 receptor. Basal ganglia. Parkinson's Disease, 6-OHDA. Neuroplasticity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismos de ação dos canabinóides..... 34

Figura 2 - Esquema simplificado da organização funcional dos núcleos da base..... 37

Figura 3 - Esquema dos estudos de dupla-marcação de CB_1 com diferentes marcadores nos núcleos da base de ratos naïve (bloco I)..... 59

Figura 4 - Esquema dos estudos de decurso temporal de diferentes proteínas em ratos submetidos à injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA (bloco II)..... 60

Figura 5 - Esquema dos estudos dos tratamentos com compostos canabinóides em ratos submetidos à injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA (bloco III)..... 61

Figura 6 - Esquema dos estudos dos tratamentos com compostos canabinóides na linhagem de células neuro-2a diferenciadas em neurônios dopaminérgicos pelo composto dibutiril AMP cíclico (bloco IV)..... 62

Figura 7 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de astrócitos nos núcleos da base..... 64

Figura 8 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de micróglia nos núcleos da base..... 65

Figura 9 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de oligodendrócito nos núcleos da base..... 66

Figura 10 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de PAN (marcador de axônios) nos núcleos da base..... 67

Figura 11 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de MAP-2 (marcador de dendritos) nos núcleos da base..... 68

Figura 12 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de tirosina hidroxilase (TH) nos núcleos da base..... 69

Figura 13 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de Parvalbumina (PV) nos núcleos da base..... 70

Figura 14 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de calbindina nos núcleos da base..... 72

Figura 15 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de TH no estriado de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão..... 74

Figura 16 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de TH no estriado de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 60 dias pós-lesão..... 75

Figura 17 - Níveis proteicos de TH no estriado de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por *immunoblotting*..... 76

Figura 18 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de TH na SNpc de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão..... 79

Figura 19 - Expressão de TH na SNpc de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica..... 80

Figura 20 - Níveis proteicos de TH na SN de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por *immunoblotting*..... 82

Figura 21 - Expressão de CB_1 no estriado de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica..... 83

Figura 22 - Expressão de CB_1 no GPe de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica..... 84

Figura 23 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 no GPe de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão..... 85

Figura 24 - Expressão de CB_1 no GPi de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica..... 87

Figura 25 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 no GPi de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão 88

Figura 26 - Expressão de CB_1 na SNpr de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica..... 90

Figura 27 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 na SNpr de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão..... 91

Figura 28 - Níveis proteicos de GAD no estriado de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por *immunoblotting*..... 93

Figura 29 - Níveis proteicos de GAD na SN de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por *immunoblotting*..... 94

Figura 30 - Contagem de células Calbindina-positivas no estriado de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica e expressa em porcentagem..... 96

Figura 31 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão Calbindina no estriado de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão..... 97

Figura 32 - Contagem de células Calbindina-positivas na SNpc de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica e expressa em porcentagem..... 98

Figura 33 - Expressão de Calbindina na SPpr de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica..... 100

Figura 34 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de Calbindina na SNpc e SNpr de animais submetidos

à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão..... 101

Figura 35 - Contagem de células Parvalbumina (PV)-positivas no estriado de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica e expressa em porcentagem..... 102

Figura 36 - Contagem de células Parvalbumina (PV)-positivas no GPe de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica e expressa em porcentagem..... 103

Figura 37 - Contagem de células Parvalbumina (PV)-positivas no GPi de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica e expressa em porcentagem..... 103

Figura 38 - Contagem de células Parvalbumina (PV)-positivas na SNpr de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica e expressa em porcentagem..... 104

Figura 39 - Níveis proteicos de TH no estriado de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação por *immunoblotting*..... 106

Figura 40 - Expressão de TH no na SN de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação por imunohistoquímica..... 107

Figura 41 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de TH na SNpc de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA..... 107

Figura 42 - Expressão de GFAP no na SN de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação por imunohistoquímica..... 108

Figura 43 - Expressão de OX-42 no na SN de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação por imunohistoquímica..... 109

Figura 44 - Resultados do efeito do tratamento com DMSO e ACEA na atividade geral avaliada em Campo Aberto e na rotação induzida por apomorfina de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA 8 dias após a lesão..... 110

Figura 45 - Resultados do efeito do tratamento com DMSO e ACEA na atividade geral avaliada em Campo Aberto e na rotação induzida por apomorfina de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA 15 dias após a lesão..... 111

Figura 46 - Níveis proteicos de TH no estriado de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação por *immunoblotting*..... 112

Figura 47 - Expressão de TH no na SN de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação por imunohistoquímica..... 113

Figura 48 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de TH na SNpc de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251..... 114

Figura 49 - Expressão de GFAP no na SN de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação por imunohistoquímica..... 115

Figura 50 - Expressão de OX-42 no na SN de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação por imunohistoquímica..... 116

Figura 51 - Resultados do efeito do tratamento com DMSO e AM 251 na atividade geral avaliada em Campo Aberto e na rotação induzida por apomorfina de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA 8 dias após a lesão..... 117

Figura 52 - Resultados do efeito do tratamento com DMSO e AM 251 na atividade geral avaliada em Campo Aberto e na rotação induzida por apomorfina de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA 15 dias após a lesão..... 117

Figura 53 - Curva concentração-resposta de 6-OHDA em linhagem de células Neuro-2a diferenciada com dbc-AMPc. Viabilidade celular analisada por MTT..... 118

Figura 54 - Curva concentração-resposta de canabidiol em linhagem de células Neuro-2a diferenciada com dbc-AMPc. Viabilidade celular analisada por MTT..... 119

Figura 55 - Curva concentração-resposta de AM 404 em linhagem de células

Neuro-2a diferenciada com dbc-AMPc. Viabilidade celular analisada por MTT..... 120

Figura 56 - Curva concentração-resposta de capsazepina em linhagem de células Neuro-2a diferenciada com dbc-AMPc. Viabilidade celular analisada por MTT..... 120

Figura 57 - Tratamento da linhagem de células Neuro-2a diferenciada com dbc-AMPc e exposta à 6-OHDA, grupo ACEA. Viabilidade celular analisada por MTT..... 121

Figura 58 - Tratamento da linhagem de células Neuro-2a diferenciada com dbc-AMPc e expostas à 6-OHDA, grupo canabidiol (CBD). Viabilidade celular analisada por MTT..... 122

Figura 59 - Tratamento da linhagem de células Neuro-2a diferenciadas com dbc-AMPc e expostas à 6-OHDA, grupo AM 404. Viabilidade celular analisada por MTT..... 123

Figura 60 - Tratamento da linhagem de células Neuro-2a diferenciada com dbc-AMPc e exposta à 6-OHDA, grupo AM 251. Viabilidade celular analisada por MTT..... 124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrão de distribuição do receptor CB_1 com marcadores gliais e neuronais..... 63

Tabela 2 - Níveis proteicos de TH no estriado de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica *immunoblotting* (n = 8)..... 75

Tabela 3 - Comparações entre os níveis proteicos de TH no estriado experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica immunoblotting (n = 6-8)..... 76

Tabela 4 - Expressão de TH na SNpc de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5)..... 77

Tabela 5 - Comparações entre a expressão de TH na SNpc experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica de imunohistoquímica (n = 5)..... 78

Tabela 6 - Níveis proteicos de TH na SN de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica *immunoblotting* (n = 8)..... 81

Tabela 7 - Comparações entre os níveis proteicos de TH na SN experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica *immunoblotting* (n = 6-8)..... 81

Tabela 8 - Expressão de CB_1 no GPe de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5)..... 83

Tabela 9 - Comparações entre a expressão de CB_1 no GPe experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica de imunohistoquímica (n = 5)..... 84

Tabela 10 - Expressão de CB_1 no GPi de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5)..... 86

Tabela 11 - Comparações entre a expressão de CB_1 no GPi experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica de imunohistoquímica (n = 5)..... 87

Tabela 12 - Expressão de CB_1 na SNpr de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5)..... 89

Tabela 13 - Comparações entre a expressão de CB_1 na SNpr experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica de imunohistoquímica (n = 5)..... 90

Tabela 14 - Contagem de células Calbindina-positivas no estriado de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5)..... 95

Tabela 15 - Comparações entre as contagens de células calbindina-positivas no estriado experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica de imunohistoquímica (n = 5)..... 95

Tabela 16 - Expressão de Calbindina na SNpr de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5)..... 99

Tabela 17 - Comparações entre a expressão de Calbindina na SNpr experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica de imunohistoquímica (n = 5)..... 99

Tabela 18 - Níveis proteicos de TH no estriado de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação pela técnica *immunoblotting* (n = 5)..... 105

Tabela 19 - Expressão de CB_1 TH na SN de ratos submetidos à indução de DP

por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5)..... 106

Tabela 20 - Expressão de GFAP na SN de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5)..... 108

Tabela 21 - Expressão de OX-42 na SN de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5)..... 109

Tabela 22 - Níveis proteicos de TH no estriado de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação pela técnica *immunoblotting* (n = 5)..... 112

Tabela 23 - Expressão de TH na SNpc de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5)..... 113

Tabela 24 - Expressão de GFAP na SN de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5)..... 115

Tabela 25 - Expressão de OX-42 na SN de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5)..... 116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2–AG - 2-araquidonoil-glicerol

6-OHDA - 6-hidroxi-dopamina

AA - ácido araquidônico

AC - adenilil ciclase

ACEA - araquidonil-2-cloroetilamida

AMT - transportador de anandamida da membrana celular

AP - ântero-posterior

CA - campo aberto

Calb - calbindina

CB - receptores canabinóide

CB_1 - receptor canabinóide tipo 1

CB_2 - receptor canabinóide tipo 2

CBD - canabidiol

CE - cápsula externa

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CPZ - capsazepina

D1 - receptor dopaminérgico 1

D2 - receptor dopaminérgico 2

DAG - diacilglicerol

DAGL - diacilglicerol -liapase

dbc AMPc - dibutiril AMP cíclico

DMSO - dimetilsulfóxido

DO - densidade óptica

DP - Doença de Parkinson

DPL - dias pós-lesão

DTT - ditiotreitol

EDL - estriado dorsolateral

EDTA - ácido dissódico etilenodiaminotetracético

ERK - quinase regulada por sinal extracelular

EST - estriado

FAAH - hidrolase de amida de ácido graxo

FAK - quinase de adesão focal

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisado Estado de São Paulo

FMVZ - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

GABA - ácido gama-aminobutírico

GAD - descarboxilase do ácido glutâmico

GFAP - *glial fibrillary acidic protein*

GP - globo pálido

GPe - globo pálido externo

GPi - globo pálido interno

GPs - globos pálidos

i.p. - intraperitoneal

ICB - Instituto de Ciências Biomédicas

IHQ - imunohistoquímica

IMB - *immunoblotting*

L- lateral

LPS - lipopolissacarídeo

MAGL - monoacilglicerol lipase

MAP quinase- proteínas quinases ativadas por mitógeno

MAP-2 - proteínas associadas ao microtúbulo

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

MTT - 3 - (4,5 diethylthiazolyl-2) -2,5-difeniltetrazoliumbromido)

NAPE - N-acilfosfatidiletanolamina

N-ArPE - N-araquidonilfosfatidiletanolamina

NAT - N-aciltransferase

Neuro-2a - neuroblastoma 2a

NST - núcleo subtalâmico

OD - oligodendrócito

OX-42 - marcador de micróglia

PAN - marcador de neurofilamentos

PB - tampão fosfato

PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase

PI-PLC - fosfatidil-inositol-fosfolipase C

PKA - proteína quinase A

PMSF - persulfato de amônio

PPAR - *peroxisome proliferator-activated receptor*

PV - parvabumina

SN - substância negra

SNC - sistema nervosa central

SNpc - substância negra porção compacta

SNpr - substância negra porção reticulada

SR141716A – rimonabanto

STN - *subthalamic nucleus*

TH- tirosina hidroxilase

TRPV1 - receptor vanilóide do tipo 1

TTBS - salina tamponada contendo Tween

USP - Universidade de São Paulo

V - ventral

VPT - Departamento de Patologia

Δ^9-THC-tetrahidrocanabinol

Δ^9-THCV – tetrahidrocanabivarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 30
1.1 Aspectos gerais..... 30
1.2 Sistema canabinóide..... 30
1.2.1 Canabinóides endógenos..... 30
1.2.2 Receptores canabinóides..... 31
1.2.3 Mecanismo de ação do sistema canabinóide..... 33
1.2.4 Canabinóides exógenos..... 35
1.3 O sistema canabinóide e os núcleos da base..... 36
1.4 Doença de Parkinson: modelo de doença neurodegenerativa dos núcleos da base..... 38
1.5 Sistema canabinóide e a Doença de Parkinson..... 40
1.6 Justificativa..... 43
2 OBJETIVOS..... 46
2.1 Objetivo geral..... 46
2.2 Objetivos específicos..... 46
2.2.1 Bloco I - Receptores canabinóides CB_1 nos núcleos da base: estudos de imunofluorescência..... 46
2.2.2 Bloco II - Avaliação do decurso temporal da expressão de diferentes proteínas no modelo experimental da Doença de Parkinson in vivo..... 46
2.2.3 Bloco III - Tratamentos com agonista e antagonista canabinóide no modelo experimental da Doença de Parkinson in vivo..... 47
2.2.4 Bloco IV - Estudos in vitro: cultura de células expostas à 6-OHDA e tratadas com diferentes compostos canabinóides..... 47
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 48
3.1 Estudos *in vivo*..... 48

3.1.1 Animais 48
3.1.2 Procedimento cirúrgico 48
3.1.3 Tratamento com canabinóides 49
3.1.3.1 Testes Comportamentais 50
3.1.3.1.1 Campo aberto 50
3.1.3.1.2 Teste de rotação induzida por apomorfina 50
3.1.4 Métodos histológicos 51
3.1.4.1 Perfusão transcardíaca 51
3.1.4.2 Imunofluorescência 51
3.1.4.3 Imunohistoquímica 52
3.1.4.3.1 Tirosina hidroxilase 53
3.1.4.3.2 CB_1 53
3.1.4.3.3 OX-42 e GFAP 53
3.1.4.3.4 Calbindina 54
3.1.4.3.5 Parvalbumina 54
3.1.4.4 Immunoblotting 54
3.2 Estudos *in vitro* 56
3.2.1 Linhagem Neuro-2a 56
3.2.2 Diferenciação da linhagem Neuro-2a em neurônios dopaminérgicos 56
3.2.3 Curva concentração-resposta de 6-OHDA e canabinóides 56
3.2.4 Indução de toxicidade por 6-OHDA e tratamento com canabinóides 57
3.2.5 Ensaio colorimétrico MTT – análise de viabilidade celular 57
3.3 Análises estatísticas 58
3.4 Delineamentos experimentais 59
3.4.1 Bloco I - Receptores canabinóides CB_1 nos núcleos da base: estudos de imunofluorescência 59
3.4.2 Bloco II: Avaliação do decurso temporal da expressão de diferentes proteínas no modelo experimental da Doença de Parkinson in vivo 59
3.4.3 Bloco III - Tratamentos com agonista e antagonista canabinóide no modelo experimental da Doença de Parkinson in vivo 60
3.4.4 Bloco IV - Estudos in vitro: cultura de células expostas à 6-OHDA e tratadas com diferentes compostos canabinóides 61
4 RESULTADOS 63

4.1 Bloco I - Receptores canabinóides CB_1 nos núcleos da base: estudos de imunofluorescência..... 63
4.2 Bloco II - Avaliação do decurso temporal da expressão de diferentes proteínas no modelo experimental da Doença de Parkinson *in vivo*..... 73
4.2.1 Decurso temporal da expressão de tirosina hidroxilase nos núcleos da base.. 73
4.2.2 Decurso temporal da expressão de CB_1 nos núcleos da base..... 82
4.2.3 Decurso temporal da expressão de GABA nos núcleos da base..... 92
4.2.4 Decurso temporal da expressão de GAD nos núcleos da base..... 92
4.2.5 Decurso temporal da expressão de Calbindina nos núcleos da base..... 94
4.2.6 Decurso temporal da expressão de Parvalbumina nos núcleos da base..... 102
4.3 Bloco III - Tratamentos com agonista e antagonista canabinóide no modelo experimental da Doença de Parkinson *in vivo*..... 104
4.3.1 Tratamento com ACEA..... 105
4.3.1.1 Estudos neuroquímicos..... 105
4.3.1.2 Estudos comportamentais..... 110
4.3.2 Tratamento com AM 251..... 111
4.3.2.1 Estudos neuroquímicos..... 111
4.3.2.2 Estudos comportamentais..... 116
4.4 Bloco IV - Estudos *in vitro:* cultura de células expostas à 6-OHDA e tratadas com diferentes compostos canabinóides..... 118
4.4.1 Curva concentração resposta de 6-OHDA..... 118
4.4.2 Curva concentração resposta de canabidiol..... 119
4.4.3 Curva concentração resposta de AM 404..... 119
4.4.4 Curva concentração resposta de capsazepina..... 120
4.4.5 Tratamento com ACEA em cultura exposta à 6-OHDA..... 121
4.4.6 Tratamento com canabidiol em cultura exposta à 6-OHDA..... 122
4.4.7 Tratamento com AM 404 em cultura exposta à 6-OHDA..... 122
4.4.8 Tratamento com AM 251 em cultura exposta à 6-OHDA..... 123
5 DISCUSSÃO..... 125
5.1 Bloco I - Receptores canabinóides CB_1 nos núcleos da base: estudos de imunofluorescência..... 125
5.2 Bloco II - Avaliação do decurso temporal da expressão de diferentes proteínas no modelo experimental da Doença de Parkinson *in vivo*..... 128

5.3 Bloco III - Tratamentos com agonista e antagonista canabinóide no modelo experimental da Doença de Parkinson *in vivo* 135
5.4 Bloco IV - Estudos *in vitro:* cultura de células expostas à 6-OHDA e tratadas com diferentes compostos canabinóides 140
5.5 Discussão geral 142
6 CONCLUSÕES 144
REFERÊNCIAS 146

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

A planta *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha, tem sido amplamente utilizada ao longo da história da humanidade com fins recreativos, devido a seus efeitos psicoativos, e também terapêuticos, antiemético, anticonvulsivante, analgésico e estimulante do apetite. No entanto, a legalização para o uso terapêutico tem sido alvo de grandes discussões, dado seu potencial abuso e desenvolvimento de tolerância. O princípio psicoativo da maconha, o Δ^9-tetrahidrocanabinol (Δ^9-THC), e os outros componentes canabinóides são moléculas lipofílicas que exercem seus efeitos centrais por se ligarem a receptores de membrana específicos (MECHOULAM; PARKER, 2013). O sistema canabinóide endógeno parece desempenhar uma função modulatória em vários processos neurobiológicos, tais como funções motoras e cognitivas, antinocicepção, sono e comportamento alimentar, como sugerido pela distribuição anatômica de seus receptores e pelos efeitos farmacológicos bem conhecidos dos compostos relacionados aos canabinóides (AMERI, 1999; FERNANDÉZ-RUIZ et al., 2000; FRIDE; SHOHAMI, 2002; HOWLETT et al., 2002, 2004; PERTWEE, 1997, 2001). Vários estudos também apontam os canabinóides endógenos como moduladores dos processos ontogenéticos do encéfalo (BEGBIE; DOHERTY; GRAHAM, 2004; FERNANDÉZ-RUIZ et al., 2000; LEONELLI et al., 2005; RAMOS et al., 2002), propriedades neuroprotetoras em diversos modelos de neurotoxicidade (GRUNDY; RABUFFETTI; BELTRAMO, 2001; MATO; DEL OLMO; PAZOS, 2003; PARMENTIER-BATTEUR et al., 2002; VAN DER STELT et al., 2002, 2005) e como mediador de processos de plasticidade em diversas estruturas do sistema nervoso central (ALVARES et al., 2006; CHAVES et al., 2008; HASHIMOTODAN; OHNO-SHOSAKU; KANO, 2007; TAGLIAFERRO et al., 2006).

1.2 Sistema canabinóide

1.2.1 Canabinóides endógenos

Três compostos canabinóides endógenos já foram bem caracterizados até o momento, a “anandamida”, o éster 2-araquidonoil-glicerol (2–AG), e o 2-araquidonoil-

glicerol-éter. Esses três canabinóides endógenos são derivados do ácido graxo ω6-polinsaturado proveniente da dieta, o qual deriva de outros ácidos graxos essenciais. O precursor da anandamida é a N-araquidonilfosfatidiletanolamina (N-ArPE) que é formada através da ação da NAT (N-aciltransferase), uma enzima cálcio-dependente. A N-ArPE é clivada pela N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE)-fosfolipase D específica (NAPE-PLD), originando a anandamida e ácido fosfatídico. A biossíntese do 2-AG é iniciada pelo Ca^{2+} intracelular que induz a formação de diacilglicerol (DAG) na membrana através da estimulação da via da fosfatidil-inositol-fosfolipase C (PI-PLC). O 2-AG é o produto da DAG-liapase (DAGL) agindo na DAG (BASAVARAJAPPA, 2007; DI MARZO; MATIAS, 2005).

A anandamida e o 2-AG são os endocanabinóides mais estudados e existem diferenças entre suas concentrações no tecido nervoso, sendo a concentração de 2-AG aproximadamente 200 vezes maior que a de anandamida, por exemplo. Entretanto, a distribuição deles no encéfalo é bastante similar, pois ambos existem em maiores concentrações no tronco encefálico, estriado e hipocampo e em menores concentrações no córtex, diencéfalo e cerebelo. Curiosamente, parece não haver correlação entre as concentrações dos canabinóides endógenos e a distribuição de receptores canabinóides (FRIDE; SHOHAMI, 2002).

1.2.2 Receptores canabinóides

Os efeitos dos compostos canabinóides dependem então em grande parte dos receptores canabinóides (CB). Os receptores CB pertencem à família de receptores acoplados à proteína G e a análise da sequência primária de aminoácidos revela a presença de sete domínios transmembrânicos, uma porção N-terminal extracelular e uma porção C-terminal intracelular. O mecanismo de transdução dos sinais dos receptores CB envolve vias com a participação da proteína $G_{i/0}$, inibindo a adenilil ciclase e ativando quinases, e no caso dos receptores CB_1, ainda modulando canais iônicos (AMERI, 1999; DI MARZO et al., 1998; LUTZ, 2002).

Dois receptores CB foram identificados, um nomeado de CB_1 (MATSUDA et al., 1990), também conhecido anteriormente como o subtipo do sistema nervoso central, mas que também é encontrado em outras estruturas, tais como baço e tonsila, e em menor quantidade na glândula adrenal, coração, útero, ovário, testículo e em nervos simpáticos. O

outro receptor nomeado de CB_2 (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993), era previamente conhecido como o subtipo periférico, pois foi encontrado inicialmente em regiões marginais do baço, nas tonsilas e em células do sistema imune (AMERI, 1999), mas posteriormente encontrado no sistema nervoso central (FOWLER et al., 2001).

Os receptores do tipo CB_1 estão entre os receptores acoplados à proteína G mais abundantes no sistema nervoso central (SNC) e a sua distribuição foi bem caracterizada no encéfalo de ratos e de humanos. Em estudos com ligantes, as maiores densidades foram encontradas nos núcleos da base (substância negra (SN), globo pálido (GP), 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. Densidades intermediárias de sítios de ligação foram encontradas no núcleo acumbens, e sítios esparsos ou ausentes no tronco encefálico, no bulbo e no hipotálamo (AMERI, 1999). Vários estudos que empregaram métodos de autorradiografia, hibridização *in situ* e imunohistoquímica também têm demonstrado a presença de receptores CB_1 em áreas do encéfalo de animais adultos, como no córtex cerebral, hipocampo, cerebelo e núcleos da base (GLASS; FAULL; DRAGUNOW, 1997; HERKENHAM et al., 1990; HERKENHAM et al., 1991a, b; MAILLEUX; VANDERHAEGHEN, 1992; TSOU et al., 1998).

Como citado anteriormente, acreditava-se que os receptores CB_2 eram encontrados apenas em tecidos e células do sistema imune. Entretanto, estudos mais recentes mostram que apesar de não estar presente no SNC em condições normais, este receptor pode aparecer em células gliais, nomeadas de microglia reativa, em resposta a diferentes condições prejudiciais associadas a eventos inflamatórios locais (FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2007). Apesar de controversos, outros estudos propõem que os receptores CB_2 podem estar presentes no cérebro, mesmo em condições normais (ONAIVI et al., 2006). Os receptores CB_2 foram mapeados em células gliais, incluindo microglia e astrócitos, progenitores neurais e oligodendrogliais, algumas subpopulações de neurônios, e em diferentes estruturas cerebrais de várias espécies, incluindo seres humanos, utilizando abordagens *in vivo* ou *in vitro* (para revisão ver FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2008).

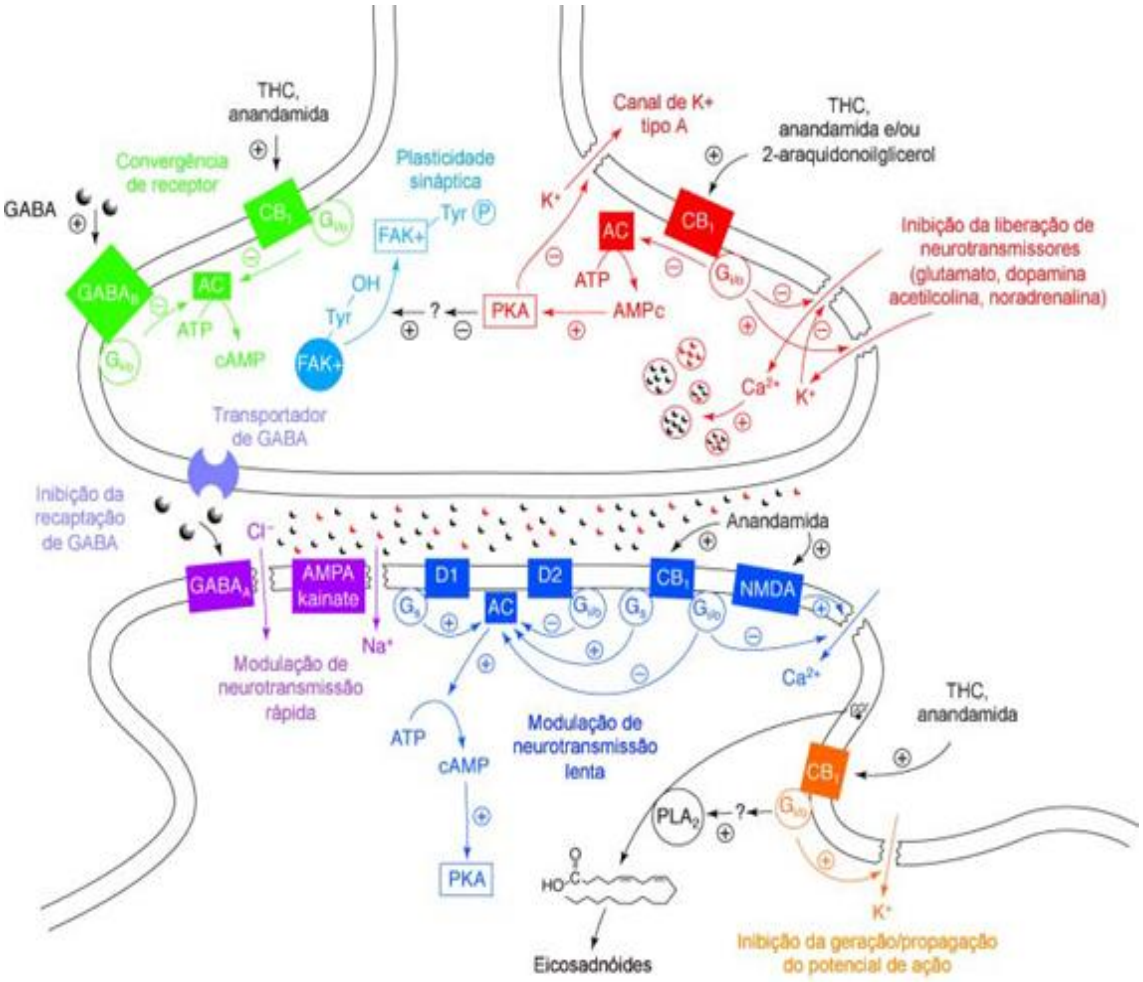
Investigações recentes mostram que o endocanabinóide anandamida, além de ser ligante dos receptores canabinóides CB_1 e CB_2, também é ligante de outros receptores, tais como o TRPV1 (*transient receptor potential cation channel* - receptor vanilóide do tipo 1), o TASK-1 (canal de potássio), o PPAR gama (*peroxisome proliferator-activated receptor*)

(O'SULLIVAN; KENDALL, 2010), 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, 2005a).

1.2.3 Mecanismo de ação do sistema canabinóide

Quando os canabinóides endógenos se ligam aos receptores $CB_{1,}$ desencadeiam uma série de mecanismos intracelulares característicos dos receptores acoplados à proteína $G_{i/0}$. A maioria dos autores descreve três eventos importantes (1) inibição da adenilil ciclase, levando a uma diminuição dos níveis de AMP cíclico (AMPc) intracelular e de proteína quinase A; (2) estimulação de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP quinase); (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 numa diminuição do influxo de cálcio e em um aumento do efluxo de potássio (DE PETROCELLIS; CASCIO; DI MARZO, 2004; DI MARZO, et al., 1998; LUTZ, 2002). Os receptores CB_1 são abundantemente expressos em terminais axônicos, o que sugere a sua ação pré-sináptica na maioria das vezes. Os canabinóides endógenos são liberados por neurônios pós-sinápticos e agem no receptor CB_1 de neurônios pré-sinápticos. O resultado dessa ligação é uma redução da liberação de outros neurotransmissores, como o ácido gama-aminobutírico (GABA) e o glutamato, por exemplo. Logo após, os canabinóides endógenos são levados para o interior das células para serem degradados (FREUND et al., 2003; HASHIMOTODAN; OHNO-SHOSAKU; KANO; 2007). (Figura 1).

Figura 1- Mecanismos de ação dos canabinóides.



No terminal pré-sináptico a anandamida e 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 adenilil ciclase (AC) afetando assim a liberação ou a ação dos neurotransmissores ou ambas, e a neurotransmissão lenta e rápida. Uma vez liberados pela despolarização dos neurônios, os dois compostos, devido à sua lipofilia, podem se comportar como outros derivados do ácido araquidônico (AA), como sinais autócrinos e parácrinos agindo no próprio neurônio de origem, em neurônios vizinhos, ou em astrócitos. No hipocampo a inibição da AC e posteriormente da proteína quinase A (PKA) dependente de AMPc, também pode levar à modulação da plasticidade sináptica, por exemplo, através do aumento da fosforilação da tirosina e subsequente ativação da quinase de adesão focal (FAK).
Fonte: Adaptado de Di Marzo et al., 1998.

Para que os canabinóides endógenos possam ser inativados, existe uma molécula transportadora de membrana, o transportador de anandamida da membrana celular (AMT), que a leva para dentro das células para que ocorra a degradação enzimática intracelular

feita pela enzima hidrolase de amida de ácido graxo (FAAH). O 2-AG também é captado pelo AMT e em sequência sofre degradação enzimática intracelular pela monoacilglicerol lipase (MAGL) ou pela FAAH. De acordo com este mecanismo, altas concentrações de FAAH e AMT são encontradas nas áreas do encéfalo que possuem uma grande densidade de CB_1, tais como o hipocampo, o cerebelo e o córtex cerebral (BASAVARAJAPPA, 2007; FRIDE; SHOHAMI, 2002).

1.2.4 Canabinóides exógenos

Dentre os canabinóides exógenos, o mais conhecido e estudado é o princípio psicoativo da planta *Cannabis sativa* (maconha), o Δ^9-THC, que foi isolado em 1965 (MECHOULAM; GAONI, 1965). Outro composto derivado da maconha é o canabidiol, que apresenta um perfil de baixa toxicidade e é indicado como um potente anti-inflamatório (MECHOULAM; PARKER, 2013). No entanto, existem diferenças farmacológicas entre os exocanabinóides e os canabinóides endógenos no sistema nervoso central. Por exemplo, os efeitos farmacológicos da anandamida e do Δ^9-THC são bastante similares, mas a anandamida possui uma ação *in vivo* menos duradoura quando comparada com o canabinóide derivado da planta, e isso ocorre devido à degradação enzimática rápida da anandamida (FRIDE; SHOHAMI, 2002).

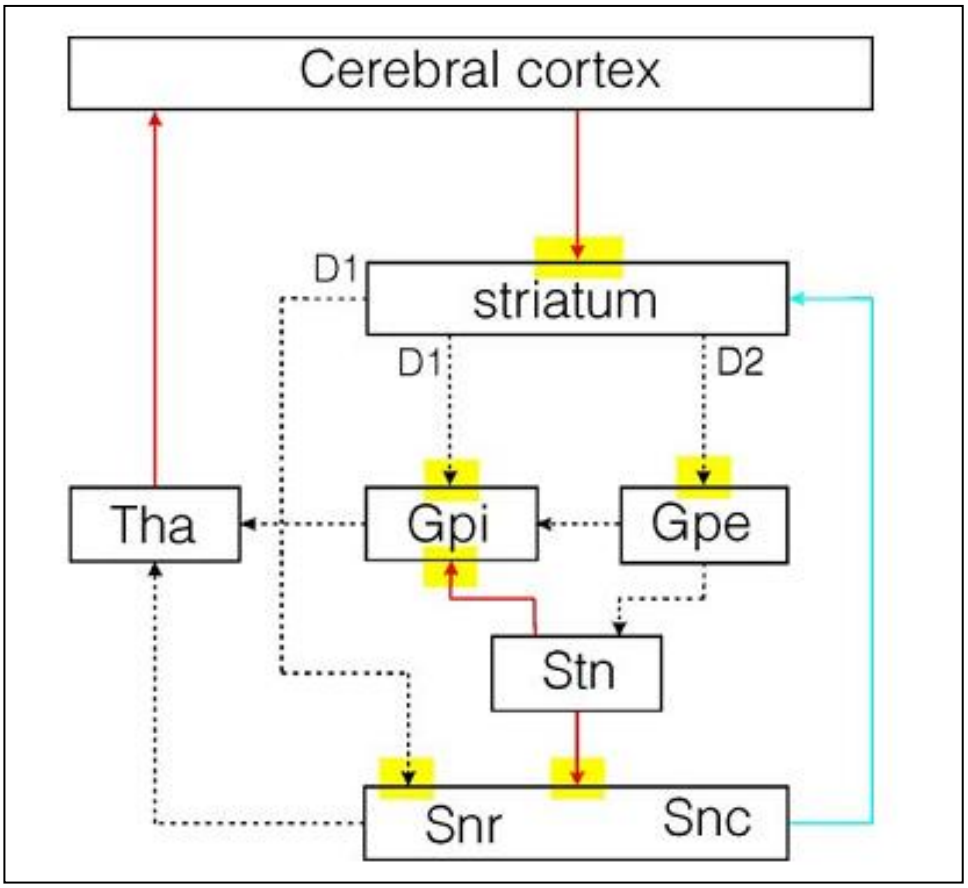
Atualmente, o Δ^9-THC, o canabidiol e outros canabinóides exógenos sintéticos agonistas e antagonistas de CB_1 e/ou CB_2 são utilizados na pesquisa. Para o presente estudo foram escolhidos alguns compostos canabinóides, que serão detalhados a seguir. O araquidonil-2-cloroetilamida (ACEA) foi desenvolvido inicialmente como um agonista seletivo do receptor CB_1, apresentando alta afinidade pelo receptor CB_1 e baixa afinidade pelo receptor CB_2 (HILLARD et al., 1999). Porém, atualmente sabe-se que este composto também pode agir em receptores TRPV-1 (FARSANDAJ; GHAHREMANI; OSTAD, 2012; RUPAREL et al., 2011). O AM 251 é um antagonista e/ou um agonista inverso seletivo do receptor CB_1 análogo ao antagonista CB_1 SR141716A (rimonabanto) (GATLEY et al., 1996; PERTWEE, 2005). O AM 404 é um inibidor do transportador de anandamida, o qual diminui recaptação deste composto, aumentando seus níveis endógenos (BELTRAMO et al., 1997). Por fim, o canabidiol, como já citado anteriormente, é um composto da *C. sativa* que não apresenta efeitos psicotrópicos, que

atua como um agonista fraco do receptor CB_1 e como agonista inverso do CB_2, e que inibe a recaptação de anandamida (PETITET et al., 1998; THOMAS et al., 2007).

1.3 O Sistema canabinóide e os núcleos da base

Conforme escrito anteriormente os receptores canabinóides CB_1 são expressos em grandes quantidades nos núcleos da base de roedores e primatas (AMERI, 1999; HERKENHAM et al., 1991a, b). No estriado, esses receptores possuem localização pré e pós-sináptica e atuam particularmente na transdução de dopamina. Nessa região os neurônios de projeção e os interneurônios GABAérgicos são os que mais expressam CB_1. Esses receptores são sintetizados em neurônios espinhosos médios GABAérgicos no estriado e transportados para seus terminais no globo pálido externo (GPe), globo pálido interno (GPi) e na substância negra porção reticulada (SNpr). Além disso, projeções glutamatérgicas do núcleo subtalâmico para a SN e GPi, também expressam CB_1. Existe também uma co-expressão dos receptores canabinóides CB_1 e os receptores dopaminérgicos D1 e D2 e o receptor 5HT1B de serotonina. Os receptores D2 e CB_1 compartilham um grupo de proteínas G, indicando uma convergência dos seus mecanismos de transdução, enquanto que a estimulação dos receptores CB_1 pode bloquear a ativação dos receptores D1 mediada pela adenilil ciclase. (BROTCHIE, 2003; FERRÉ et al., 2009; PAPA, 2008; VAN DER STELT; DI MARZO, 2003). No GPi e SNpr foi demonstrado que a ativação do CB_1 reduz tanto a liberação de GABA como a de glutamato dos terminais axônicos do estriado e do núcleo subtalâmico, respectivamente (BROTCHIE, 2003; PAPA, 2008) (Figura 2).

Figura 2 - Esquema simplificado da organização funcional dos núcleos da base.



Os núcleos da base consistem em quatro núcleos: estriado dorsal (caudado-putâmen), globo pálido (que é separado em camada interna (GPi) e camada externa (GPe)), núcleo subtalâmico (Stn) e substância negra (que é separada em porção reticulada (SNpr) e porção compacta (SNpc)). O estriado é o primeiro núcleo de entrada e contêm neurônios GABAérgicos espinhosos médios que recebem inervação glutamatérgica (setas vermelhas) do córtex cerebral e projeções dopaminérgicas da SNpc (seta azul). Na via direta, os neurônios espinhosos médios do estriado enviam suas projeções GABAérgicas (setas pretas) para a SNpc e GPi que são os dois principais núcleos de saída. O tálamo (Tha) está sob o controle inibitório destes núcleos de saída. Na via indireta, os neurônios espinhosos médios enviam suas projeções GABAérgicas primeiro para o GPe, o qual, por sua vez, inibe o Stn com eferências GABAérgicas. O Stn ativa os núcleos de saída com projeções glutamatérgicas. Deve-se notar que os neurônios da SNpc estendem seus dendritos para a SNpr, e são capazes de fazer sinapses com eferências do estriado e do núcleo subtalâmico. O receptor CB_1 (quadrados amarelos) são expressos nas diferentes regiões dos núcleos da base, modulando assim a via direta (receptor D1) e a via indireta (receptor D2).
Fonte: van der Stelt e Di Marzo, 2003.

Portanto, existe um consenso na literatura de que os receptores CB_1 estriatais estão localizados principalmente em neurônios GABAérgicos, mas também em neurônios glutamatérgicos. Dessa forma a ativação do receptor CB_1 pode modular a liberação de neurotransmissores e influenciar a atividade dos neurônios dopaminérgicos na SN. No caso específico da SN os receptores CB_1 estão localizados da porção reticulada nos terminais de

neurônios espinhosos estriatais. Fibras aferentes dopaminérgicas da SN inervam os neurônios estriatais que expressam CB_1 e também, receptores de dopamina (JULIAN et al., 2002; KÖFALVI et al., 2005; MÁTYÁS et al., 2006). Os neurônios dopaminérgicos dos núcleos da base não expressam o receptor CB_1 (JULIAN et al., 2002).

1.4 Doença de Parkinson: modelo de doença neurodegenerativa dos núcleos da base

Inúmeros dados da literatura sugerem, portanto, que o sistema canabinóide parece exercer um papel importante na circuitaria dos núcleos da base (para revisão ver em VAN DER STELT; DI MARZO, 2003). Entretanto, são necessárias ainda muitas informações para o entendimento completo dessa circuitaria. Para acrescentar informações a essa questão, escolhemos estudar um modelo experimental da Doença de Parkinson (DP).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum que costuma afetar as pessoas a partir dos 55 anos, embora existam casos raros de jovens e crianças afetados (SCHOBER, 2004). Esta doença é relacionada à perda de 50-70% dos neurônios dopaminérgicos da SN em sua porção compacta (SNpc), e consequentemente diminuição da concentração de dopamina na área de projeção destes neurônios. Essa depleção de dopamina desencadeia uma modificação funcional complexa na circuitaria dos núcleos da base, o que leva aos sintomas motores típicos da doença: tremores, rigidez muscular e bradicinesia (BLANDINI et al., 2008). Além destes sintomas também pode ocorrer a acinesia, alterações da marcha e instabilidade postural com quedas frequentes e falta de expressão facial (AGID, 1991), sintomas cognitivos como lentidão dos pensamentos, demora em responder perguntas, desconexão com o ambiente, falta de iniciativa, demência, e quadro depressivo em cerca de 40% dos pacientes (CUMMINGS, 1992).

A característica neuropatológica da DP é a formação de corpos eosinófilos que são chamados de corpúsculos de Lewy (SCHOBER, 2004). A morte dos neurônios dopaminérgicos da SN e a consequente ativação reduzida dos receptores dopaminérgicos geram alterações na atividade das vias direta e indireta dos núcleos da base. Ocorre um aumento da atividade neuronal do GPi e SNpr, culminando com uma inibição excessiva do sistema tálamo-cortical. Além disso, a redução na atividade dopaminérgica leva a uma diminuição da atividade neuronal do GPe e desinibição do núcleo subtalâmico (NST), que também resulta em inibição tálamo-cortical. Resumindo, a degeneração dopaminérgica resulta em uma diminuição da atividade da via direta e aumento da atividade da via

indireta, gerando excessiva inibição dos sistemas motores (ALEXANDER; CRUTCHER, 1990).

Modelos experimentais da DP com o emprego de substâncias capazes de produzir a mesma lesão seletiva de neurônios dopaminérgicos da SNpc, acompanhada de sintomas semelhantes ao parkinsonismo, têm sido utilizados na tentativa de compreender os mecanismos subjacentes à doença. Entre estas substâncias estão: 1) as análogas da dopamina, como por exemplo, a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA); 2) contaminantes da heroína sintética 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP); 3) herbicidas e pesticidas; e 4) metais como manganês. Todos os modelos animais demonstram ativação de microglia na SN após a injeção local e um paralelismo entre a progressão da lesão e a ativação da microglia (BLANDINI et al., 2008; PURISAI et al., 2007; SCHMIDT; FERGER, 2001; SCHOBER, 2004; SMEYNE; JACKSON-LEWIS, 2005).

A 6-OHDA é uma das neurotoxinas mais utilizadas em modelos de degeneração de projeções catecolaminérgicas centrais, incluindo o sistema nigroestriatal *in vivo* e *in vitro* (SCHOBER, 2004). A injeção de 6-OHDA na porção centro-lateral do caudado-putâmen (estriado) é o modelo que mais se aproxima do quadro encontrado em humanos (TILLERSON et al., 2002), principalmente se a lesão for bilateral (revisado por DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002). Porém, os cuidados pós-operatórios necessários neste modelo são muito grandes (BLANDINI et al., 2008; SCHOBER, 2004). Assim, tem-se utilizado extensamente a lesão unilateral do sistema nigroestriatal, de forma a aproveitar o lado não lesado do mesmo animal como controle dos efeitos da lesão (GRIGOR'IAN; BAZIAN, 2007; SCHWARTING; HUSTON, 1996).

As injeções intraestriatais de 6-OHDA causam uma morte neuronal retrógrada e progressiva (SCHOBER, 2004). A perda dos neurônios na SN começa nas primeiras 12 horas da injeção intraestriatal da toxina e a lesão nos terminais dopaminérgicos estriatais, em paralelo com o esgotamento de dopamina, é estabelecida em 2-3 dias (BLANDINI et al., 2008), ficando estável após 2 semanas (LABANDEIRA-GARCIA et al., 1996). A lesão pode ser induzida em ratos ou camundongos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; BEAL, 2001). Após injeção local, esta neurotoxina é captada pelas moléculas transportadoras de dopamina e noradrenalina. A 6-OHDA é acumulada então no citosol e promove a produção de radicais livres e disfunções mitocondriais. Ocorre assim, inibição dos complexos I e IV da cadeia respiratória mitocondrial, e a produção de radicais livres superóxido (revisado por BLUM et al., 2001; e por SCHOBER, 2004). Como resultado final ocorre morte

neuronal devido a ativação de mecanismos apoptóticos dependentes de capase 3 (TANAKA; OGAWA; ASANUMA, 2006). A liberação de radicais reativos de oxigênio leva à formação de quinonas que reagem com grupamentos nucleofílicos. A lesão assim produzida não gera corpúsculos de Lewy, típicos do tecido nervoso de pacientes parkinsonianos. Em resumo, a neurotoxicidade da 6-OHDA é causada então pela inibição da cadeia respiratória e estresse oxidativo induzido pela formação de radicais livres. Estes dois mecanismos de toxicidade não estão necessariamente ligados, mas parecem agir sinergicamente durante a degeneração neuronal (SCHOBER, 2004; TORRÃO et al., 2012).

Hoje a literatura apresenta uma série de resultados a respeito da DP induzida por 6-OHDA e estes resultados são muitas vezes diferentes e controversos. Os resultados obtidos com a lesão dependem da quantidade de 6-OHDA aplicada, do local exato da injeção, se a injeção é uni ou bilateral; que fase da lesão está sendo investigada, qual região dos núcleos da base foi analisada e que espécie animal foi utilizada (BLANDINI et al., 2008; SCHOBER, 2004). Sabe-se que para estudos de neuroproteção a injeção intraestriatal da toxina é a mais utilizada (SCHOBER, 2004).

Para examinar os déficits funcionais causados pela doença realizam-se testes comportamentais com os animais, para verificar assimetria rotacional, e disfunções motoras e sensoriais (HENDERSON et al., 2003; HENDERSON; WATSON, 2003).

1.5 Sistema canabinóide e a Doença de Parkinson

Ao longo da última década vários estudos têm descrito a participação do sistema canabinóide em diversos modelos experimentais de morte neuronal, apresentando papel neuroprotetor. A maioria deles demonstra a participação dos compostos canabinóides endógenos e/ou exógenos, como também dos receptores CB_1 e CB_2 nesses modelos (GRUNDY; RABUFFETTI; BELTRAMO, 2001; GILBERT et al., 2007; MATO; DEL OLMO; PAZOS, 2003; PANIKASHVILI et al., 2001;PARMENTIER- BATTEUR et al., 2002;VAN DER STELT et al., 2002, 2005). De maneira geral, sabe-se que o sistema canabinóide é ativado em resposta a diferentes estímulos que danificam as células nervosas. Este fato vem sendo documentado em diferentes paradigmas de neurodegeneração. Entretanto, os resultados são extremamente variados, dependendo de fatores como a espécie animal estudada, a idade, tipo e gravidade do dano, e dos mecanismos de morte celular ativados (SAGREDO et al., 2007a).

Apesar de muitos trabalhos apoiarem os efeitos neuroprotetores para muitos canabinóides em diversos modelos de neurotoxicidade, os mecanismos exatos pelos quais esse processo ocorre ainda não são muito conhecidos (MARSICANO et al., 2002). Alguns trabalhos sugerem a ativação de vias de neuroproteção pelos canabinóides como, por exemplo, os mecanismos dependentes dos receptores CB_1 e proteína quinase A (KIM et al., 2005; ZHUANG et al., 2005); o envolvimento dos receptores CB_1 com sistemas compensatórios endógenos das vias FAK/MEK/ERK e/ou FAK/PI3K/ERK e outras possíveis vias de sinalização ainda não identificadas (KARANIAN et al., 2006); a participação de fatores neurotróficos como mediadores na neuroproteção por ativação dos receptores CB_1 em modelos de excitotoxicidade (KHASPECOV et al., 2004); eventos mediados preferencialmente pelos receptores CB_2 e suas relações com as células gliais, como a redução do local inflamatório que frequentemente acompanha as neurodegenerações crônicas e agudas (FERNANDÉZ-RUIZ et al., 2008); relações do sistema canabinóide com o sistema imune (PANIKASHVILI et al., 2006; SAGREDO et al., 2007a; ULLRICH et al., 2006); eventos mediados por mecanismos independentes de receptores, como por exemplo, propriedades antioxidantes de certos canabinóides (GARCÍA-ARENCIBIA et al., 2007); mecanismos dependentes dos receptores TRPV1 (PEGORINI et al., 2006); entre outros (revisado por MECHOULAM; SPATZ; SHOHAMI, 2002; revisado por MECHOULAN, 2002; SAGREDO et al., 2007a).

Neste contexto, o processo neurodegenerativo observado na DP também se tornou alvo dos estudos de neuroproteção possivelmente desempenhada pelo sistema canabinóide. Por exemplo, Lastres-Becker e colaboradores (2005) mostraram que o THC pode reverter a diminuição da transmissão dopaminérgica nos núcleos da base de ratos com hemiparkinsonismo causado pela injeção unilateral de 6-OHDA, devido a uma redução da morte dos neurônios dopaminérgicos no lado lesado. Este estudo ainda mostra que outro o canabidiol, também é responsável pela neuroproteção neste mesmo modelo através de um mecanismo independente de receptor e relacionado às suas propriedades antioxidantes. Além disso, neste mesmo estudo os autores mostraram o efeito neuroprotetor de outro agonista canabinóide não seletivo, o HU-210, em cultivos primários de células granulares de cerebelo de embriões de ratos expostas à 6-OHDA. Essas células foram expostas ao meio condicionado obtido de células gliais tratadas com HU-210, sugerindo que os canabinóides exercem seus principais efeitos protetores através da regulação da influência glial sobre os neurônios. Outro estudo verificou o efeito neuroprotetor de compostos

canabinóides capazes de ligar a diferentes elementos do sistema canabinóide, tais como os receptores CB_1 e CB_2 e os AMT. Os resultados deste estudo apoiam a ideia de que apenas os canabinóides com propriedades antioxidantes, como, por exemplo, o AM 404 e não aqueles com afinidades aos receptores canabinóides são capazes de reduzir a toxicidade causada pela 6-OHDA em neurônios nigrais (GARCIA-ARENCIBIA et al., 2007). Gubellini e colaboradores (2002) verificaram um aumento dos níveis de anandamida em ratos lesados por 6-OHDA, acompanhando a morte dos neurônios dopaminérgicos. Essa elevação do endocanabinóide foi acompanhada pela redução da enzima FAAH e do AMT.

Outros modelos experimentais da DP tais como, lesões por MPTP ou lesões por tratamento com reserpina, também sugerem a importância dos receptores CB_1 na sinalização da circuitaria dos núcleos da base (BROTCHIE, 2003). Saguis tratados com MPTP mostram um aumento da expressão de receptores CB_1 no estriado (LASTRES-BECKER et al., 2001). Ratos tratados com reserpina ou lesados por 6-OHDA mostram aumento nos níveis de RNAm para receptor CB_1 no estriado, mas este aumento não se mantém ao longo dos dias (ROMERO et al., 2000; SILVERDALE et al., 2001). Por outro lado, um estudo mais recente mostrou uma diminuição dos receptores CB_1 na SN. No entanto, essa diminuição ocorreu apenas em animais lesados unilateralmente com injeção de 6-OHDA no estriado e não nos que tiveram lesão no feixe prosencefálico medial (WALSH et al., 2010). Outro estudo com humanos mostrou, por tomografia de emissão de pósitrons, que pacientes com DP também apresentam redução de CB_1 na SN (VAN LAERE et al., 2012).

Apesar de muitos estudos apontarem para os efeitos neuroprotetores do sistema canabinóide em diversos modelos de neurodegeneração, alguns trabalhos mostram que este sistema pode promover a degeneração em alguns casos (SARNE et al., 2011). Em relação aos compostos canabinóides, diferenças como dose, tipo de agente, tempo de exposição, entre outras variáveis, podem gerar respostas opostas entre neuroprotecão e neurotoxicidade (DI MARZO, 2008; FOWLER; ROJO; RODRIGUEZ-GAZTELUMENDI, 2010; GUZMÁN, 2003; SARNE; MECHOULAM, 2005).

Contudo, medicamentos a base de canabinóides têm sido propostos como terapias promissoras na Doença de Parkinson (DP), com base nos altos níveis de receptores CB_1 encontrados nos núcleos da base, bem como na função modulatória atribuída a esse sistema de neuromediação. Um trabalho sugere que o sistema de sinalização desempenhado pelo receptor CB_1 na DP apresenta um padrão bifásico de mudanças durante a progressão da

doença, ou seja, em estágios iniciais e assintomáticos da doença ocorre uma dessensibilização/*downregulation* dos receptores CB_1 que podem estar associadas à morte neuronal. Em contrapartida, os estágios mais avançados da DP caracterizam-se por uma degeneração nigral profunda, associada ao aparecimento dos principais sintomas parkinsonianos que podem estar relacionados à *upregulation* de receptores CB_1 e, possivelmente, dos receptores CB_2, e dos endocanabinóides (GARCÍA-ARENCIBIA et al., 2009; revisado por GARCÍA-ARENCIBIA; GARCÍA; FERNÁNDEZ-RUIZ J, 2009).

1.6 Justificativa

O sistema canabinóide desempenha funções modulatórias em vários processos neurobiológicos (BEGBIE; DOHERTY; GRAHAM, 2004; FERNANDÉZ-RUIZ et al., 2000; RAMOS et al., 2002; GRUNDY; RABUFFETTI; BELTRAMO, 2001; MATO; DEL OLMO; PAZOS, 2003; PARMENTIER- BATTEUR et al., 2002 ;VAN DER STELT et al., 2002, 2005). Por exemplo, nosso grupo tem investigado o papel do sistema canabinóide em processos do desenvolvimento embrionário (LEONELLI et al., 2005) e em processos de plasticidade (CHAVES et al., 2008).

A importância do sistema canabinóide para a neurociência e de se ter melhor conhecimento sobre ele, é evidente quando analisamos a abundante expressão do receptor CB_1 no SNC. Segundo Matsuda e colaboradores (1990) os receptores CB_1 estão entre os receptores acoplados à proteína G mais abundantes no SNC, e dentre as estruturas que mais expressam esse receptor estão os núcleos da base (AMERI, 1999, HERKENHAM et al., 1991a, b). Portanto, a participação do sistema canabinóide na circuitaria dos núcleos da base representa um importante objeto de investigação.

Em uma primeira abordagem estudamos a expressão e distribuição dos receptores CB_1 nos núcleos da base, utilizando estudos de dupla-marcação com marcadores de célula da glia, de elementos estruturais de neurônios e de populações específicas de neurônios (dopaminérgicos e GABAérgicos). Apesar de existirem trabalhos relacionados ao assunto, grande parte deles é baseada em evidências farmacológicas e são raros os estudos com enfoques apenas morfológicos.

Uma abordagem comumente utilizada em pesquisa para o estudo de uma circuitaria específica é promover alterações da mesma. Assim, escolhemos para o presente estudo um modelo experimental da DP, produzido pela injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA,

que promove degeneração de neurônios dopaminérgicos na SN e diminuição dos níveis de dopamina em toda circuitaria dos núcleos da base, como uma segunda alternativa para o melhor entendimento da relação do sistema canabinóide e os núcleos da base. Neste modelo, escolhemos explorar alterações temporais da expressão do receptor CB_1, bem como de proteínas relacionadas aos sistemas dopaminérgico e GABAérgico. Essas informações são de extrema importância já que a literatura mostra dados controversos sobre essas questões. Morera-Herreras e colaboradores (2012) apontam que os resultados de estudos sobre a expressão dos receptores CB_1 em modelos animais de DP são heterogêneos e muitas vezes conflitantes, pois dependem do modelo animal utilizado e dos períodos pós-lesão analisados. Por este motivo, analisamos a expressão dos receptores CB_1 em diferentes períodos pós-lesão e escolhemos o modelo animal que mais se aproxima do quadro encontrado em humanos, por promover uma degeneração lenta e gradual do sistema dopaminérgico (SCHOBER, 2004; TILLERSON et al., 2002).

Por fim, como uma terceira abordagem, realizamos tratamentos com agonistas e antagonistas canabinóides neste modelo experimental da DP, analisando aspectos neuroquímicos e comportamentais. Apesar dos atuais esforços em estudar o sistema canabinóide na circuitaria dos núcleos da base e suas relações com a DP, e de seu papel neuroprotetor ter sido demonstrado em diferentes modelos de neurodegeneração (SANTOS, 2012; SÁNCHEZ; GARCÍA-MERINO, 2012), incluindo a DP (GARCIA-ARENCIBIA et al., 2009), os dados são ainda muito controversos. Especificamente no caso da DP não está clara qual a participação efetiva dos receptores canabinóides na neuroproteção; quais canabinóides exógenos desempenhariam este papel neuroprotetor para fins terapêuticos; se os benefícios ou malefícios dos canabinóides estão relacionados a questões de sobrevivência de neurônios ou de melhoria dos sintomas; e quais os mecanismos exatos envolvidos nestes processos. Dentro desse contexto de neuroproteção, optamos ainda por trabalhar com uma linhagem de células (neuro-2a) diferenciada em neurônios dopaminérgicos e exposta à toxicidade da 6-OHDA. Realizamos tratamentos com diversos compostos canabinóides e avaliamos a viabilidade celular. O trabalho com cultivo celular, além de viabilizar o estudo de mais compostos canabinóides e de diferentes concentrações, pela facilidade técnica dos estudos *in vitro*, e por ser um microambiante mais facilmente manipulável, permitiu a melhor avaliação da questão de sobrevivência de neurônios.

Assim, esclarecer a relação do sistema canabinóide com os núcleos da base, no que se refere à distribuição dos receptores CB_1 nos núcleos da base, as alterações temporais da expressão desses receptores frente ao processo lesivo causado pela 6-OHDA, e a relação desse sistema com processo de neuroproteção e/ou neurodegeneração em modelos experimentais da DP podem contribuir de maneira significativa para a compreensão dos mecanismos subjacentes as doenças neurodegenerativas em geral, e em especial a DP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar (1) a distribuição dos receptores CB_1 nos núcleos da base, bem como possíveis co-localizações com diferentes marcadores; (2) a variação temporal da expressão de CB_1 e de proteínas relacionadas aos sistemas dopaminérgico e GABAérgico no modelo experimental da DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA em ratos; (3) os efeitos comportamentais e neuroquímicos do tratamento com compostos canabinóides em modelo experimental da DP em ratos e (4) os efeitos sobre a viabilidade celular do tratamento com compostos canabinóides de linhagem de células expostas à toxicidade de 6-OHDA.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Bloco I - Receptores canabinóides CB_1 nos núcleos da base: estudos de imunofluorescência

Avaliar a localização dos receptores canabinóides CB_1 nos núcleos da base de ratos através de dupla-marcação com marcadores de:

- células da glia, astrócitos (GFAP), micróglia (OX-42) e oligodendrócitos (OD);
- elementos estruturais de neurônios, axônios (PAN - marcador de neurofilamentos) e dendritos (MAP-2 - proteínas associadas as microtúbulo);
- tirosina hidroxilase (TH) como marcador de neurônios dopaminérgicos;
- das proteínas ligantes de cálcio parvalbumina e calbindina como marcadores de neurônios GABAérgicos.

2.2.2 Bloco II - Avaliação do decurso temporal da expressão de diferentes proteínas no modelo experimental da Doença de Parkinson in vivo

Avaliar por imunohistoquímica e/ou *immunoblotting*, no modelo experimental da DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA em ratos, o decurso temporal da expressão das seguintes proteínas nos núcleos da base:

- receptores CB_1;
- tirosina hidroxilase (TH) como marcador de neurônios dopaminérgicos;
- GABA, enzima GAD e das proteínas ligantes de cálcio parvalbumina e calbindina como marcadores de neurônios GABAérgicos.

2.2.3 Bloco III - Tratamentos com agonista e antagonista canabinóide no modelo experimental da Doença de Parkinson in vivo

Avaliar os efeitos do tratamento com ACEA (agonista canabinóide) e AM 251 (antagonista canabinóide) em modelo experimental da DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA em ratos, quanto aos seguintes aspectos:

- atividade locomotora avaliada em Campo Aberto;
- comportamento de rotação induzido por apomorfina;
- expressão de TH, GFAP e OX-42 no estriado e SN por imunohistoquímica e/ou *immunoblotting*.

2.2.4 Bloco IV - Estudos in vitro: cultura de células expostas à 6-OHDA e tratadas com diferentes compostos canabinóides

Avaliar a viabilidade de células diferenciadas em neurônios dopaminérgicos expostas à toxicidade da 6-OHDA e tratadas com:

- ACEA
- AM 251
- AM 404 (inibidor da recaptação de anandamida)
- canabidiol

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudos *in vivo*

3.1.1 Animais

Foram utilizados nos experimentos ratos machos da linhagem Wistar (aproximadamente 70 dias de idade /230-280 g) fornecidos pelo biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Os animais foram mantidos em uma sala com ciclo claro/escuro artificialmente controlado de 12/12 h e com temperatura constante (23 ºC). Foram alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética para pesquisa com animais do Instituto de Ciências Biomédicas na Universidade de São Paulo (Protocolo número 27, folha 68 do livro 1, 2009).

Parte destes animais foi usada na forma naïve (ratos intactos) e parte foi submetida ao procedimento cirúrgico descrito a seguir.

3.1.2 Procedimento cirúrgico

O procedimento descrito a seguir foi padronizado por nosso grupo. Os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol 2,5% (1 ml/100 g - 250 mg/Kg intraperitoneal (i.p.) - Sigma®, Saint Louis, MO, USA) e fixados no aparelho estereotáxico. Após a craniotomia, com o auxílio de uma micropipeta conectada a uma bomba microinfusora foram realizadas duas injeções de 0,5 µl com 6 µg de 6-OHDA (Sigma®) (1 µl totalizando a dose de 12 µg) no estriado direito nas seguintes coordenadas: (1) ântero-posterior (AP): 0.0, lateral (L): -2.7, e ventral (V): -4.5 mm, (2) AP: -0.5, L: -3.4, e V: - 4 mm; e duas injeções de 0,5 µl de salina e 0,3% de ácido ascórbico no estriado esquerdo nas seguintes coordenadas: (1) AP: 0.0, L: 2.7, e V: -4.5 mm, (2) AP: -0.5, L: 3.4, e V: - 4 mm, todas as coordenadas relativas ao bregma e ventral à dura mater (PAXINOS; WATSON, 2005). Depois de terminada a infusão, a micropipeta foi mantida na região infundida por um minuto aproximadamente para evitar o refluxo da solução, e então foi lentamente removida do encéfalo. Finalizada a infusão, a abertura foi suturada e os animais

foram mantidos em gaiolas, com acesso a ração moída e umedecida, para que se recuperassem da cirurgia. Foi utilizada a pomada Fibrase® (Pfizer®, New York, NY, USA) no local de sutura durante uma semana para ajudar na cicatrização do corte.

Para os testes comportamentais explicados no próximo item fizemos ainda animais SHAM, ou seja, os animais foram anestesiados conforme descrito acima e fixados do aparelho estereotáxico. Após a craniotomia a micropipeta foi introduzida nas mesmas coordenadas descritas anteriormente, mas não ouve infusão.

3.1.3 Tratamento com canabinóides

Após o procedimento cirúrgico bilateral os animais foram divididos em três grupos: (1) Animais tratados com o veículo dos agentes canabinóides, o dimetilsulfóxido (DMSO); (2) Animais tratados com 2 mg/Kg de agonista canabinóide ACEA (Sigma®) e (3) Animais tratados com 2 mg/Kg de antagonista canabinóide AM 251 (Sigma®).

As doses escolhidas foram selecionadas com base em curvas dose-resposta feitas pelo nosso grupo para o presente trabalho (dados não mostrados) e a partir de dados da literatura, originados de estudos que buscavam efeitos neuroprotetores destes compostos em modelos de lesões neuronais. Em relação à dose utilizada do ACEA, dois trabalhos da literatura utilizando modelos *in vivo* com lesões do feixe prosencefálico medial e estriatal, respectivamente, utilizaram as doses de 1 mg/kg (GARCÍA-ARENCIBIA et al., 2007) e 3 mg/kg (SAGREDO et al., 2007b). Apesar disso, esses autores não observaram efeito neuroprotetor deste agente em seus modelos de lesão. Assim, uma vez que os canabinóides geram normalmente curvas dose-resposta em forma de U invertido, decidimos por utilizar uma dose intermediária de 2 mg/kg. Para o AM 251 optamos por utilizar a mesma dose do agonista, ou seja, 2 mg/Kg, já que não encontramos referências de tratamento com este composto em modelos de DP.

O tratamento foi realizado com injeção i.p. diária dos compostos canabinóides nos 4 dias posteriores à cirurgia, e delineado com base em estudos anteriores que reportam efeitos protetores de agentes canabinóides em modelo de DP induzida por 6-OHDA (GARCIA-ARENCIBIA et al., 2007; LASTRES-BECKER et al., 2005).

3.1.3.1 Testes Comportamentais

3.1.3.1.1 Campo aberto

Após 8 ou 15 dias da indução de DP, a atividade geral dos ratos foi observada em uma arena de campo aberto (CA). O aparelho utilizado foi similar ao descrito por Broadhurst (1960), consistindo de uma arena redonda de madeira (90 cm de diâmetro, 28 cm altura da parede) pintada de cinza claro, subdividida em 25 partes. Esta arena ficava no interior de uma pequena sala isolada do observador, com luz difusa e sem qualquer ruído, contendo uma filmadora instalada no teto (a 100 cm da arena), de modo que o observador assistia os comportamentos por meio de um monitor (fora da sala). Contadores manuais foram empregados para estabelecer os escores dos comportamentos.

Para a observação, cada animal foi individualmente e gentilmente colocado no centro do aparato, e os seguintes parâmetros foram mensurados por um período de 5 minutos:

- *Frequência de locomoção:* número de unidades do chão adentradas com ambas as patas.
- *Frequência de levantar:* número de vezes que o animal apresenta postura de permanecer apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, podendo ou não tocar com as patas anteriores as paredes do CA.

3.1.3.1.2 Teste de rotação induzida por apomorfina

Também após 8 e 15 dias da cirurgia o comportamento estereotipado de rotação foi induzido pela apomorfina (Tocris Bioscience ®, Bristol, UK). Para uma quantificação detalhada os animais foram gentilmente colocados no centro de cilindros de acrílico conectados ao Rotâmetro Mecânico (Rota-Count 8, Columbus Instruments) durante 5 minutos para a adaptação. Seguiu-se a administração subcutânea de 0.5 mg/kg de apomorfina. As rotações de 360º ipsi e contralaterais ao lado da injeção de 6-OHDA foram contadas durante 30 minutos.

Para minimizar a influência de possíveis mudanças circadianas nos comportamentos, os animais foram observados no mesmo período do dia em cada sessão, 9:00 – 11:00 horas no CA e 13:00 – 16:00 horas no teste de rotação induzida por

apomorfina. Ambos os aparelhos foram lavados com solução álcool / água 5 % antes da introdução do animal, a fim de eliminar possíveis efeitos a partir de traços de odor deixados por animais previamente colocados na arena.

3.1.4 Métodos histológicos

3.1.4.1 Perfusão transcardíaca

Animais intactos ou submetidos ao procedimento cirúrgico foram profundamente anestesiados com quetamina e xilazina (5 mg/100 g e 1 mg/100 g de peso corpóreo, respectivamente, intramuscular i.m) e perfundidos por via transcardíaca com salina tamponada e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M (PB; pH 7,4). Após 4-6 horas de pós-fixação nos mesmos fixadores, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose a 30% em PB para a crioproteção. Os encéfalos foram então congelados e cortes coronais em uma espessura de 30 µm foram obtidos em um micrótomo deslizante de congelação e coletados em PB. Para os estudos de decurso temporal os animais foram perfundidos com 1, 5, 10, 20 e 60 dias após a lesão e para os estudos de tratamento com canabinóides, com 16 dias após a lesão.

3.1.4.2 Imunofluorescência

Os cortes de encéfalo de animais naïve foram incubados com dois anticorpos primários sendo que um deles foi sempre o anticorpo policlonal feito em coelho anti-CB_1 (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) diluído 1:500 e os outros foram: anticorpo monoclonal feito em camundongo anti-proteína glial marcadora de astrócitos (anti- *glial fibrillary acidic protein* GFAP; Sigma®, 1:1.000), anticorpo monoclonal feito em camundongo anti-microglia (Ox42; BD Biosciences Pharmingen, USA; 1:500), anticorpo monoclonal feito em camundongo anti-mielina de oligodendrócitos (OD**,** Chemicon, Temecula, CA, USA; 1:500), anticorpo monoclonal feito em camundongo anti-proteína associada a microtúbulo (MAP-2, Chemicon; 1:1.000), anticorpo monoclonal feito em camundongo anti-neurofilamento (PAN, Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA; 1:1.000), anticorpo monoclonal feito em camundongo anti-tirosina hidroxilase (TH; Chemicon; 1:1,000), e dois anticorpos monoclonais feitos em camundongo anti-proteínas ligantes de cálcio,

calbindina (Sigma®; 1:1000) e parvalbumina (Sigma®; 1: 1.000) contendo 0.3% de triton X-100 e 5% de soro normal de burro.

Após a incubação "overnight" com os anticorpos primários, os cortes foram lavados três vezes de 10 minutos em PB e incubados com os anticorpos secundários fluorescentes, diluídos 1:50 em PB contendo 0,3% de Triton X-100, por duas horas no escuro. O secundário para o CB_1 foi um anticorpo anti-coelho feito em burro conjugado a rodamina (TRITC; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, USA) e o secundário para todos os outros marcadores foi anticorpo anti-camundongo feito em burro conjugado a fluoresceína (FITC; Jackson). Após três lavagens de 10 minutos em PB os cortes foram montados em lâminas e deixados para secar em temperatura ambiente durante uma hora. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando uma solução de glicerol carbonato e vedadas com esmalte. Finalmente, o material foi analisado em microscópio de fluorescência convencional Nikon E1000 (Melville, NY, USA) e câmera digital Nikon DMX1200 (Nikon Imaging Software ACT-U), ou em microscópio confocal (Sistema de Microscopia Confocal de Varredura a Laser - Carl Zeiss LSM 510, composto de: Microscópio Carl Zeiss Axiovert 100M, Software LSM 510 V3.2 e lasers Argon 458,488 nm, HeNe1 543 nm e HeNe2 633 nm; Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Jena, Germany) e as imagens digitais foram coletadas e montadas com o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.).

3.1.4.3 Imunohistoquímica

Cortes de encéfalo de ratos DP-induzidos foram incubados com anticorpos primários: GFAP, OX42, TH, CB_1, calbindina e parvalbumina, e anti-GABA (Protos Biotech Corporation, New York, NY, USA) diluídos a 1:500-1.000 em PB contendo 0,3% de Triton X-100 e 5% de soro normal de burro ou de cabra. As incubações com os anticorpos primários foram conduzidas por 14-20 horas à temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos em PB, os cortes foram incubados com anticorpos secundários anti-camundongo feito em burro, anti-coelho feito em cabra ou anti-cobaia feito em burro (Vector, Burlingame, CA, USA) diluídos a 1:200 em PB contendo 0,3% de Triton X-100 por 2 horas. Os cortes foram então lavados em PB e incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite; Vector). Seguindo-se a reação com 0,05% de 3-3'-diaminobenzidina e uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,01% em PB e intensificação com 0,05% de tetróxido de ósmio

em água, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, desidratados, e cobertos com lamínulas utilizando Permount (Fisher). O material foi então analisado em microscópio óptico Nikon E1000 e câmera digital Nikon DMX1200. Imagens do estriado foram capturadas entre 1.80 e -0.36 AP relativo ao bregma (5-6 cortes), do GPe entre -0.24 e -3.12 AP relativo ao bregma (4-5 cortes), do GPi entre -1.92 e -2.76 AP relativo ao bregma (2-4 cortes); e da SNpc e SNpr entre -4.56 e -6.60 AP relativo ao bregma (5-8 cortes) (PAXINOS; WATSON 2005). Dessa maneira, foram capturadas imagens representativas de todas as porções das estruturas, garantindo uma análise geral das mesmas. As imagens digitais coletadas foram montadas com o programa Adobe Photoshop.

Foram feitas análises quantitativas diferenciadas para as imunomarcações obtidas para cada anticorpo.

3.1.4.3.1 Tirosina Hidroxilase

A imunomarcação para TH foi quantificada na SNpc. Imagens do lado controle (lado injetado com salina) e experimental (lado injetado com 6-OHDA) foram coletadas, além de uma imagem do *background* (fundo) onde não havia marcação. A densidade integrada de cada imagem foi obtida através da rotina "*integrated density*" do programa Image J (NIH/USA), e o número obtido da imagem de fundo foi descontado do número obtido com as imagens que apresentavam marcação.

3.1.4.3.2 CB_1

A imunomarcação para CB_1 foi quantificada no estriado, GPe, GPi e SNpr. No estriado a densidade integrada foi medida em três áreas de 2500 μm^2; no GPe, GPi e SNpr, além das imagens com as imunomarcações, foram obtidas imagens de fundo e a quantificação foi a mesma já como já descrita para TH.

3.1.4.3.3 OX-42 e GFAP

As imunomarcações para OX-42 e GFAP foram quantificadas na SN. A densidade integrada de cada imagem foi obtida após a utilização da rotina "*Threshold*" do programa Image J. Resumidamente, essa rotina do programa "tinge" de vermelho os locais mais

fortemente marcados da imagem, ou seja, quanto mais imunorreativa a região, mais fortemente ela será tingida de vermelho. Dessa maneira a rotina de densidade integrada contabiliza apenas as marcações em vermelho.

3.1.4.3.4 Calbindina

A imunomarcação para calbindina foi quantificada no estriado e SNpc e SPpr. Em três áreas de 21300 μm^2 do estriado e na SNpc as células calbindina- positivas foram contadas utilizando a rotina "*Cell counter*" do programa Image J. Na SNpr as áreas com imunomarcação para calbindina foram selecionadas pela rotina "*Freehand selection*" e então foram obtidas as densidades integradas de cada área.

3.1.4.3.5 Parvalbumina

A imunomarcação para parvalbumina foi quantificada no estriado, GPe, GPi e SNpr. Em todas as estruturas as células parvalbumina-positivas foram contadas utilizando a rotina "*Cell counter*" do programa Image J. No estriado e GPi foram contadas todas as células presentes no campo capturado, já no GPe e na SPpr as células foram contadas em uma área de 40000 μ^2 e 22500 μ^2, respectivamente.

Para todas as medidas descritas acima o valor obtido para todos os grupos foi divido pela média do controle e multiplicado por 100 para a obtenção das porcentagens.

3.1.4.4 Immunoblotting

Ratos DP-induzidos dos estudos de decurso temporal e de tratamento com canabinóides nos mesmos períodos após a lesão citados no item acima, foram decapitados e as regiões do estriado e SN (mesencéfalo), foram rapidamente coletadas e homogeneizadas a 4 °C em tampão de extração (Tris pH 7,4, 100 mM; ácido dissódico etilenodiaminotetracético (EDTA) 10 mM; persulfato de amônio (PMSF) 2 mM; aprotinina 0,01 mg/ml) com um homogenizador do tipo Polytron modelo pt-MR 2100 (Kinematica; Suíça). Os homogenatos 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 foi determinada usando-se uma solução para ensaio colorimétrico (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Amostras dos sobrenadantes contendo 30-75 µg de proteína total foram tratadas com tampão Laemmli contendo DTT (ditiotreitol) 100 mM e submetidas à eletroforese em géis de acrilamida a 6.5-15% contendo dodecil sulfato de sódio utilizando uma cuba para mini-gel (Mini-Protean 3; Bio-Rad). Após a separação eletroforética, as proteínas foram eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm de diâmetro) utilizando-se um sistema de transferência (Trans-Blot cell system; Bio-Rad), em tampão contendo SDS. Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio contendo 5% de leite desnatado 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 agitação leve. Após esse período, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos com TTBS e incubadas à 4° C, sob leve agitação, "overnight" com os anticorpos primários: TH e anticorpo policlonal feito em coelho contra a enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD, Millipore, Temecula, CA, USA) diluídos a 1:1000 – 1:4.000. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos em TTBS e incubadas por 2 horas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Amersham Biosciences; Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) diluídos a 1:10.000 em solução para incubação contendo 1% de leite desnatado em TTBS. Novamente as membranas foram lavadas em TTBS por 3 vezes de 10 minutos e a ligação específica do anticorpo com a proteína foi revelada utilizando o kit quimioluminescente ECL (Amersham Biosciences). Finalmente, as bandas foram analisadas quanto à densidade óptica da imunorreatividade usando-se o programa Image J. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística explicada mais adiante.

Como controle da quantidade de proteína aplicada nos géis utilizou-se o anticorpo contra a proteína estrutural β-actina (Sigma ®) nas mesmas membranas, seguindo o mesmo protocolo de incubação descrito a cima. Após a normalização com a β-actina, o valor obtido para todos os grupos foi divido pela média do controle e multiplicado por 100 para a obtenção das porcentagens.

3.2 Estudos *in vitro*

3.2.1 Linhagem neuro 2-A

Os experimentos com cultura de célula foram realizados com a linhagem celular Neuro-2a (ATCC; Richmond, VA, USA) clone derivado de um neuroblastoma espontâneo de camundongo, a qual já é utilizada por nosso grupo. Essas células têm a propriedade de produzir grandes quantidades de proteínas do microtúbulo e enzima de degradação da acetilcolina, a aceticolinesterase, e têm sido extensivamente utilizadas como modelo neuronal *in vitro* em estudos com diversos agentes indutores de toxicidade e morte celular geradas por estresse oxidativo.

Recentemente a literatura mostrou que essas células podem ser diferenciadas em neurônios dopaminérgicos através do tratamento com dibutiril AMPc (dbcAMP – Sigma®) (TREMBLAY et al., 2009), o que faz com que elas sejam interessantes para estudos relacionados à DP. Além disso, segundo Jordan e colaboradores (2005) essa linhagem de célula possui o receptor CB_1.

3.2.2 Diferenciação da linhagem Neuro 2-A em neurônios dopaminérgicos

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 (soro fetal bovino), 2 mM de glutamina e 5,6 mM de glicose, em uma incubadora com atmosfera umidificada a 37 °C de 5% de CO_2. Para o procedimento de diferenciação, o meio foi substituído por meio DMEM + 0.5% de SFB acrescido de 1 mM de dbcAMP (Sigma®). Os tratamentos com 6-OHDA e canabinóides foram feitos após 3 dias, pois este é o pico máximo de produção de dopamina (TREMBLAY et al., 2009).

3.2.3 Curva concentração-resposta de 6-OHDA e canabinóides

Inicialmente foram testadas diferentes concentrações de 6-OHDA. Para isso foi feita uma curva concentração-resposta, com as concentrações de 10, 15, 20, 25 e 50 µM de 6-OHDA. Foram realizadas também curvas de concentração-resposta para os seguintes canabinóides: (1) AM 404 (Tocris Bioscience®) inibidor da recaptação de

endocanabinóides; (2) canabidiol (fornecido pelo Professor Dr. José Alexandre de Souza Crippa, do departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo) (3) e capsazepina (Tocris Bioscience®), antagonista do receptor vanilóide (KWAK et al., 1998). Para todos os compostos canabinóides as concentrações testadas foram 0,5, 1, 2,5, 5 e 10 µM. 24 horas após os tratamentos seguiu-se o ensaio colorimétrico MTT para análise de viabilidade celular, descrito a seguir.

O AM 404 e o canabidiol foram escolhidos para os estudos *in vitro* por apresentarem ações antioxidantes e/ou anti-inflamatórias em modelo experimental da DP (GARCIA-ARENCIBIA et al., 2007; LASTRES-BECKER et al., 2005). Já a capsazepina foi escolhida por ser antagonista dos receptor vanilóide TRPV1, também presentes na linhagem de células Neuro-2a (THYAGARAJAN et al., 2009), uma vez que alguns canabinóides, como o ACEA, por exemplo, podem ter ação nesses receptores (FARSANDAJ; GHAHREMANI; OSTA, 2012; RUPAREL et al., 2011). Além desses três compostos testados em curvas concentração-resposta, também foram utilizados para o estudo *in vitro*, o ACEA e o AM 251, cujas concentrações utilizadas no presente estudos foram escolhidas com base em curvas concentração-resposta feita pelo grupo para outros trabalhos.

3.2.4 Indução de toxicidade por 6-OHDA e tratamento com canabinóides.

Após 3 dias da adição de dbc AMPc a cultura foi tratada concomitantemente com 50 µM de 6-OHDA e os compostos canabinóides nas concentrações escolhidas. Os tratamentos detalhados serão descritos no item 3.4.4. 24 horas após os tratamentos seguiu-se o ensaio colorimétrico MTT para análise de viabilidade celular, descrito a seguir.

3.2.5 Ensaio colorimétrico MTT – análise de viabilidade celular

A viabilidade celular foi analisada pelo método colorimétrico MTT (3 - (4,5 diethylthiazolyl-2) -2,5-difeniltetrazoliumbromido), o qual se baseia na habilidade de células viáveis, de converter o sal tetrazólio (MTT) para formazan colorido (precipitado roxo). Foi adicionado MTT (12 mM) na cultura celular Neuro-2a nas diferentes condições e após 2 horas e 30 minutos de incubação a 37 ºC, os cristais escuros formados foram

dissolvidos com DMSO, e a absorbância foi medida por um leitor de microplaca no comprimento de onda de 570 nm. Foi feita a média do controle (grupo tratado com DMSO) para cada placa e os valores obtidos para as condição experimental foi apresentado como absorbância relativa (razão da absorbância de cada grupo/ média da absorbância do controle)

3.3 Análises estatísticas

Os resultados obtidos com as quantificações da imunohistoquímica e *immunoblotting* dos estudos *in vivo* foram submetidos à análise estatística por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do pós-teste de Tukey quando apropriado (STATISTICA 11, Statsoft) levando em consideração as variáveis dias pós-lesão (DPL) e lados controle (salina) e experimental (6-OHDA) para os estudos de decurso temporal; e tipo de tratamento e lados controle e experimental para os estudos de tratamento com canabinóides. Para os estudos de decurso temporal foram incluídos na ANOVA de duas vias todos os períodos pós-lesão analisados (1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão). Já para os animais tratados as comparações por ANOVA de duas vias foram feitas entre os grupos DMSO e ACEA, e entre os grupos DMSO e AM 251. Para os resultados dos testes comportamentais feitos para os estudos de tratamento com canabinóides, foi feita a comparação entre os grupos DMSO e ACEA e DMSO e AM 251, empregando o teste estatístico de t de Student não pareado no programa GraphPad Prism 5.00 (GraphPad® Software, Inc., San Diego, CA, USA). Para os resultados dos estudos *in vitro*, o teste estatístico empregado foi a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Tukey no programa GraphPad Prism 5.00 comparando os grupos de interesse. O nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado suficiente para mostrar diferenças significativas em todos os dados analisados. Todos os gráficos foram obtidos do programa GraphPad Prism 5.00 e expressos como média ± erro padrão (EP) e porcentagens.

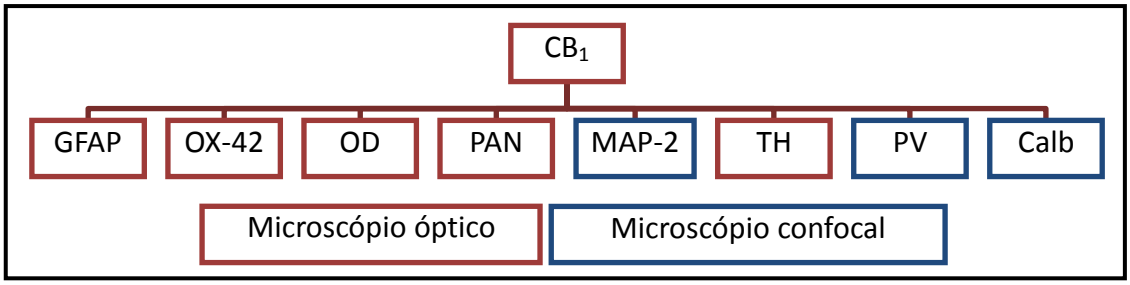
3.4 Delineamentos experimentais

3.4.1 Bloco I - Receptores canabinóides CB_1 nos núcleos da base: estudos de imunofluorescência

Ratos naïve entre 70 e 100 dias de idade foram submetidos à perfusão transcardíaca e seus encéfalos coletados para a técnica de imunofluorescência. Foram conduzidos experimentos de dupla-marcação utilizando os seguintes anticorpos: CB_1, GFAP, OX-42, OD, PAN, MAP-2, TH, parvalbumina e calbindina (n = 3-6).

Inicialmente os cortes foram analisados em microscópio de fluorescência convencional para avaliação qualitativa geral. A partir dessa observação, os resultados mais promissores foram avaliados em microscopia confocal (Figura 3)

Figura 3 - Esquema dos estudos de dupla-marcação de CB_1 com diferentes marcadores nos núcleos da base de ratos naïve (bloco I).



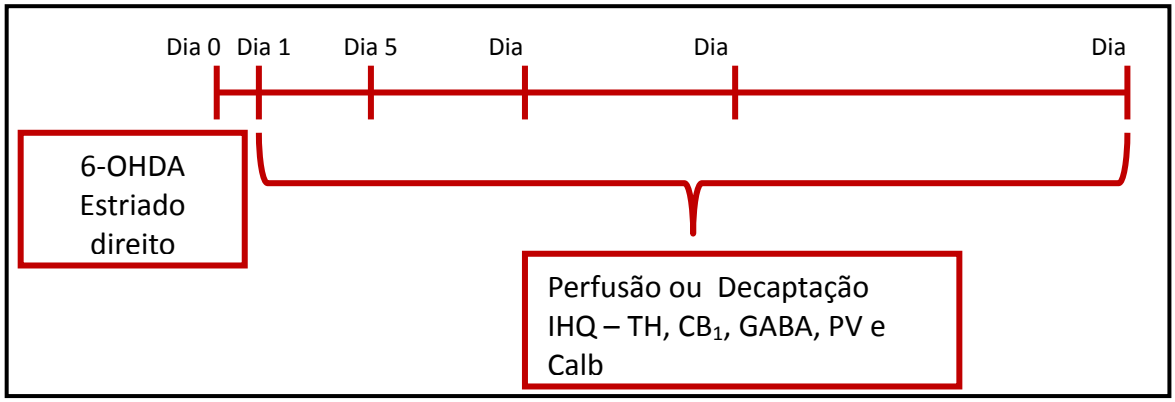
(GFAP) marcador de astrócitos; (OX-42) marcador de micróglia; (OD) marcador de oligodendrócitos; (PAN) marcador de neurofilamentos; (MAP-2) marcador de dendritos; (TH) tirosina hidroxilase, (PV) parvalbumina; e (Calb) calbindina.

3.4.2 Bloco II: Avaliação do decurso temporal da expressão de diferentes proteínas no modelo experimental da Doença de Parkinson in vivo

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico e em 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão (DPL), parte dos animais foi utilizada para experimentos de imunohistoquímica para avaliação da expressão de TH, CB_1, GABA, parvalbumina e calbindina (n =4-5 por grupo) e a outra parte, para experimentos de *immunoblotting* onde foram avaliadas as expressões de TH e GAD (n = 7-8 por grupo). A expressão de TH foi utilizada como uma indicação da extensão da lesão, e a enzima GAD, a parvalbumina e a calbindina foram utilizadas para avaliação de neurônios GABAérgicos já que o CB_1 está localizado em

terminais axônicos desses neurônios (HERKENHAM et al., 1991a). As proteínas ligantes de cálcio parvalbumina a calbindina são expressas em subpopulações diferentes de neurônios GABAérgicos nos núcleos da base (BRICKELL et al., 1999; HONTANILLA; PARENT; GIMÉNEZ-AMAYA, 1997; HONTANILLA et al., 1998; MARSICANO; LUTZ, 1999). Os marcadores de neurônios GABAérgicos foram utilizados para a avaliação de uma possível degeneração desses neurônios causada pela 6-OHDA (WALSH et al., 2010). (Figura4)

Figura 4 - Esquema dos estudos de decurso temporal de diferentes proteínas em ratos submetidos à injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA (bloco II).



(IHQ) imunohistoquímica; (IMB) *immunoblotting*; (TH) tirosina hidroxilase; (PV) parvalbumina; (Calb) Calbindina.

3.4.3 Bloco III - Tratamentos com agonista e antagonista canabinóide no modelo experimental da Doença de Parkinson in vivo

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico e então divididos em 3 grupos: (1) Animais tratados com o veículo dos agentes canabinóides (DMSO); (2) Animais tratados com 2 mg/Kg do agonista canabinóide ACEA (Sigma®) e (3) Animais tratados com 2 mg/kg do antagonista canabinóide AM 251. Apenas para os testes comportamentais foram utilizados ratos SHAM.

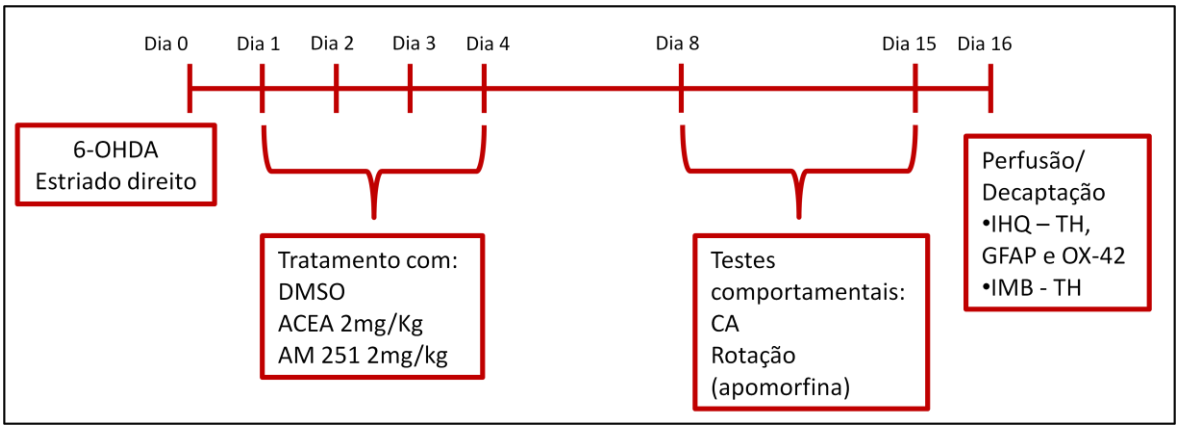
Os grupos foram avaliados quanto aos seguintes aspectos:

- Alterações comportamentais: Utilizando a análise de rotação induzida por apomorfina e em 8 e 15 dias após a lesão (n =7-9).

- Alterações referentes à lesão analisadas 16 dias após a lesão. Análises histológicas gerais: Quantificação de TH e células da glia (GFAP e OX-42) por imunohistoquímica (n = 5) e/ou *immunoblotting* (n = 5).

Toda a sequência dos experimentos realizados está esquematizada na Figura 5

Figura 5 - Esquema dos estudos dos tratamentos com compostos canabinóides em ratos submetidos à injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA (bloco III).



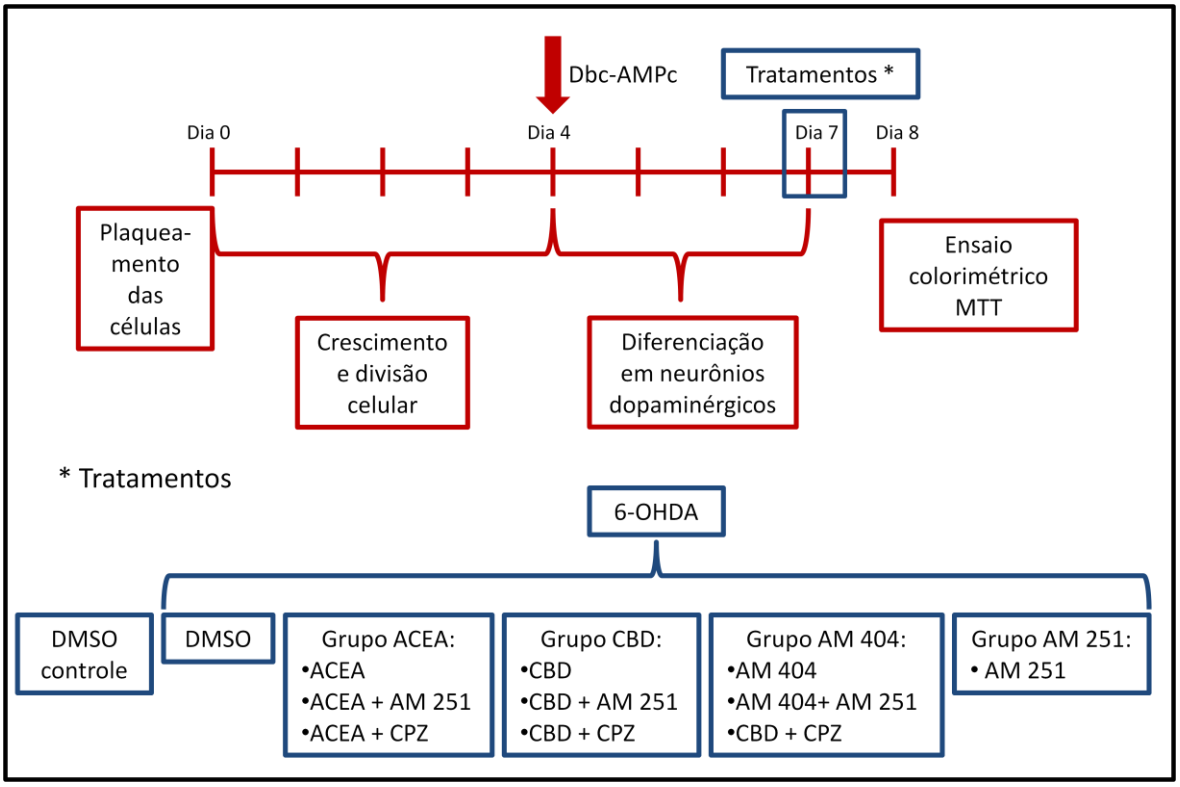
(CA) campo aberto; (IHQ) imunohistoquímica; (IMB) *immunoblotting;* (GFAP) marcador de astrócitos; (OX-42) marcador de micróglia; (TH) tirosina hidroxilase.

3.4.4 Bloco IV - Estudos in vitro: cultura de células expostas à 6-OHDA e tratadas com diferentes compostos canabinóides

As células Neuro-2a foram plaqueadas em uma densidade de 0,5 x 10^4, e após 4 dias foram tratadas com 1mM de dbcAMP (Sigma®) para a diferenciação em neurônios dopaminérgicos. Os tratamentos com 6-OHDA e canabinóides foram feitos após 3 dias, pois este é o pico máximo de produção de dopamina (TREMBLAY et al., 2009). Os grupos de tratamento (n = 5-6) foram: (1) tratadas com DMSO; (2) tratadas com 6-OHDA e DMSO; (3) tratadas com 6-OHDA e ACEA; (4) tratadas com 6-OHDA e ACEA + AM 251; (5) tratadas com 6-OHDA e ACEA + capsazepina (CPZ); (6) tratadas com 6-OHDA e canabidiol; (7) tratadas com 6-OHDA e canabidiol + AM 251; (8) tratadas com 6-OHDA e canabidiol + CPZ; (9) tratadas com 6-OHDA e AM 404; (10) tratadas com 6-OHDA e AM 404 + AM 251; (11) tratadas com 6-OHDA e AM 404 + CPZ; e (12) tratadas com 6-OHDA e AM 251.

As concentrações utilizadas foram 2,5 µM de ACEA, 2,5 µM de CBD, 10 µM de AM 404, 5 µM de CPZ e 10 µM de AM 251. As concentrações de 6-OHDA, canabidiol, AM 404 e CPZ foram determinadas pelas curvas concentração-resposta realizadas para o presente trabalho. Já as concentrações de ACEA e AM 251 foram determinadas com base em estudos que já estavam em andamento em nosso laboratório. Após 24 horas foi realizado o ensaio colorimétrico MTT para avaliação da viabilidade celular (Figura 6).

Figura 6 - Esquema dos estudos dos tratamentos com compostos canabinóides na linhagem de células Neuro-2a diferenciadas em neurônios dopaminérgicos pelo composto dibutiril AMP cíclico (bloco IV).



(dbc AMPc) dibutiril AMP cíclico; (CBD) canabidiol e (CPZ) capsazepina.

4 RESULTADOS

4.1 Bloco I - Receptores canabinóides CB_1 nos núcleos da base: estudos de imunofluorescência

Os estudos de imunofluorescência mostraram que a imunorreatividade para o receptor CB_1 é bastante alta nos núcleos da base. As maiores densidades de marcação foram encontradas na SNpr, no GPe e no GPi. Já no estriado foram encontrados níveis intermediários do receptor CB_1, sendo a maior densidade na porção dorsolateral.

Nossos resultados do padrão de distribuição do CB_1 com marcadores gliais e neuronais estão resumidos na Tabela 1 e ilustrados nas Figuras 7-14 e os resultados mais relevantes estão detalhados a seguir.

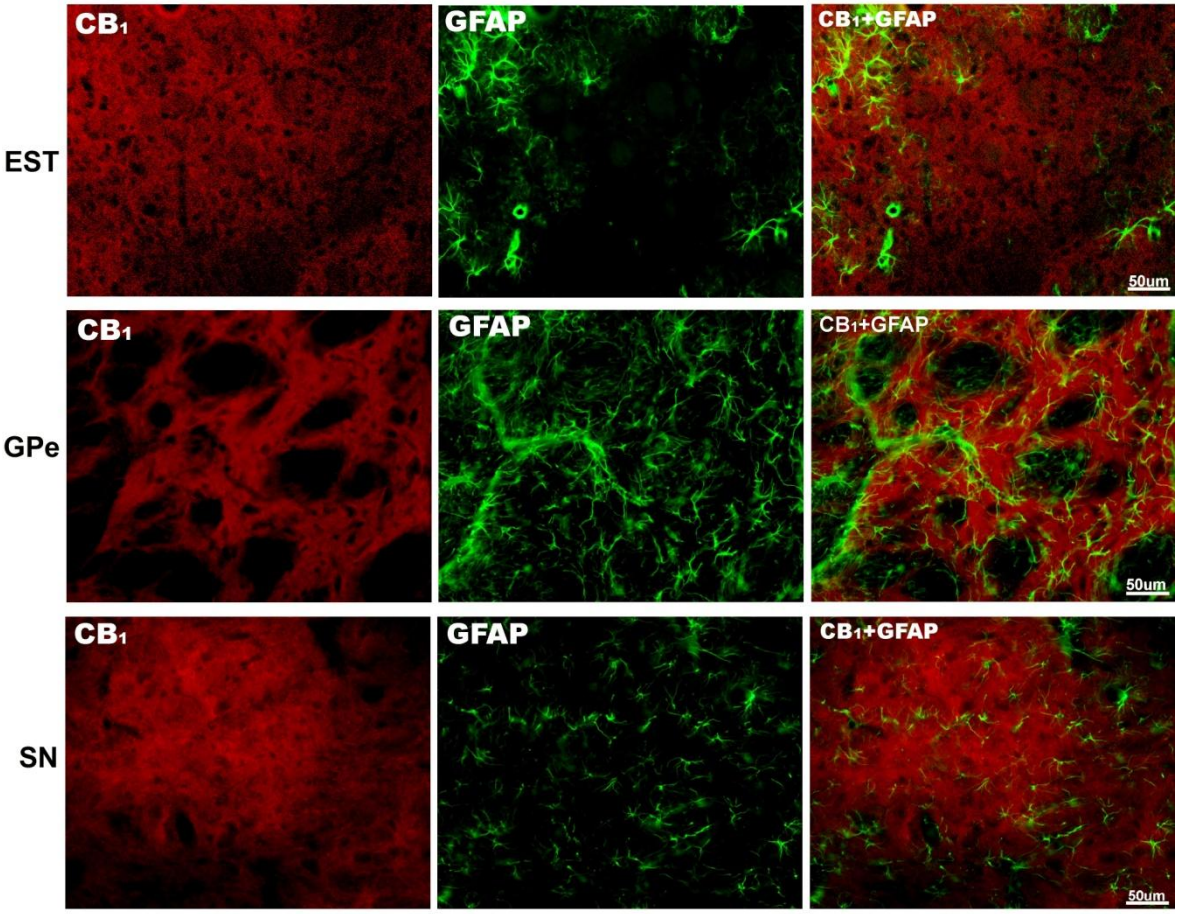
Tabela 1 - Padrão de distribuição do receptor CB_1 com marcadores gliais e neuronais

Proteína / Estrutura	Astrócito (GFAP)	Microglia (OX-42)	Oligo-dendrócito (OD)	Axônio (PAN)	Dendrito (MAP-2)	TH	PV	Calb
EDL	+	+	++	0	++	++++	+++	++
GPe	+	+	+	0	++++	0	++++	+
GPi	+	+	+	0	++++	0	++++	+
SNpr	+	+	++	++	0	0	+++	++

(EDL) estriado dorsolateral, (GPe) globo pálido externo; (GPi) Globo pálido interno; (SNpr) substância negra porção reticulada; (PV) parvalbumina e (Calb) calbindina. Padrão de distribuição muito coincidente (++++), coincidente (+++), moderadamente coincidente (++) raramente coincidente (+); (0) sem coincidência.

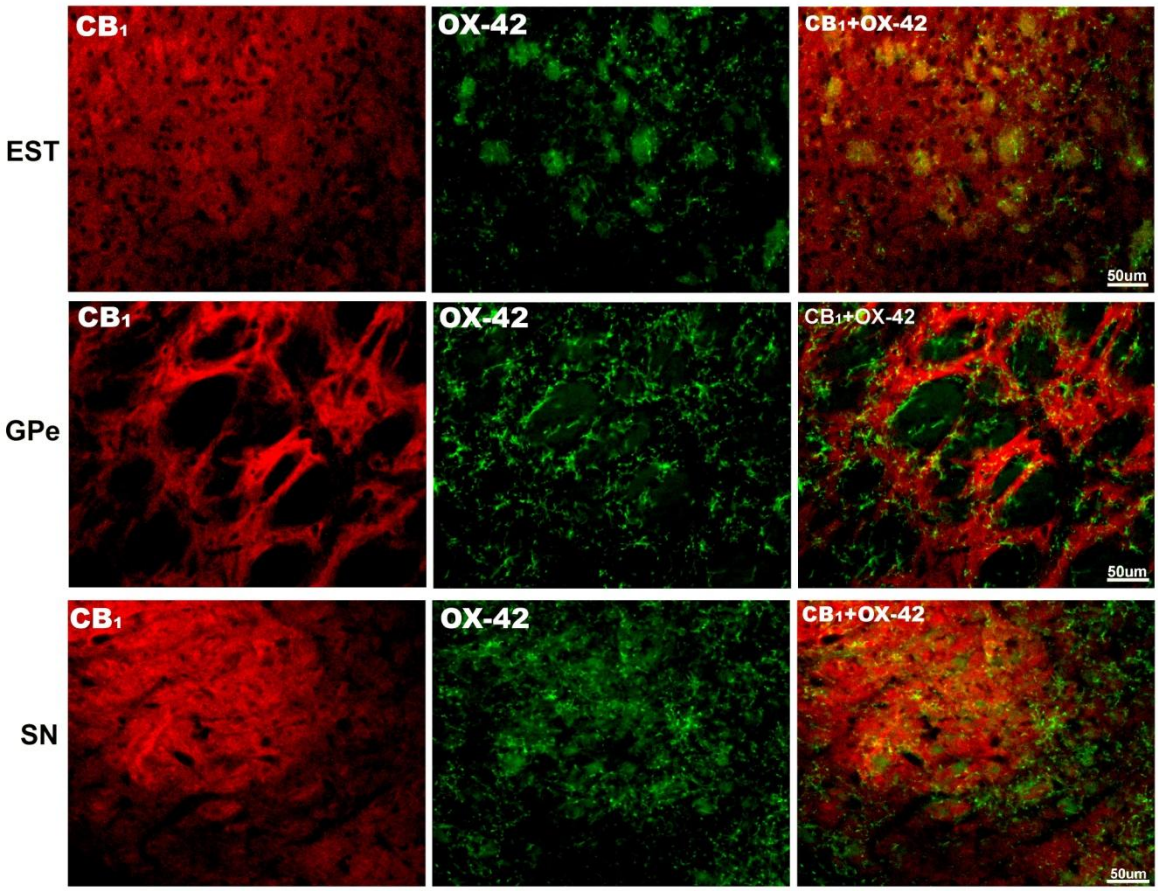
As evidências de justaposição de CB_1 com os marcadores de células gliais (GFAP, OX-42 e OD) foram raras nas quatro estruturas analisadas, com exceção do marcador para oligodendrócito na SNpr que parece estar moderadamente sobreposto com CB_1. Portanto, aparentemente o receptor CB_1 é infimamente expresso em células da glia nos núcleos da base (Figuras 7-9).

Figura 7- Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de astrócitos nos núcleos da base.



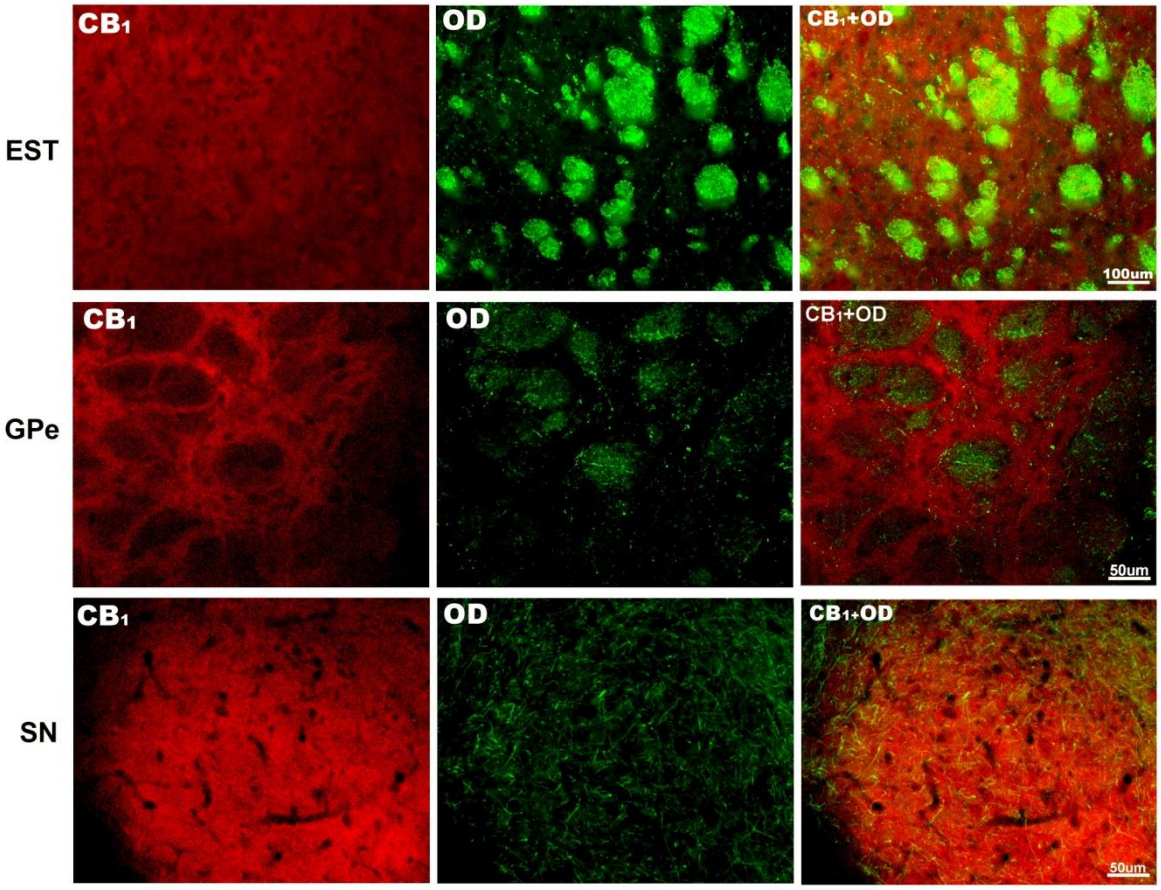
(GFAP) marcador de astrócitos (EST) estriado; (GPe) globo pálido externo e (SN) substância negra.

Figura 8 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de micróglia nos núcleos da base.



(OX-42) marcador de micróglia; (EST) estriado; (GPe) globo pálido externo e (SN) substância negra.

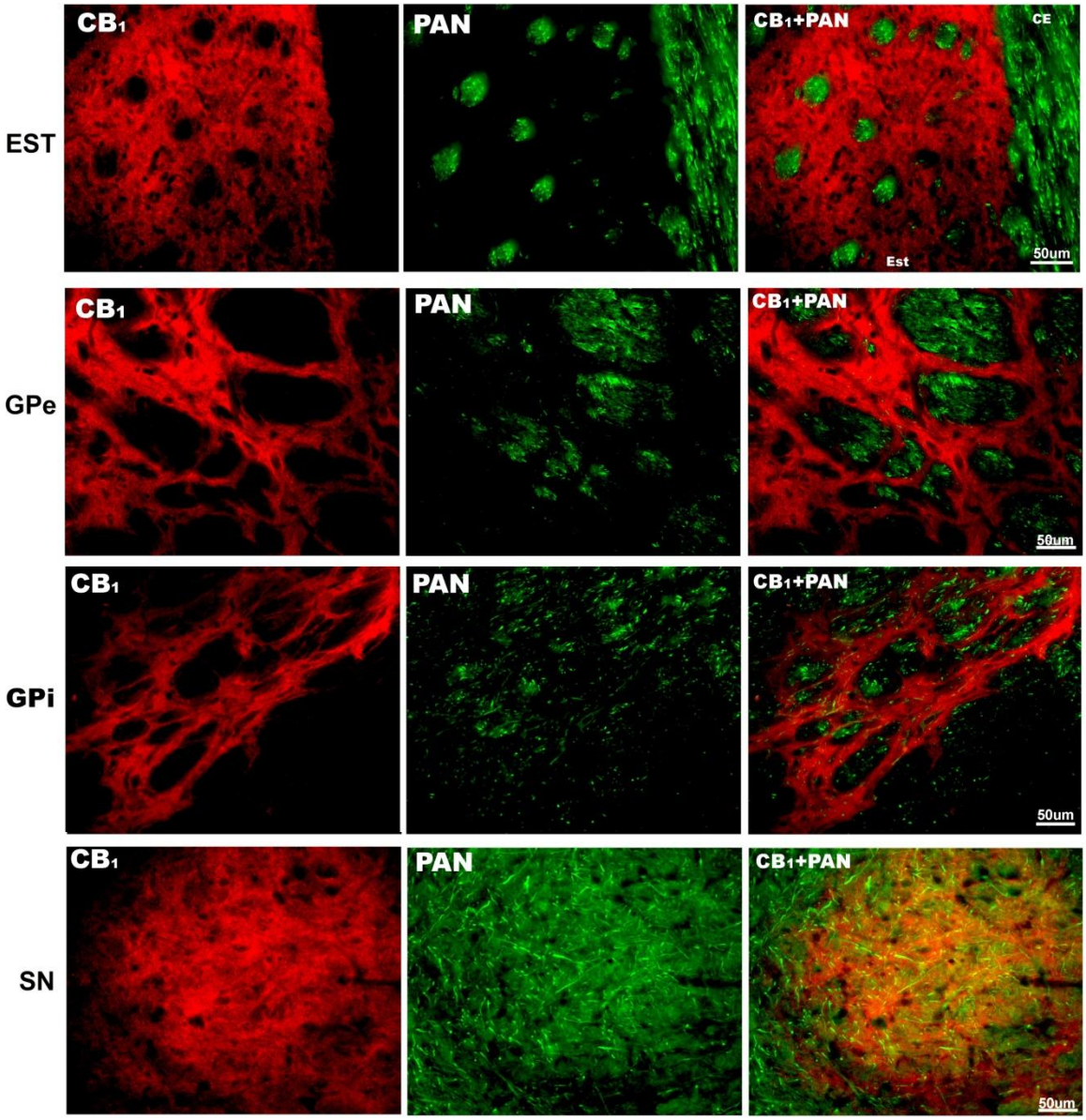
Figura 9- Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de oligodendrócito nos núcleos da base.



(OD) oligodendrócito; (EST) estriado; (GPe) globo pálido externo e (SN) substância negra.

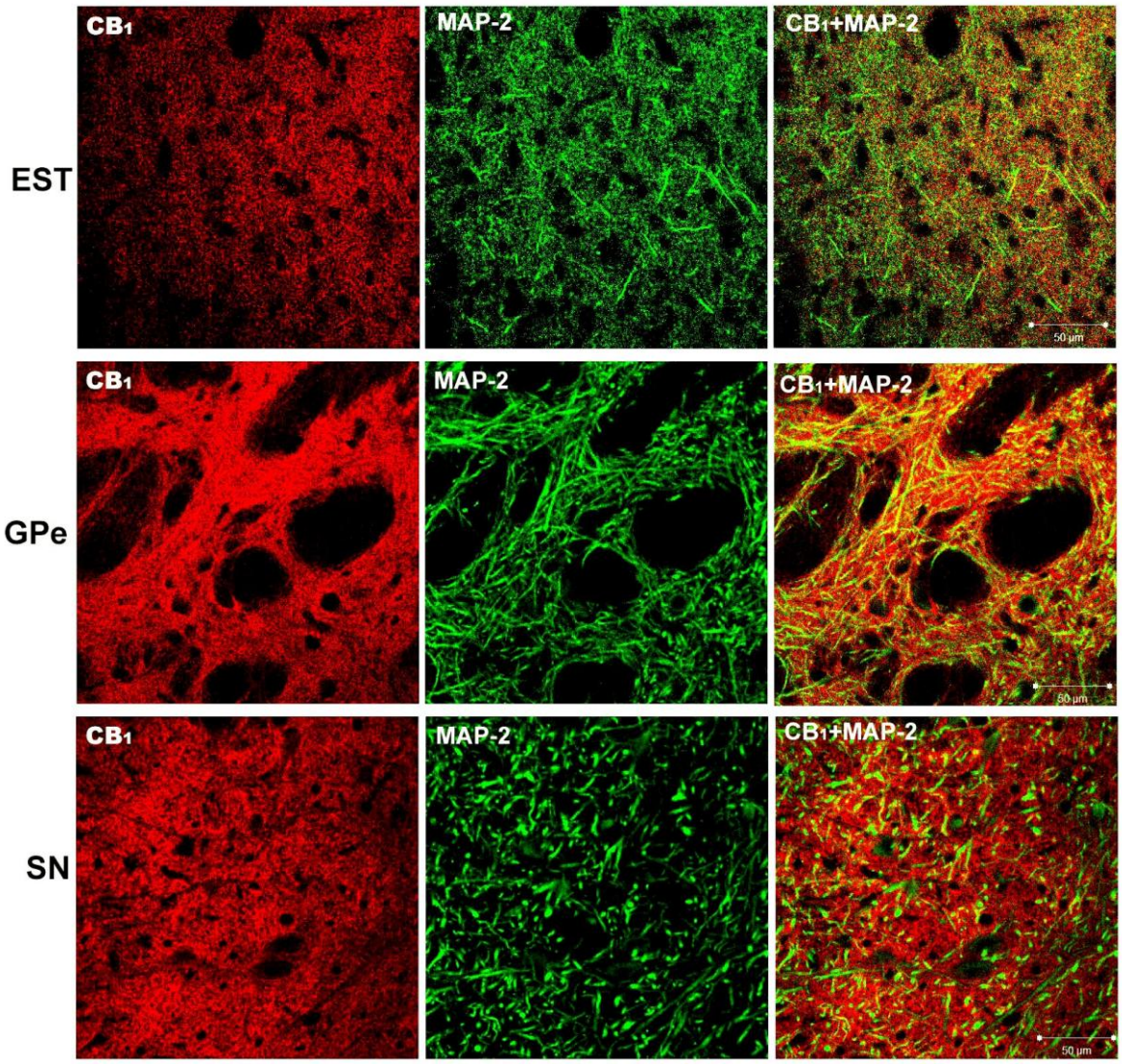
Já em relação aos marcadores de neurônios, observamos moderada sobreposição do receptor CB_1 com o marcador de neurofilamentos (PAN) na SN (Figura 10), e um padrão de distribuição complementar desses dois marcadores no estriado e GPs (Figura 10). Em contrapartida, a imunomarcação para o CB_1 apresentou um padrão de distribuição bastante semelhante à imunomarcação para os dendritos (MAP-2) nos GPs (Figura 11). Não foi encontrada co-localização de TH com CB_1 na SN (o CB_1 é expresso na SNpr e a TH, na SNpc) e GPs (Figura 12), entretanto no estriado, como a imunomarcação para ambas as proteínas ocorre exclusivamente em neurópila, parece existir uma aposição das duas marcações (Figura 12).

Figura 10 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de PAN (marcador de axônios) nos núcleos da base.



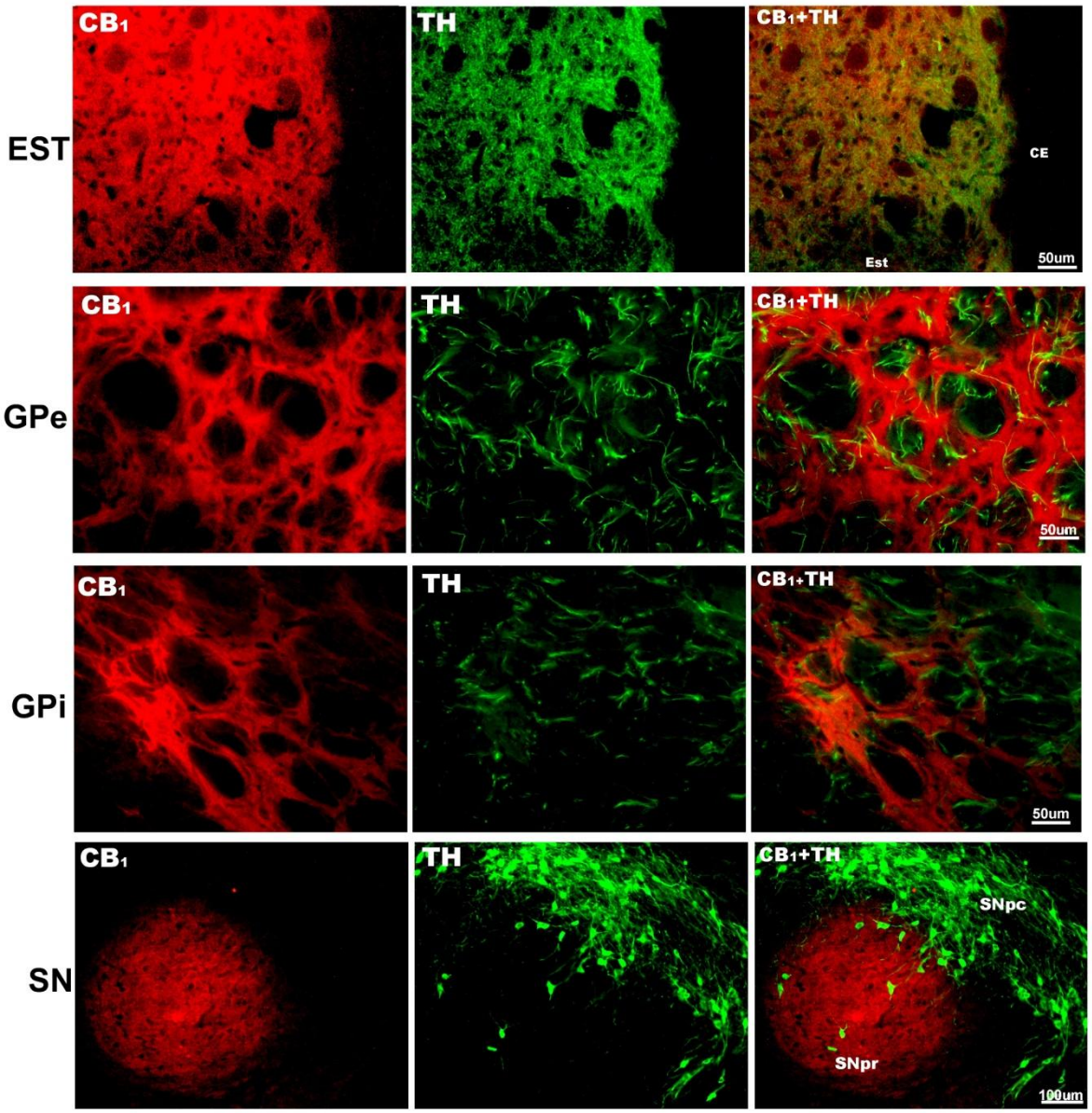
(EST) estriado; (GPe) globo pálido externo; (GPi) globo pálido interno e (SN) substância negra.

Figura 11 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de MAP-2 (marcador de dendritos) nos núcleos da base.



(EST) estriado; (GPe) globo pálido externo; e (SN) substância negra.

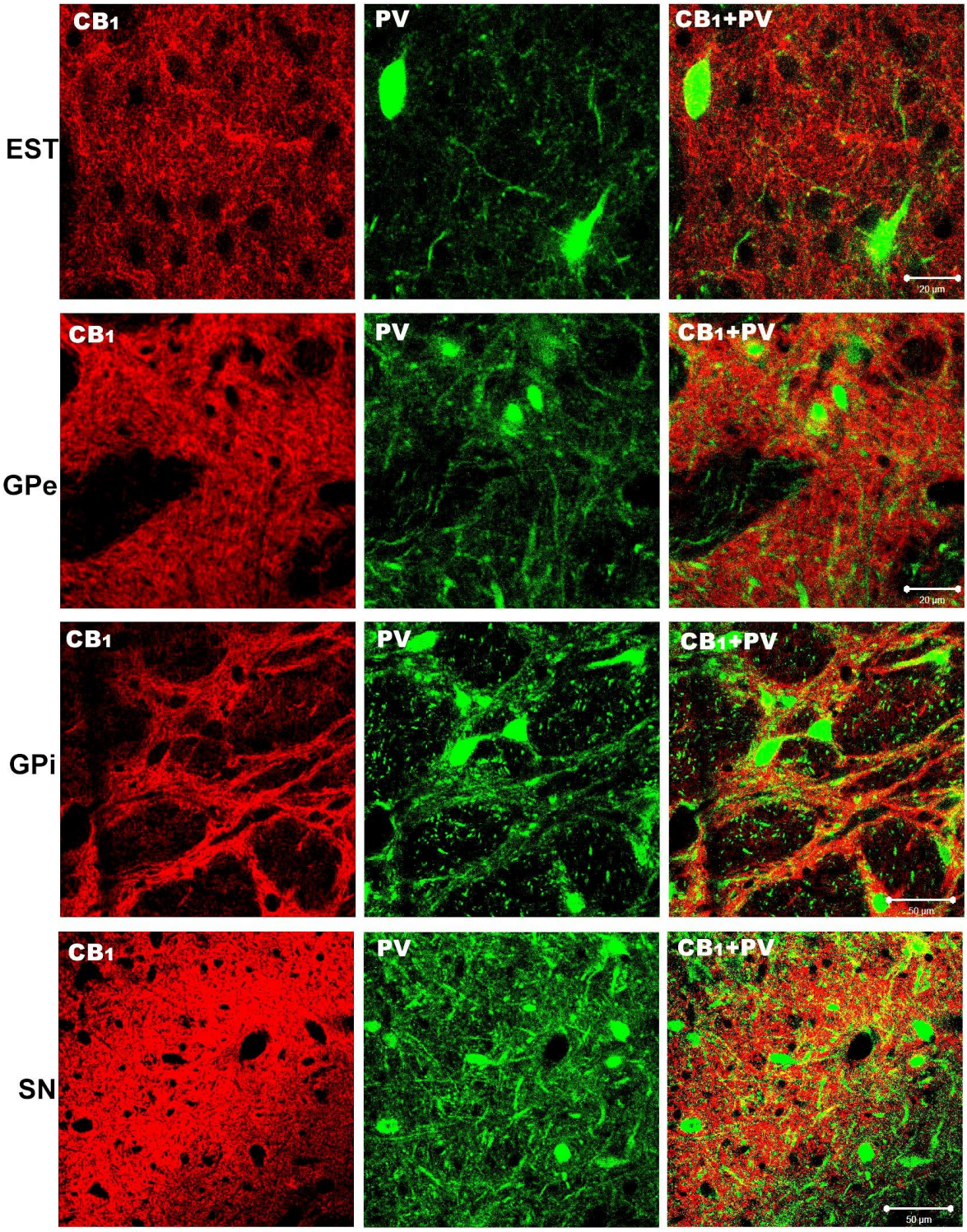
Figura 12- Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de tirosina hidroxilase (TH) nos núcleos da base.



(EST) estriado; (GPe) globo pálido externo; (GPi) globo pálido interno e (SN) substância negra (SNpc) substância negra porção compacta (SNpr) substância negra porção reticulada (CE) cápsula externa.

Em relação às proteínas ligantes de cálcio, as quais foram usadas com a finalidade de marcar subpopulações diferentes de neurônios GABAérgicos, os resultados mostram que a imunomarcação para o receptor CB_1 apresentou um padrão de distribuição semelhante à imunomarcação das fibras de parvalbumin principalmente no GPe e GPi, e discretamente o estriado. Em todas as estruturas parece não haver co-localização do receptor CB_1 com os corpos celulares marcados pela parvalbumina (Figura 13).

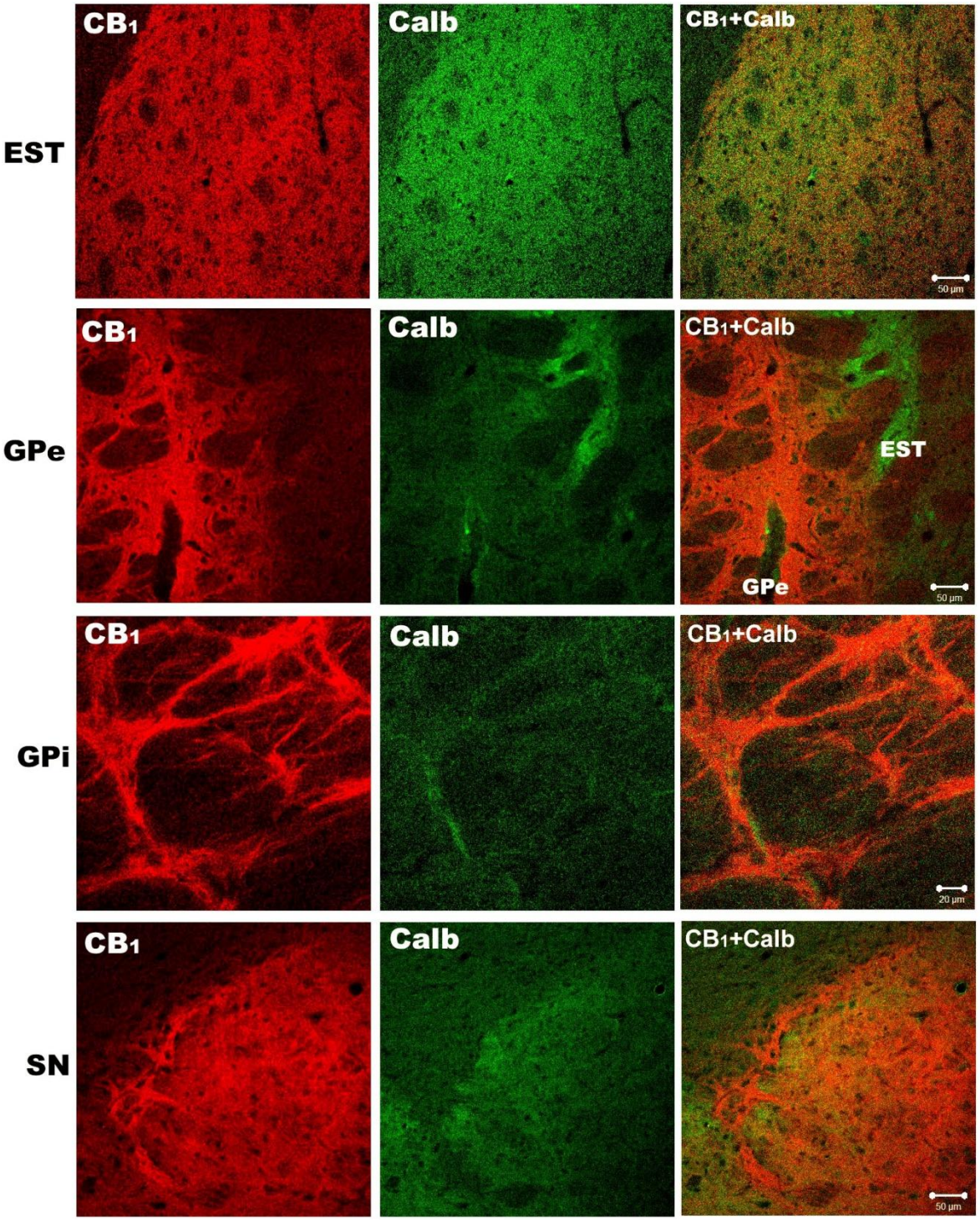
Figura 13- Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de Parvalbumina (PV) nos núcleos da base.



(EST) estriado; (GPe) globo pálido externo; (GPi) globo pálido interno e (SN) substância negra.

Já em relação à calbindina, no estriado a imunomarcação ocorre tanto em corpos celulares, como em neurópila, principalmente no estriado ventromedial, enquanto a imunomarcação para o receptor CB_1 ocorre principalmente no estriado dorsolateral, porém as poucas marcações de neurópila de calbindina no estriado dorsolateral parecem ter um padrão de distribuição semelhante a do receptor CB_1; em contrapartida parece não haver co-localização de CB_1 com os corpos celulares marcados pela calbindina. Foram encontradas raras imunomarcações para calbindina nas duas porções do globo pálido, onde o receptor CB_1 é bastante abundante. Por fim ambas as proteínas foram encontradas na SNpr em neurópila, entretanto o padrão de distribuição das imunomarcações são diferentes. A imunomarcação para calbindina está mais distribuída por toda SNpr, enquanto a do CB_1 está mais concentrada em uma região de forma que a co-localização foi apenas moderada. (Figura 14).

Figura 14 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 e de calbindina nos núcleos da base.



(Calb) calbindina; (EST) estriado; (GPe) globo pálido externo; (GPi) globo pálido interno; (SN) substância negra.

4.2 Bloco II - Avaliação do decurso temporal da expressão de diferentes proteínas no modelo experimental da Doença de Parkinson *in vivo*

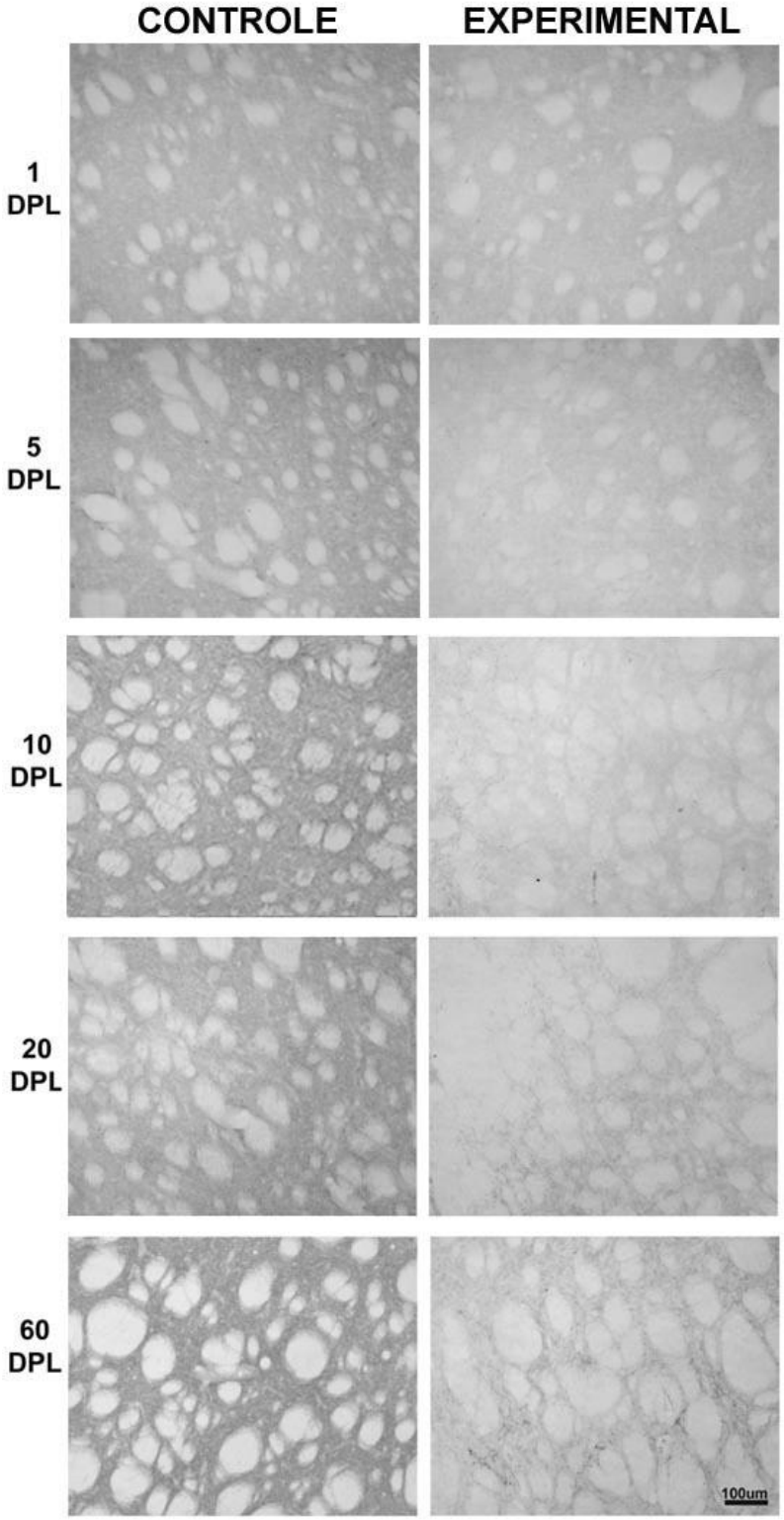
Os dados de decurso temporal foram divididos pelas proteínas estudadas. No texto são mostrados os valores de F e *p* das comparações entre os dias pós-lesão (1, 5, 10, 20 e 60 DPL), os lados controle e experimental, e dias pós-lesão e lados controle e experimental. Quando a análise estatística mostrou diferenças entre os lados controle e experimental de cada período pós-lesão estudado, os valores das médias da porcentagem ± erro padrão, os valores de *p*, e as diferenças estatísticas são mostrados em tabelas especificadas no texto. Quando houve diferenças entre os lados experimentais (comparação entre os dias pós-lesão) os valores das porcentagens e os valores de *p*, são mostrados em uma segunda tabela também especificada no texto. Além disso, 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, as diferenças estatísticas entre os lados controle e experimental para cada DPL e as diferenças estatísticas entre os lados experimentais. Quando apropriado são mostradas figuras dos cortes histológicos apontando as diferenças encontradas.

4.2.1 Decurso temporal da expressão de tirosina hidroxilase nos núcleos da base

Nossos dados mostram, em geral, que a 6-OHDA causou uma diminuição gradual da imunorreatividade para TH no estriado e SNpc nos lados experimentais quando comparados aos lados controles. Essa diminuição foi mais evidente nos períodos pós-lesão mais longos.

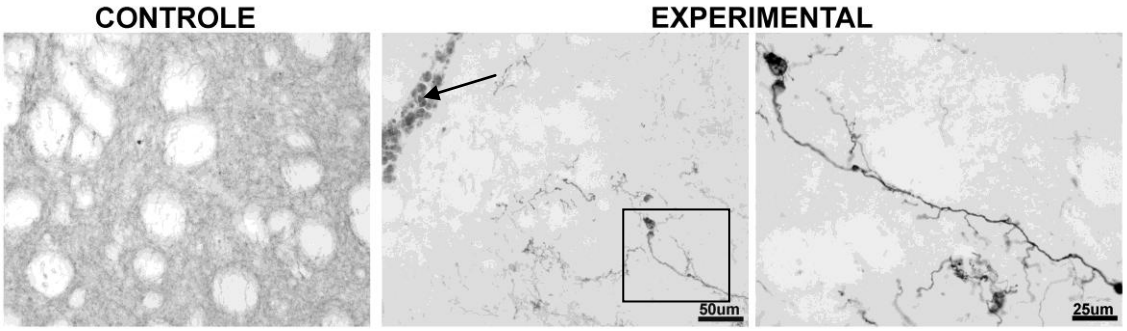
No estriado pela técnica de imunohistoquímica as análises foram qualitativas. Foi possível observar uma diminuição gradual da imunomarcação para TH nos estriados experimentais, com pico em 10 DPL e com uma discreta recuperação em 20 e 60 DPL (Figura 15). No caso dos períodos mais longos pós-lesão, principalmente em 60 DPL, foram observados corpos celulares TH-positivos no lado experimental, que eram ausentes no lado controle, o qual normalmente apresentou imunorreatividade para TH exclusivamente em neurópila. Essas células apresentaram forte marcação para TH e eram mais frequentes próximas ao local da infusão de 6-OHDA (Figura 16).

Figura 15 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de TH no estriado de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão.



(DPL) dias pós-lesão. Notar uma diminuição progressiva de TH no lado experimental com pico em 10 DPL e uma discreta recuperação em 20 e 60 DPL.

Figura 16 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de TH no estriado de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 60 dias pós-lesão.



A seta indica o local da infusão. Nas imagens do lado experimental a imagem da esquerda é o aumento do quadrado demarcado na imagem da direita. Notar o aparecimento de células TH-positivas do lado experimental.

A análise estatística por ANOVA de duas vias para os resultados obtidos com a técnica de *immunoblotting* para o estriado corroboram os resultados das observações da técnica de imunohistoquímica, mostrando diferenças entre os dias pós-lesão [F (4,70) = 6,114, p = 0,00028], os lados controle e experimental [F (4,70) = 93,120, p < 0,00001], e dias pós-lesão e lados controle e experimental [F (4,70) = 6,134, p = 0,00027]. Os valores de porcentagem são mostrados nas tabelas 2 e 3. (Figura 17).

Tabela 2 - Níveis proteicos de TH no estriado de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica *immunoblotting* (n = 6-8).

DPL	Lado controle Média de % ± EP	Lado Experimental Média de% ± EP	*p*
1 DPL	100,0 ± 8,3	90,0 ± 10,1	0,999260
5 DPL	100,0 ± 9,4	71,6 ± 7,9	0,121653
10 DPL	100,1 ± 6,6	33,8 ± 5,9*	0,000164
20 DPL	100,0 ± 6,7	41,0 ± 6,5*	0,000165
60 DPL	100,0 ± 4,3	50,1 ± 4,5*	0,000258

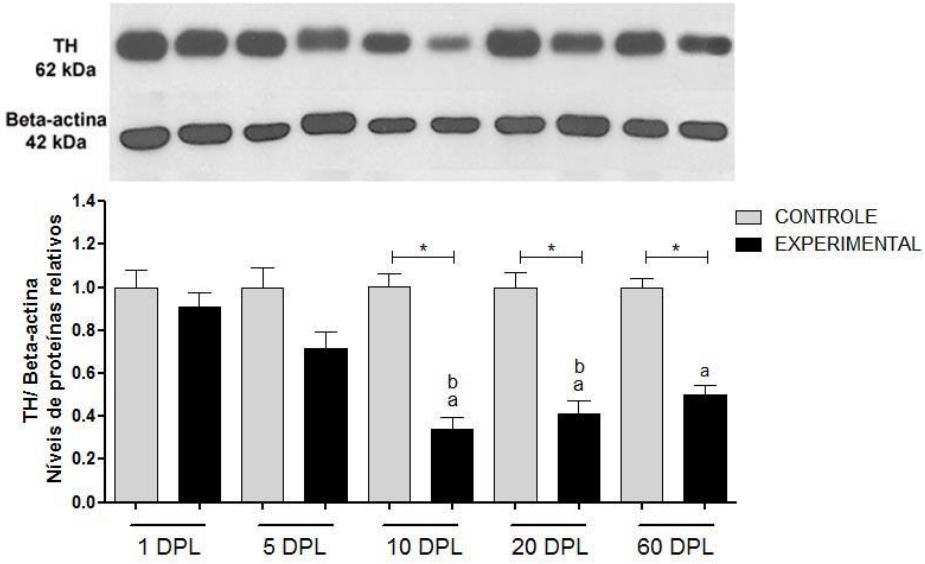
DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey,* diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada DPL

Tabela 3 - Comparações entre os níveis proteicos de TH no estriado experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica *immunoblotting* (n = 6-8).

Comparações entre DPLs	Porcentagem	*p*
1 DPL x 5 DPL	- 18%	0,477918
1 DPL x 10 DPL	-56 % #	0,000164
1 DPL x 20 DPL	-49% #	0,000205
1 DPL x 60 DPL	-40% #	0,001693
5 DPL x 10 DPL	-38 % #	0,008732
5 DPL x 20 DPL	-31%	0,072852
5 DPL x 60 DPL	-21%	0,468054
10 DPL x 20 DPL	+7%	0,999113
10 DPL x 60 DPL	- 16%	0,808292
20 DPL x 60 DPL	- 9%	0,995103

DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, # diferença estatística.

Figura 17 - Níveis proteicos de TH no estriado de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por *immunoblotting*.



(DPL) dias pós-lesão. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferenças estatísticas, * Entre lado controle e lado experimental de cada DPL, (a) diferente de 1DPL experimental e (b) diferente de5 DPL experimental. Valores de *p* mostrados nas tabelas 2 e 3.

Na SNpc tanto a técnica de imunohistoquímica quanto a de *immunoblotting* mostraram diminuição progressiva de TH. Na imunohistoquímica análise estatística por ANOVA de duas vias mostra diferenças entre os dias pós-lesão [F (4,40) = 10,676, p = 0,000006], os lados controle e experimental [F (4,40) = 83,118, p < 0,000001], e dias pós-lesão e lados controle e experimental [F (4,40) = 17,052, p < 0,000001]. Os valores de porcentagem são mostrados nas tabelas 4 e 5. (Figura 18 e 19)

Tabela 4 - Expressão de TH na SNpc de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5)

DPL	**Lado controle Média de % ± EP**	**Lado Experimental Média de% ± EP**	***p***
1 DPL	100 ± 4,5	89,3 ± 8,2	0,999260
5 DPL	100,0 ± 4,9	77,0 ± 8,4	0,121653
10 DPL	100,0 ± 6,9	42,1 ± 3,8*	0,000164
20 DPL	100,0 ± 3,9	33,2 ± 4,7*	0,000165
60 DPL	100,0 ± 6,5	24,6 ± 6,8*	0,000258

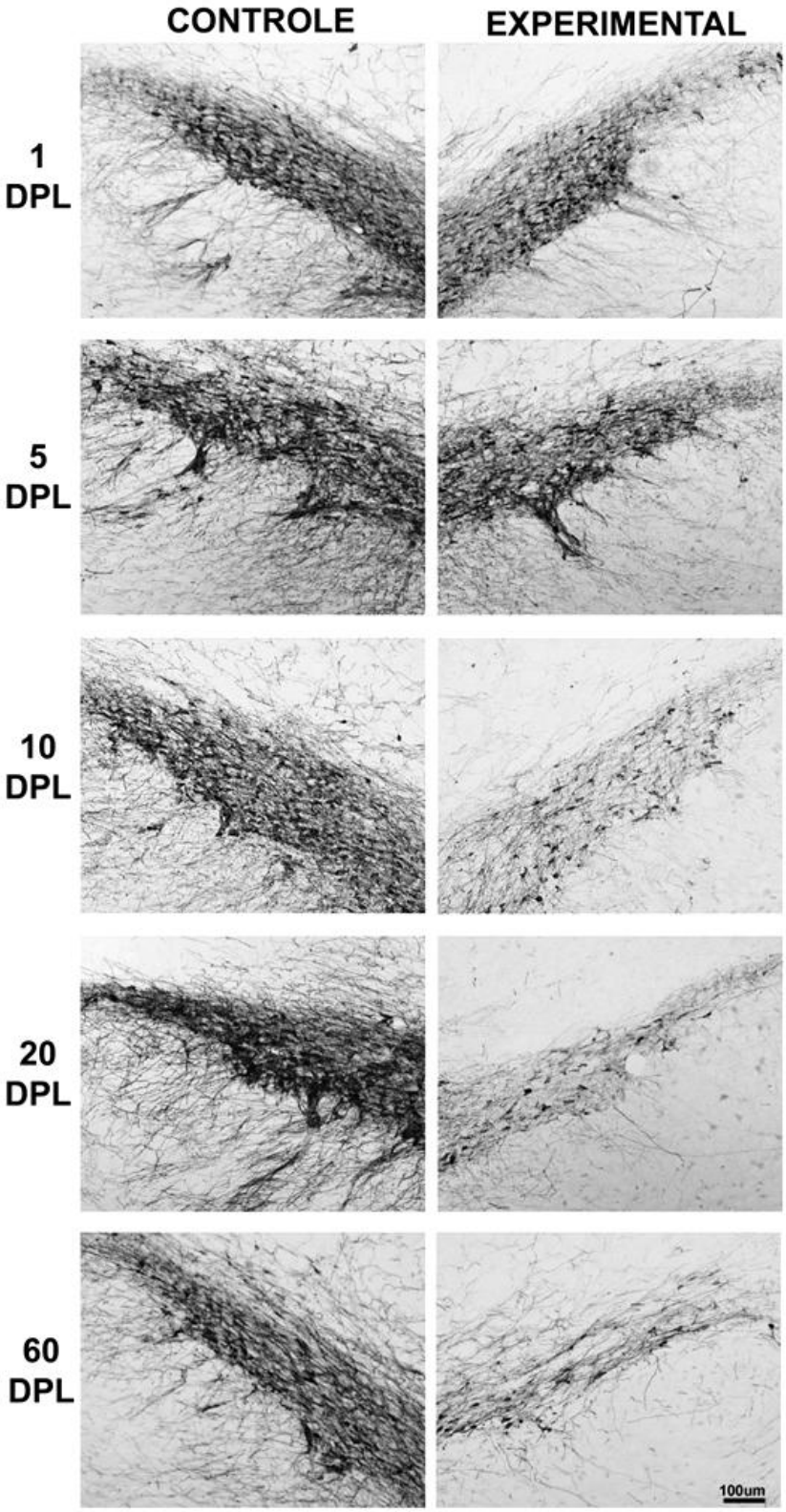
DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, * diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada DPL

Tabela 5 - Comparações entre a expressão de TH na SNpc experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica de imunohistoquímica (n = 5).

Comparações entre DPLs	Porcentagem	*P*
1 DPL x 5 DPL	12 %	0,715173
1 DPL x 10 DPL	47 % #	0,000281
1 DPL x 20 DPL	56 % #	0,000158
1 DPL x 60 DPL	65 % #	0,000158
5 DPL x 10 DPL	35 %	0,065381
5 DPL x 20 DPL	44 % #	0,000319
5 DPL x 60 DPL	52 % #	0,000167
10 DPL x 20 DPL	9 %	0,487571
10 DPL x 60 DPL	17 %	0,129637
20 DPL x 60 DPL	9 %	0,999624

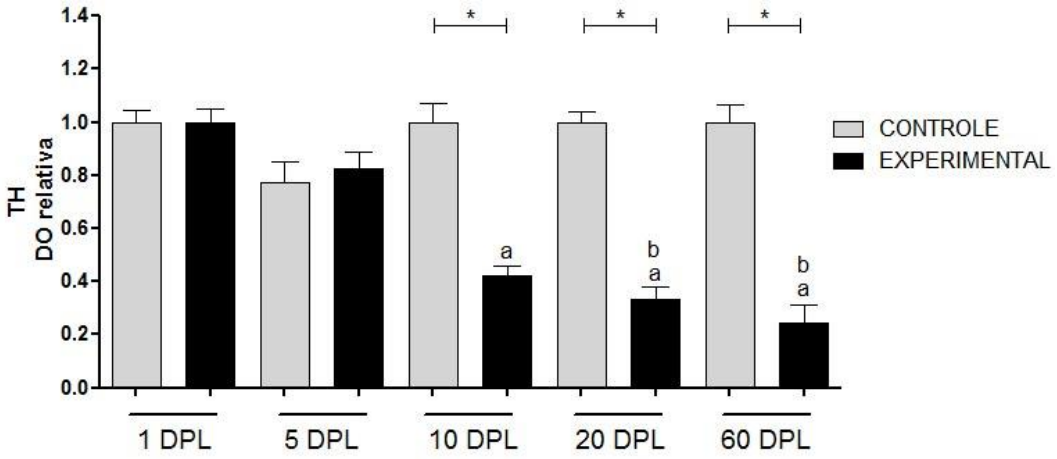
DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, # diferença estatística.

Figura 18 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de TH na SNpc de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão.



(DPL) dias pós-lesão. Notar uma diminuição crescente de TH no lado experimental.

Figura 19 - Expressão de TH na SNpc de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica.



(DPL) dias pós-lesão (DO) densidade óptica. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferenças estatísticas, * Entre lado controle e lado experimental de cada DPL, (a) diferente de 1DPL experimental e (b) diferente de5 DPL experimental. Valores de *p* mostrados nas tabelas 4 e 5.

Os resultados do *immunoblotting* para SN corroboram os achados de imunohistoquímica, entretanto a quantificação mostra diferenças consideráveis apenas a partir de 20 DPL. A análise estatística por ANOVA de duas vias mostram alterações entre os dias pós-lesão [F (4,68) = 3,731, p = 0,008372], os lados controle e experimental [F (4,68) = 22,931, p = 0,000009], e dias pós-lesão e lados controle e experimental [F (4,68) = 3,724, p = 0,008452]. Os valores de porcentagem são mostrados nas tabelas 6 e 7. (Figura 20).

Tabela 6 - Níveis proteicos de TH na SN de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica *immunoblotting* (n = 8).

DPL	Lado controle Média de % ± EP	Lado Experimental Média de% ± EP	*p*
1 DPL	100,0 ± 8,5	99,5 ± 6,4	1,000000
5 DPL	100,0 ± 8,3	97,6 ± 6,9	1,000000
10 DPL	100,0 ± 6,5	70,9 ± 6,9	0,257582
20 DPL	100,0 ± 12,0	53,9 ± 10,9*	0,004947
60 DPL	100,0 ± 7,0	54,7 ± 3,3*	0,013631

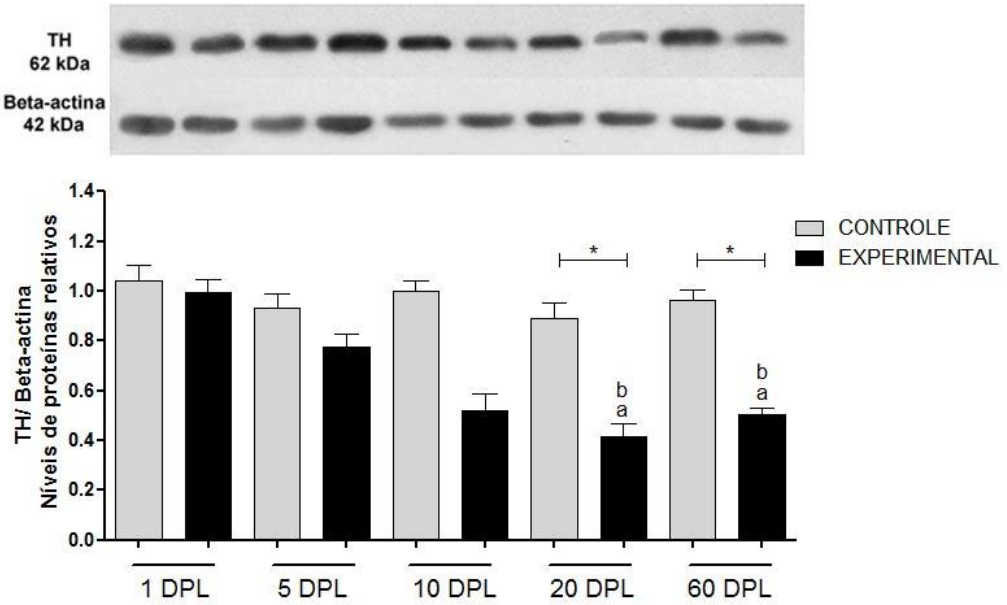
DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, * diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada DPL

Tabela 7- Comparações entre os níveis proteicos de TH na SN experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica *immunoblotting* (n = 6-8).

Comparações entre DPLs	Porcentagem	*p*
1 DPL x 5 DPL	2 %	1,000000
1 DPL x 10 DPL	29 %	0,281565
1 DPL x 20 DPL	46 % #	0,005759
1 DPL x 60 DPL	45 % #	0,010830
5 DPL x 10 DPL	27 %	0,373344
5 DPL x 20 DPL	44 % #	0,009611
5 DPL x 60 DPL	43 % #	0,017444
10 DPL x 20 DPL	17 %	0,889760
10 DPL x 60 DPL	16 %	0,929972
20 DPL x 60 DPL	- 1 %	1,000000

DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, # diferença estatística.

Figura 20 - Níveis proteicos de TH na SN de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por *immunoblotting*.



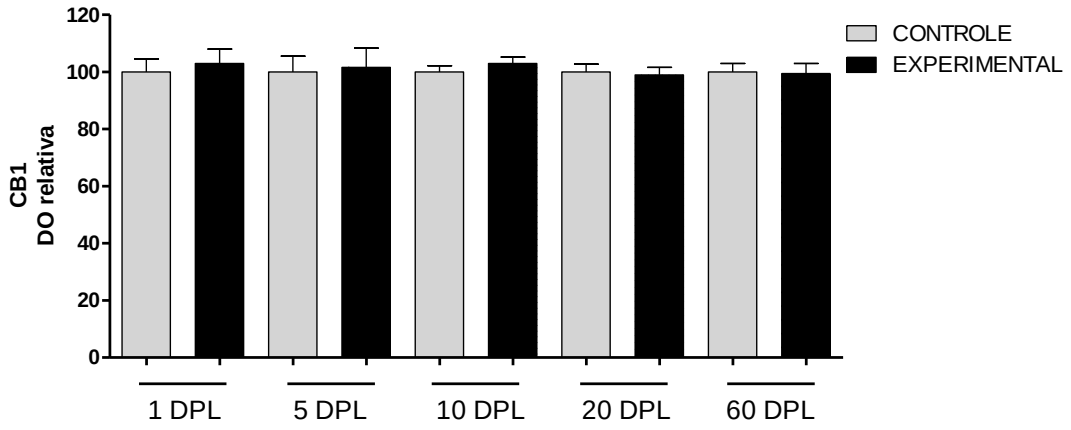
(DPL) dias pós-lesão. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferenças estatísticas, * Entre lado controle e lado experimental de cada DPL, (a) diferente de 1DPL experimental e (b) diferente de5 DPL experimental. Valores de *p* mostrados nas tabelas 6 e 7.

4.2.2 Decurso temporal da expressão de CB_1 nos núcleos da base

As análises de CB_1 foram restritas à técnica de imunohistoquímica, pois observamos uma variação complexa e distinta da expressão dessa proteína nas diferentes estruturas dos núcleos da base, e pela técnica de *immunoblotting* poderíamos perder estes detalhes. Além disso, não obtivemos um bom padrão de marcação de CB_1 no *immunoblotting*.

Não foram observadas diferenças na expressão dos receptores CB_1 no estriado entre os lados controles e experimentais em nenhum dos períodos pós-lesão analisados. No estriado a ANOVA de duas vias mostra que não há diferenças entre os dias pós-lesão [F (4,38) = 0,148, p = 0,962608], os lados controle e experimental [F (4,38) = 0,153, p = 0,697748], e dias pós-lesão e lados controle e experimental [F (4,38) = 0,125, p = 0,972665]. (Figura 21).

Figura 21 - Expressão de CB_1 no estriado de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica.



(DPL) dias pós-lesão (DO) densidade óptica. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, $p > 0,05$ para comparação entre os lados controle e experimental de cada DPL e entre os lados experimentais de todas as DPLs.

No GPe a variação temporal da expressão de CB_1 foi bifásica, ou seja, nos períodos pós-lesão mais curtos houve aumento da imunorreatividade para o receptor CB_1 e, gradualmente, os períodos pós-lesão mais longos apresentaram diminuição da imunomarcação para o receptor CB_1. A análise estatística por ANOVA de duas vias mostra diferenças entre os dias pós-lesão [F (4,40) = 11,978, p = 0,000002], os lados controle e experimental [F (4,40) = 10,125, p = 0,002827], e dias pós-lesão e lados controle e experimental [F (4,40) = 11,978, p = 0,000002]. Os valores de porcentagem são mostrados nas tabelas 8 e 9. (Figuras 22 e 23).

Tabela 8 - Expressão de CB_1 no GPe de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5).

DPL	Lado controle Média de % ± EP	Lado Experimental Média de% ± EP	*p*
1 DPL	100,0 ± 6,3	144,7 ± 11,6*	0,000240
5 DPL	100,0 ± 1,8	128,8 ± 6,6*	0,030557
10 DPL	100,0 ± 4,8	113,2 ± 4,5	0,832599
20 DPL	100,0 ± 2,6	100,3 ± 4,3	1,000000
60 DPL	100,0 ± 2,2	71,0 ± 6,1*	0,028780

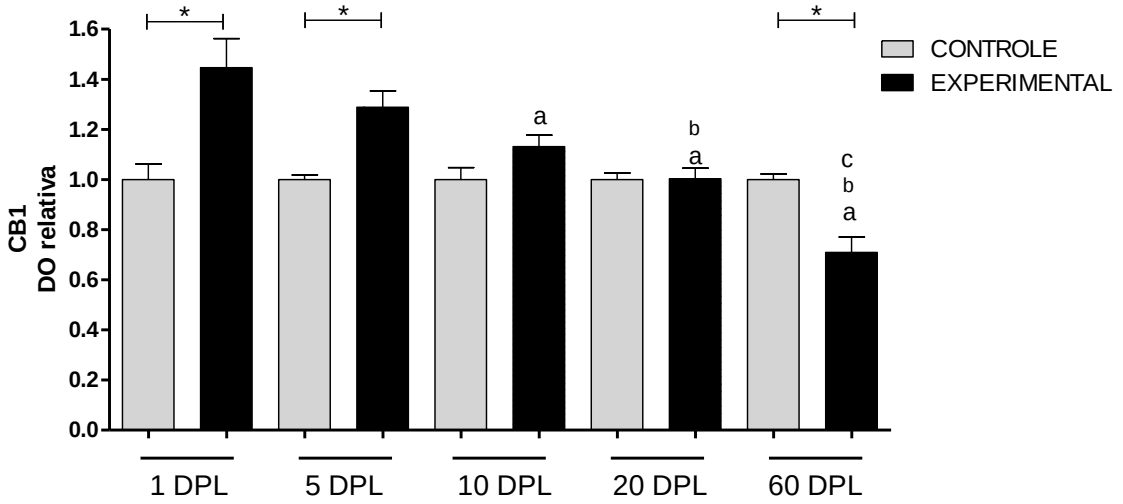
DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, * diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada DPL

Tabela 9 - Comparações entre a expressão de CB_1 no GPe experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica de imunohistoquímica (n = 5).

Comparações entre DPLs	Porcentagem	*p*
1 DPL x 5 DPL	16 %	0,639927
1 DPL x 10 DPL	32 % #	0,012750
1 DPL x 20 DPL	44 % #	0,000249
1 DPL x 60 DPL	74 % #	0,000158
5 DPL x 10 DPL	16 %	0,650744
5 DPL x 20 DPL	29 % #	0,033232
5 DPL x 60 DPL	58 % #	0,000158
10 DPL x 20 DPL	13 %	0,848263
10 DPL x 60 DPL	42 % #	0,000393
20 DPL x 60 DPL	29 % #	0,026426

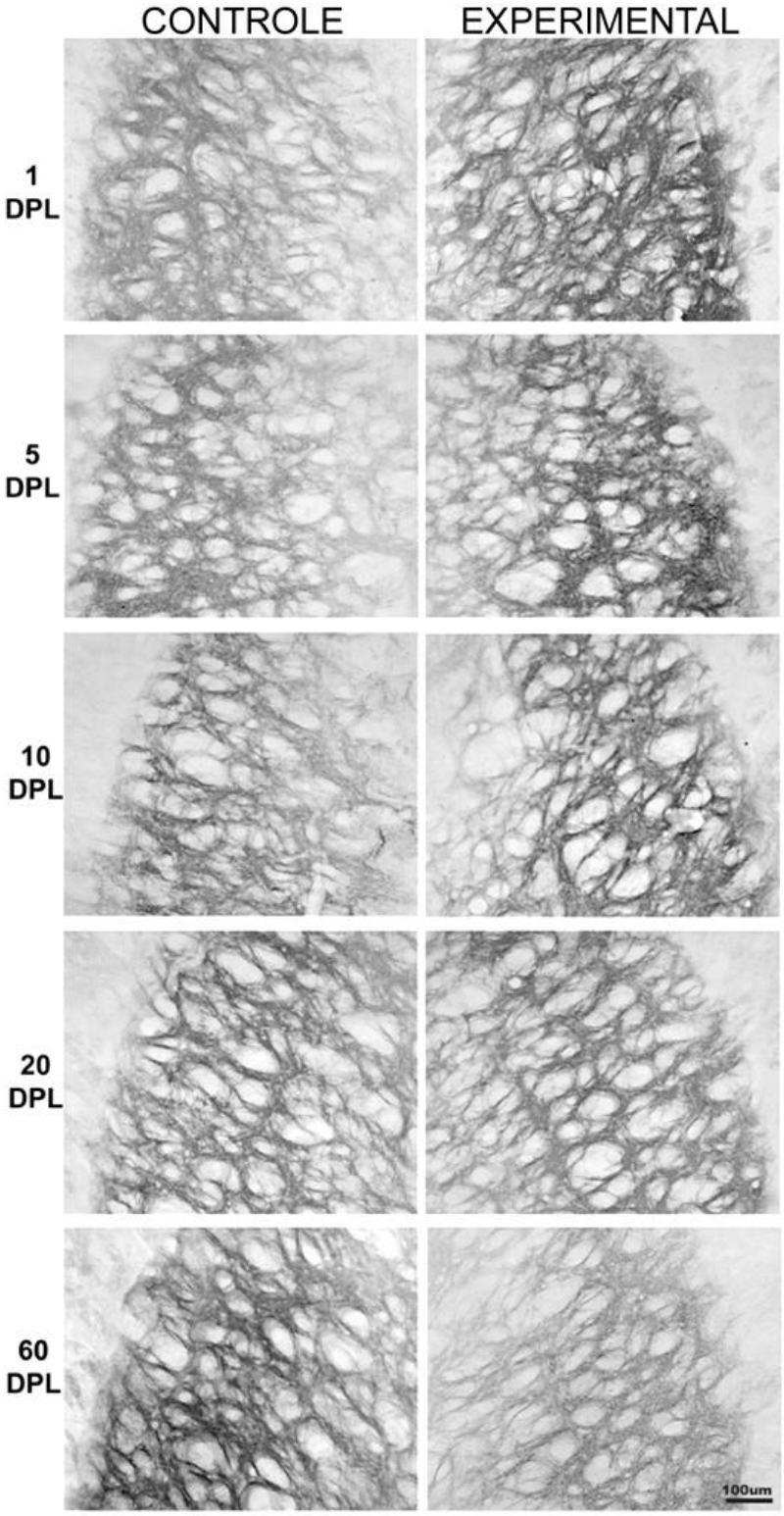
DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, # diferença estatística

Figura 22 - Expressão de CB_1 no GPe de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica.



(DPL) dias pós-lesão (DO) densidade óptica. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferenças estatísticas, * Entre lado controle e lado experimental de cada DPL, (a) diferente de 1DPL experimental, (b) diferente de 5 DPL experimental e (c) diferente de 10 DPL. Valores de *p* mostrados nas tabelas 8 e 9.

Figura 23 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 no GPe de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão.



(DPL) dias pós-lesão. Notar um aumento da expressão de CB_1 no lado experimental que diminui ao longo dos períodos pós-lesão.

A variação temporal da expressão de CB_1 no GPi foi bifásica. Em 1 DPL foi observado um aumento da expressão de CB_1, e a partir de 5 DPL em diante foi observada uma diminuição gradual da expressão do receptor CB_1. A análise estatística por ANOVA de duas vias mostra diferenças entre os dias pós-lesão [$F (4,40) = 21,968$, $p < 0,000001$], os lados controle e experimental [$F (4,40) = 25,130$, $p = 0,000011$], e dias pós-lesão e lados controle e experimental [$F (4,40) = 21,968$, $p < 0,000001$]. Os valores de porcentagem são mostrados nas tabelas 10 e 11. (Figuras 24 e 25).

Tabela 10 - Expressão de CB_1 no GPi de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5).

DPL	Lado controle Média de % ± EP	Lado Experimental Média de% ± EP	*p*
1 DPL	100,0 ± 8,4	151,7 ± 9,9*	0,000285
5 DPL	100,0 ± 6,5	83,2 ± 9,1	0,763276
10 DPL	100,0 ± 2,1	74,5 ± 7,2	0,235273
20 DPL	100,0 ± 4,7	40,5 ± 2,0*	0,000165
60 DPL	100,0 ± 4,5	42,0 ± 7,8*	0,000170

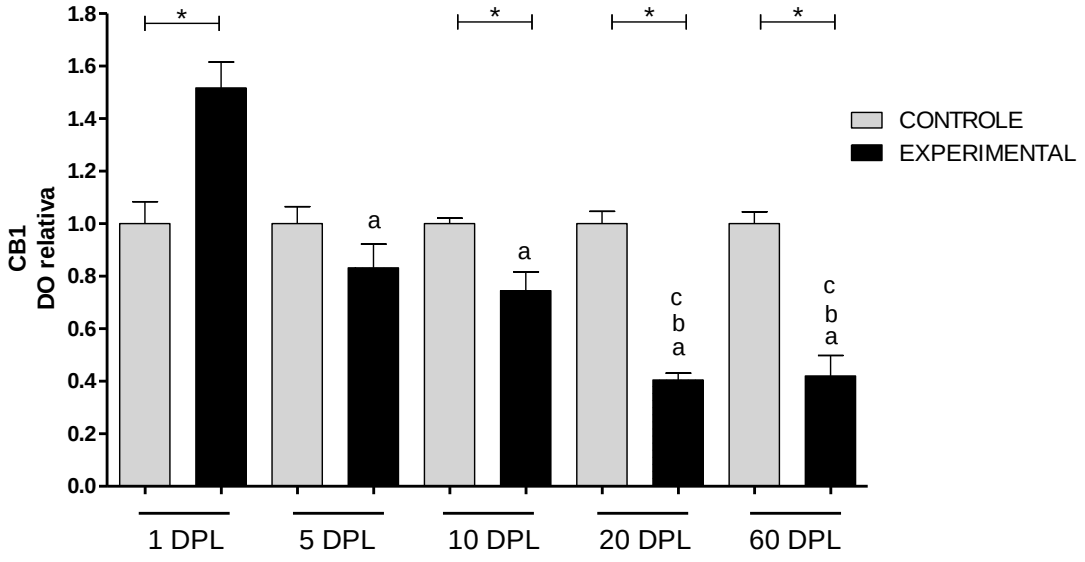
DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, * diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada DPL

Tabela 11 - Comparações entre a expressão de CB_1 no GPi experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica de imunohistoquímica (n = 5).

Comparações entre DPLs	Porcentagem	*p*
1 DPL x 5 DPL	69 % #	0,000158
1 DPL x 10 DPL	77 % #	0,000158
1 DPL x 20 DPL	111 % #	0,000158
1 DPL x 60 DPL	110 % #	0,000158
5 DPL x 10 DPL	9 %	0,996005
5 DPL x 20 DPL	43 % #	0,002716
5 DPL x 60 DPL	41 % #	0,004197
10 DPL x 20 DPL	34 % #	0,031246
10 DPL x 60 DPL	33 % #	0,046067
20 DPL x 60 DPL	-1 %	1,000000

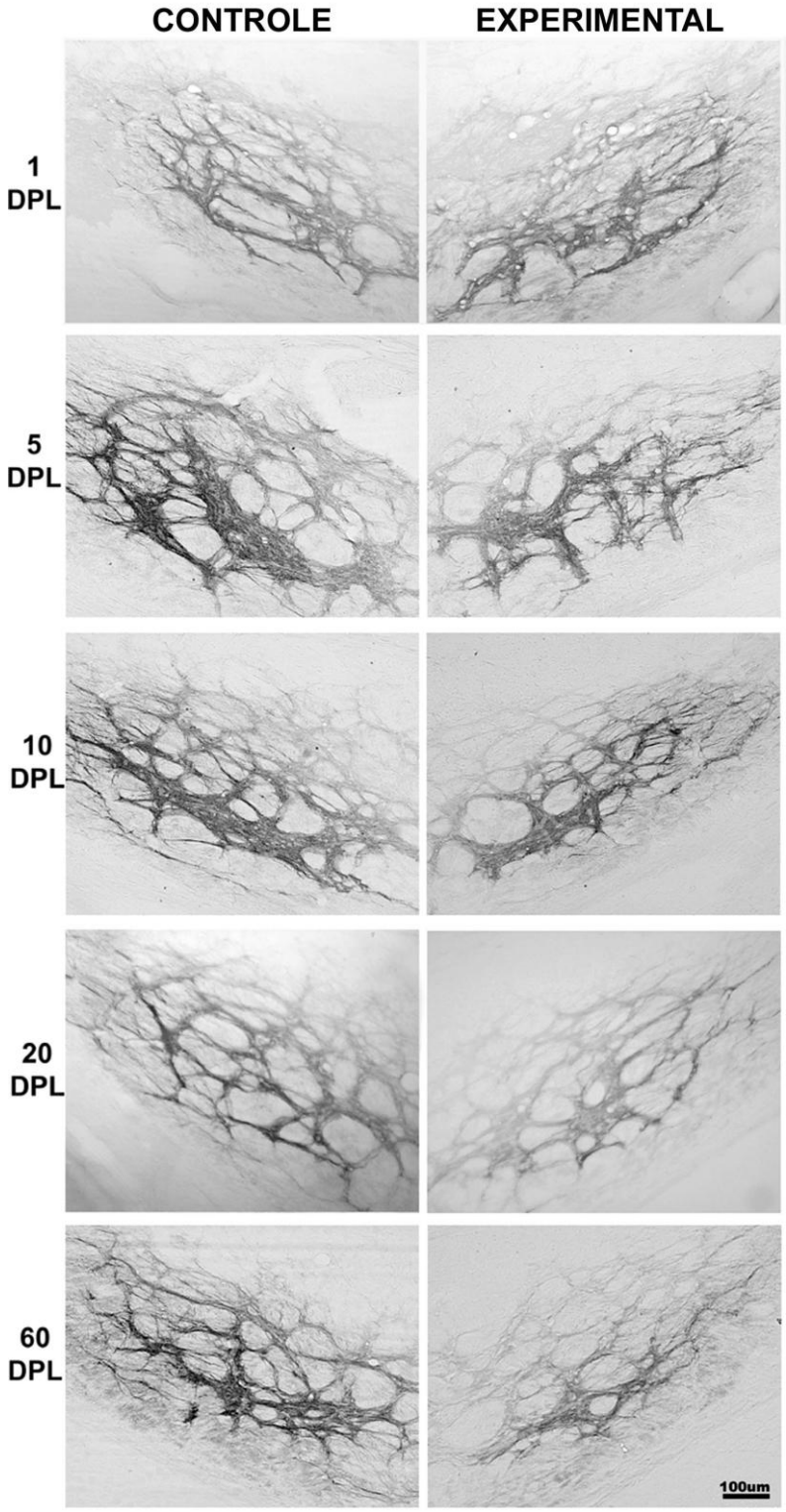
DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, # diferença estatística.

Figura 24 - Expressão de CB_1 no GPi de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica.



(DPL) dias pós-lesão (DO) densidade óptica. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferenças estatísticas * Entre lado controle e lado experimental de cada DPL, (a) diferente de 1DPL experimental, (b) diferente de 5 DPL experimental e (c) diferente de 10 DPL. Valores de *p* mostrados nas tabelas 10 e 11.

Figura 25 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 no GPi de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão.



(DPL) dias pós-lesão. Notar um aumento da expressão de CB_1 no lado experimental em 1 DPL e diminuição crescente ao longo dos outros períodos pós-lesão.

Na SNpr houve diminuição gradual da expressão do receptor CB_1 no lado experimental. A análise estatística por ANOVA de duas vias mostra diferenças entre os dias pós-lesão [F (4,40) = 2,869, p = 0,035195], os lados controle e experimental [F (4,40) = 51,896, p < 0,000001], e dias pós-lesão e lados controle e experimental [F (4,40) = 2,869, p = 0,035195]. Os valores de porcentagem são mostrados nas tabelas 12 e 13. (Figuras 26 e 27).

Tabela 12- Expressão de CB_1 na SNpr de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5).

DPL	**Lado controle Média de % ± EP**	**Lado Experimental Média de% ± EP**	***p***
1 DPL	100,0 ± 3,4	91,7 ± 4,1	0,992601
5 DPL	100,0 ± 9,4	84,0 ± 8,2	0,692639
10 DPL	100,0 ± 5,8	65,0 ± 5,2*	0,007286
20 DPL	100,0 ± 3,5	59,8 ± 5,2*	0,001340
60 DPL	100,0 ± 2,5	61,1 ± 9,0*	0,002045

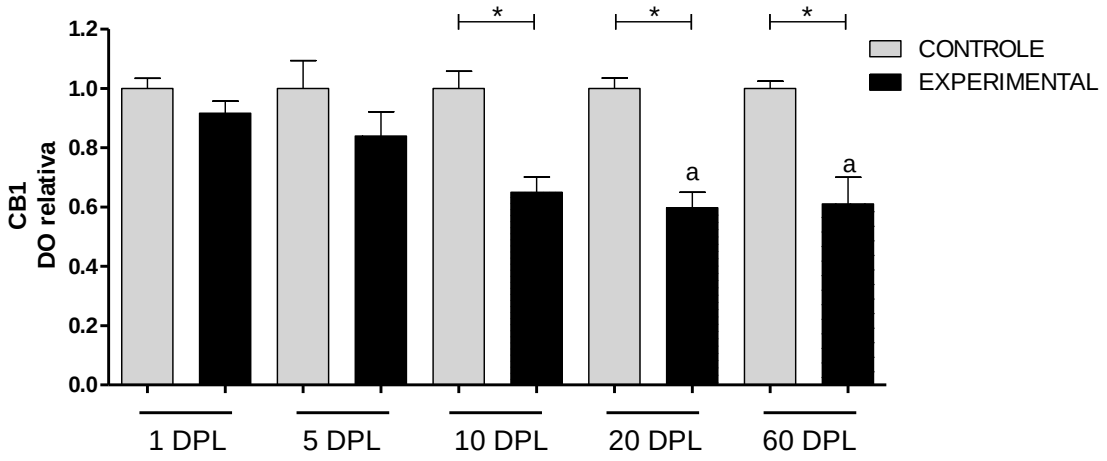
DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, * diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada DPL.

Tabela 13 - Comparações entre a expressão de CB_1 na SNpr experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica de imunohistoquímica (n = 5).

Comparações entre DPLs	Porcentagem	*p*
1 DPL x 5 DPL	8 %	0,995818
1 DPL x 10 DPL	27 %	0,088318
1 DPL x 20 DPL	32 % #	0,019872
1 DPL x 60 DPL	31 % #	0,029479
5 DPL x 10 DPL	19 %	0,465293
5 DPL x 20 DPL	24 %	0,166537
5 DPL x 60 DPL	23 %	0,223333
10 DPL x 20 DPL	5 %	0,999824
10 DPL x 60 DPL	4 %	0,999984
20 DPL x 60 DPL	- 1 %	1,000000

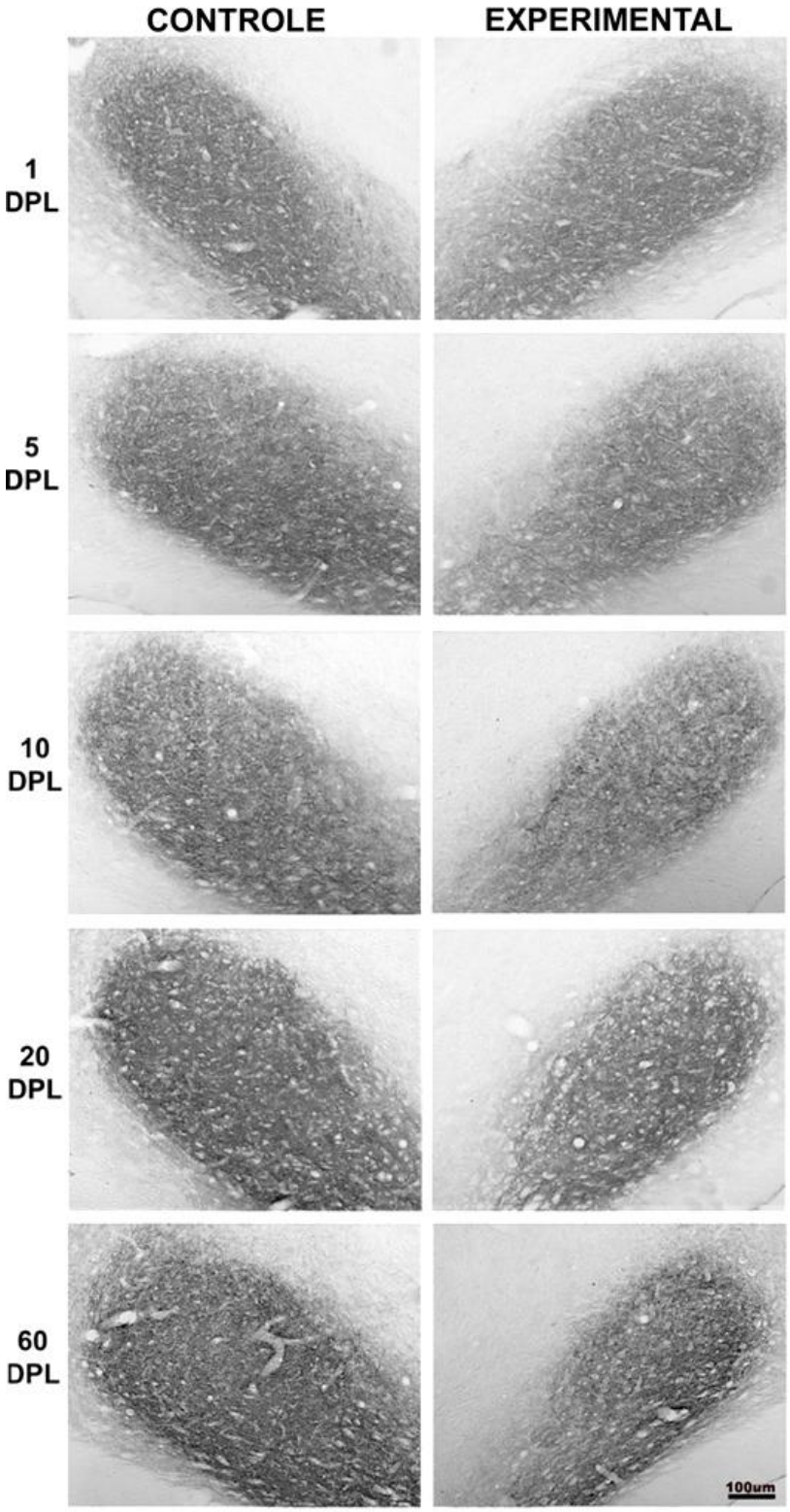
DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, # diferença estatística.

Figura 26 - Expressão de CB_1 na SNpr de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica.



(DPL) dias pós-lesão (DO) densidade óptica. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferenças estatísticas * Entre lado controle e lado experimental de cada DPL, (a) diferente de 1DPL experimental Valores de *p* mostrados nas tabelas 12 e 13.

Figura 27- Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de CB_1 na SNpr de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão.



(DPL) dias pós-lesão. Notar uma diminuição crescente da expressão dos receptores CB_1 no lado experimental ao longo dos períodos pós-lesão.

4.2.3 Decurso temporal da expressão de GABA nos núcleos da base

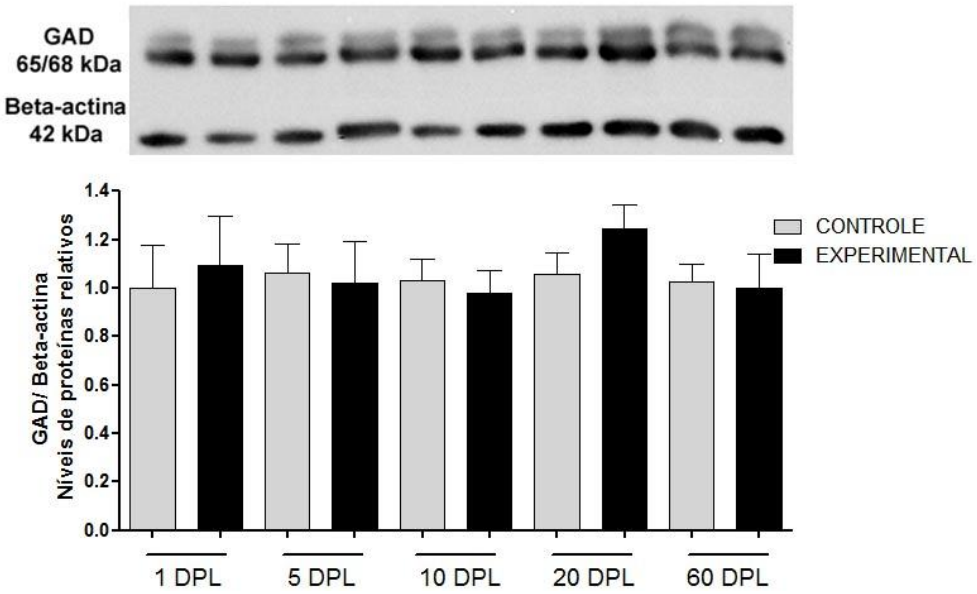
A literatura mostra que os receptores CB_1 da SN estão localizados em terminais axônicos dos interneurônios GABAérgicos que se projetam do estriado para a SN (KÖFALVI et al., 2005; MÁTYÁS et al., 2006). Assim sendo, o sistema GABAérgico passou a ser objeto de estudo para as próximas investigações. O primeiro anticorpo utilizado foi o anti-GABA. No estriado, GPe e GPi são marcados de maneira mais intensa corpos celulares, já na SN, são marcados corpos celulares na SN como um todo e fibras na SNpr. Embora tenha sido possível se fazer uma análise qualitativa, a imunomarcação obtida para este anticorpo foi muito sutil e heterogênea, se tornando de difícil quantificação. Na verdade, este anticorpo seria utilizado para a contagem do número de células GABA-positivas no estriado (que se projetam para as estruturas onde foram observadas alterações na expressão dos receptores CB_1 nos terminais) como forma de avaliar uma possível alteração no número de células, capaz de explicar os resultados observados para os receptores CB_1 (WALSH et al., 2010).

Por este motivo buscamos outras alternativas para estudar os neurônios GABAérgicos que foram a enzima GAD e as proteínas ligantes de cálcio calbindina e parvalbumina.

4.2.4 Decurso temporal da expressão de GAD nos núcleos da base

Análises quantitativas de *immunoblotting* mostram que não há variação nos níveis da enzima GAD tanto do estriado como da SN em todos os períodos pós-lesão estudados. No estriado a ANOVA de duas vias mostra que não há diferenças entre os dias pós-lesão [$F (4,68) = 0,3940$, $p = 0,812265$], os lados controle e experimental [$F (4,68)$ 0,1540, $p = 0,695989$], e dias pós-lesão e lados controle e experimental [$F (4,68) = 0,3195$, $p = 0,863969$]. (Figura 28).

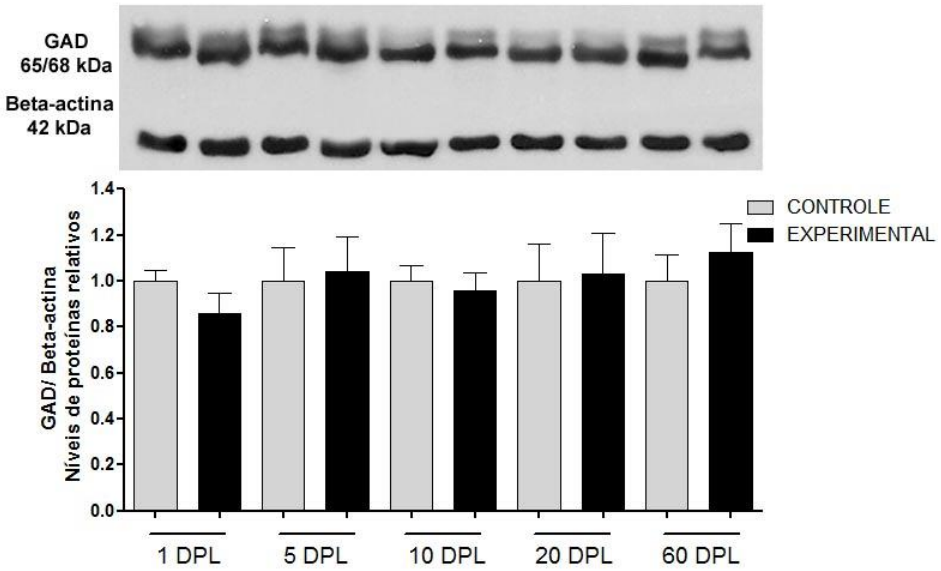
Figura 28- Níveis proteicos de GAD no estriado de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por *immunoblotting.*



(DPL) dias pós-lesão. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey (n = 7-8). *p* > 0,05 para comparação entre os lados controle e experimental de cada DPL e entre os lados experimentais de todos os dias pós-lesão (DPL).

Na SN a ANOVA de duas vias mostra que não há diferenças entre os dias pós-lesão [F (4,68) = 0,3218, p = 0,862467], os lados controle e experimental [F (4,68) 0,0014, p = 0,970141], e dias pós-lesão e lados controle e experimental [F (4,68) = 0,3222, p = 0,862147]. (Figura 29).

Figura 29 - Níveis proteicos de GAD na SN de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por *immunoblotting.*



(DPL) dias pós-lesão. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey (n = 7-8). $p > 0,05$ para comparação entre os lados controle e experimental de cada DPL e entre os lados experimentais de todos os dias pós-lesão (DPL).

4.2.5 Decurso temporal da expressão de Calbindina nos núcleos da base

Conforme já descrito nos resultados de imunofluorescência, observamos uma expressão maior de Calbindina, apenas na SN e no estriado. No estriado a imunomarcação de calbindina foi observada de forma mais intensa em corpo celular, e mais moderada em neurópila. Na SN a marcação foi observada em células na SNpc e em neurópila na SNpr. Houve aumento no número de células Calbindida-positivas no estriado experimental em 1 e 5 DPL, já nos outros períodos pós-lesão não observamos alterações. Para a contagem de células no estriado a análise estatística por ANOVA de duas vias mostra alterações entre os dias pós-lesão [F (4,40) = 6,08, p = 0,000638], os lados controle e experimental [F (4,40) = 16,63, p = 0,000210], e dias pós-lesão e lados controle e experimental [F (4,40) = 6,08, p = 0,000638]. Os valores de porcentagem são mostrados nas tabelas 14 e 15. (Figuras 30 e 31).

Além do número de células, foi observado também um aumento da intensidade de marcação de calbindina nessas células (Figura 31)

Tabela 14 - Contagem de células Calbindina-positivas no estriado de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5).

DPL	Lado controle Média de % ± EP	Lado Experimental Média de% ± EP	*p*
1 DPL	100,0 ± 2,7	120,7 ± 4,9*	0,002204
5 DPL	100,0 ± 2,2	120,9 ± 1,4*	0,001963
10 DPL	100,0 ± 2,5	101,0 ± 2,9	1,000000
20 DPL	100,0 ± 3,1	100,4 ± 6,3	1,000000
60 DPL	100,0 ± 1,4	99,0 ± 1,4	1,000000

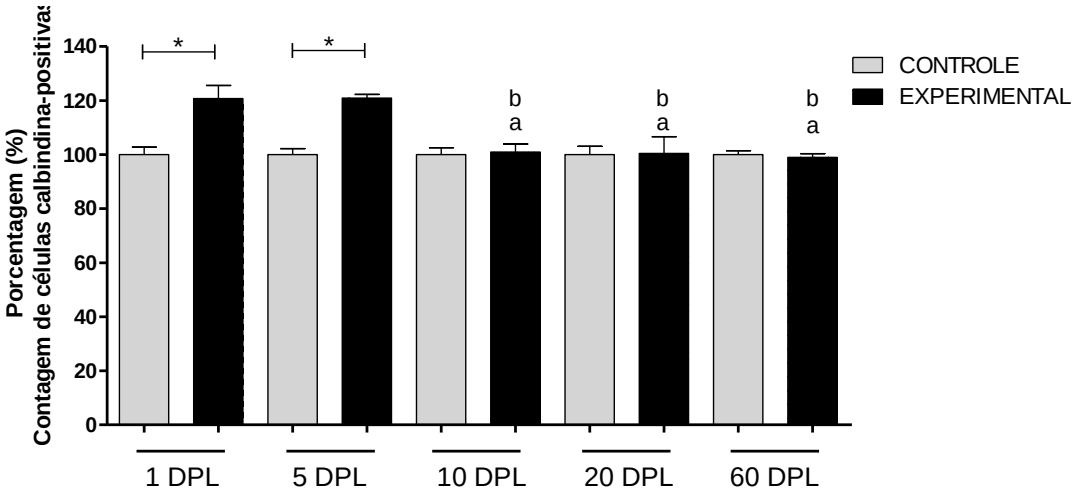
DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, * diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada DPL.

Tabela 15 - Comparações entre as contagens de células calbindina-positivas no estriado experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica de imunohistoquímica (n = 5).

Comparações entre DPLs	Porcentagem	*p*
1 DPL x 5 DPL	0 %	1,000000
1 DPL x 10 DPL	20 % #	0,003983
1 DPL x 20 DPL	20 % #	0,002796
1 DPL x 60 DPL	22 % #	0,001200
5 DPL x 10 DPL	20 % #	0,003547
5 DPL x 20 DPL	21 % #	0,002495
5 DPL x 60 DPL	22 % #	0,001076
10 DPL x 20 DPL	1 %	1,000000
10 DPL x 60 DPL	2 %	0,999990
20 DPL x 60 DPL	1 %	1,000000

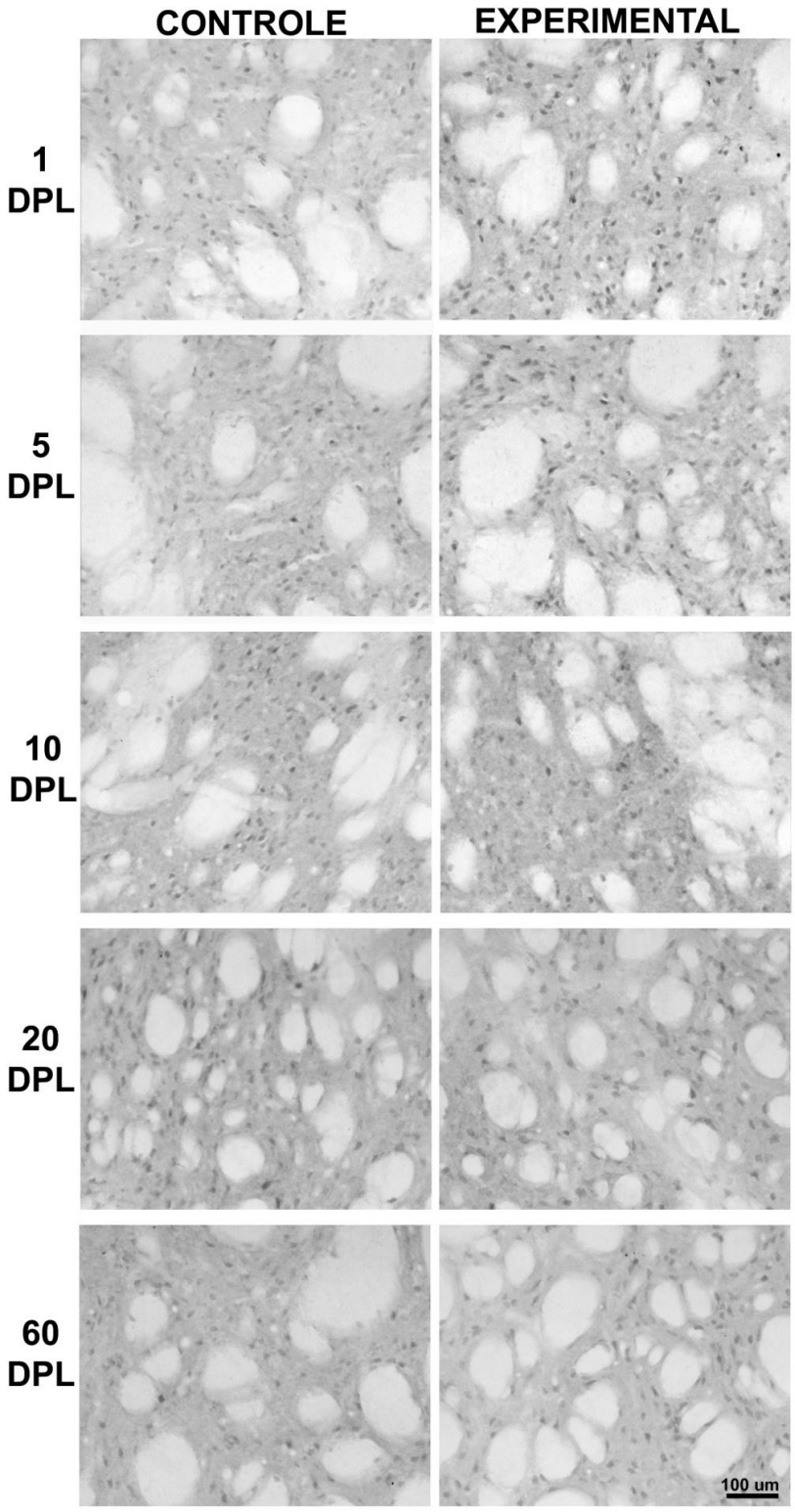
DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, # diferença estatística.

Figura 30 - Contagem de células Calbindina-positivas no estriado de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica e expressa em porcentagem.



(DPL) dias pós-lesão. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferenças estatísticas * Entre lado controle e lado experimental de cada DPL, (a) diferente de 1DPL experimental e (b) diferente de 5 DPL experimental. Valores de *p* mostrados nas tabelas 14 e 15.

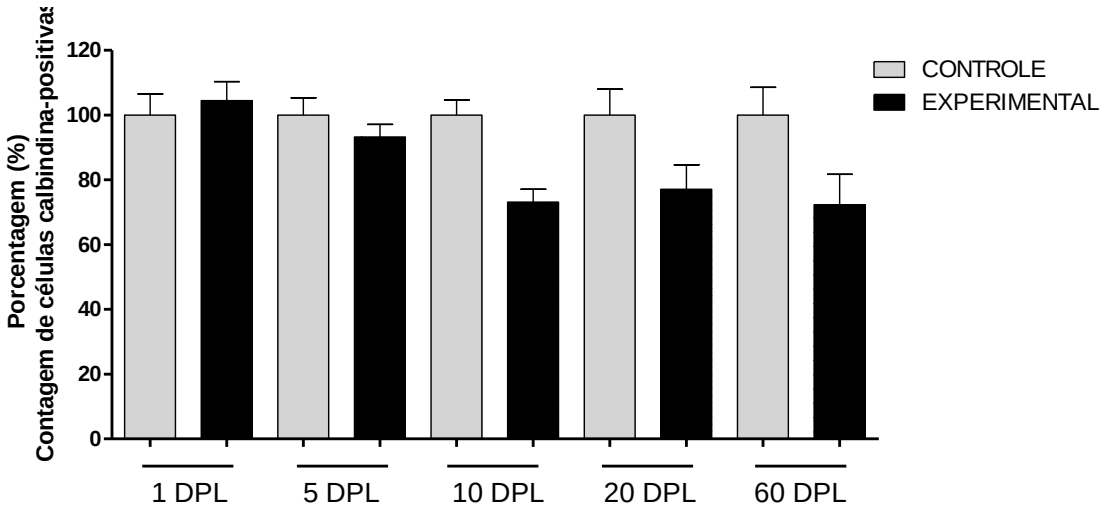
Figura 31- Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão Calbindina no estriado de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão.



(DPL) dias pós-lesão. Notar um aumento de células calbindina-positivas de da expressão de calbindina no estriado experimental de 1 e 5 DPL.

Na SN houve uma diminuição da marcação geral de calbindina, ou seja, tanto de corpos celulares calbindina-positivos na SNpc, como de neurópila na SNpr, a partir de 10 DPL. Entretanto os resultados mais consistentes foram para a SNpr, pois na SNpc apesar de ocorrer diminuição os resultados foram bastante variados não apresentando diferenças estatísticas. Para a contagem de células na SNpc a análise estatística por ANOVA de duas vias mostra que não há diferenças entre os dias pós-lesão [F (4,38) = 1,997, p = 0,114528], os lados controle e experimental [F (4,38) = 1,359, p = 0,250998], e dias pós-lesão e lados controle e experimental [F (4,38) = 0,378, p = 0,822676]. (Figura 32)

Figura 32 - Contagem de células Calbindina-positivas na SNpc de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica e expressa em porcentagem.



(DPL) dias pós-lesão. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. $p > 0,05$ para comparação entre os lados controle e experimental de cada DPL e entre os lados experimentais de todos os DPL.

Para a densidade óptica da imunomarcação de calbindina na neurópila da SNpr a análise estatística por ANOVA de duas vias mostra alterações entre os dias pós-lesão [F (4,40) = 9,561, p = 0,000016], os lados controle e experimental [F (4,40) = 39,057, p < 0,000001], e dias pós-lesão e lados controle e experimental [F (4,40) = 9,561, p = 0,000016]. Os valores de porcentagem são mostrados nas tabelas 16 e 17. (Figuras 33 e 34).

Tabela 16- Expressão de Calbindina na SNpr de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5)

DPL	Lado controle Média de % ± EP	Lado Experimental Média de% ± EP	*p*
1 DPL	100,0 ± 4,5	106,7 ± 4,9	0,944204
5 DPL	100,0 ± 2,9	95,5 ± 1,0	0,996513
10 DPL	100,0 ± 2,8	83,7 ± 5,1*	0,075029
20 DPL	100,0 ± 3,1	75,8 ± 3,9*	0,001147
60 DPL	100,0 ± 3,4	66,7 ± 2,5*	0,000160

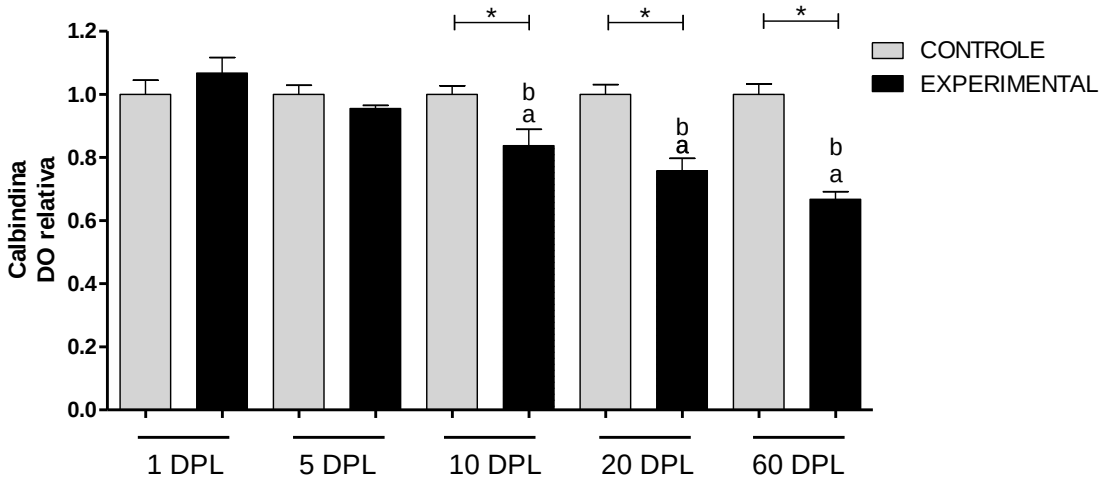
DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, * diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada DPL.

Tabela 17- Comparações entre a expressão de Calbindina na SNpr experimental de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão. Quantificação pela técnica de imunohistoquímica (n = 5).

Comparações entre DPLs	Porcentagem	*p*
1 DPL x 5 DPL	11 %	0,480706
1 DPL x 10 DPL	23 % #	0,002242
1 DPL x 20 DPL	31 % #	0,000169
1 DPL x 60 DPL	40 % #	0,000158
5 DPL x 10 DPL	12 %	0,408006
5 DPL x 20 DPL	20 % #	0,013216
5 DPL x 60 DPL	29 % #	0,000208
10 DPL x 20 DPL	8 %	0,861049
10 DPL x 60 DPL	17 %	0,052981
20 DPL x 60 DPL	9 %	0,749321

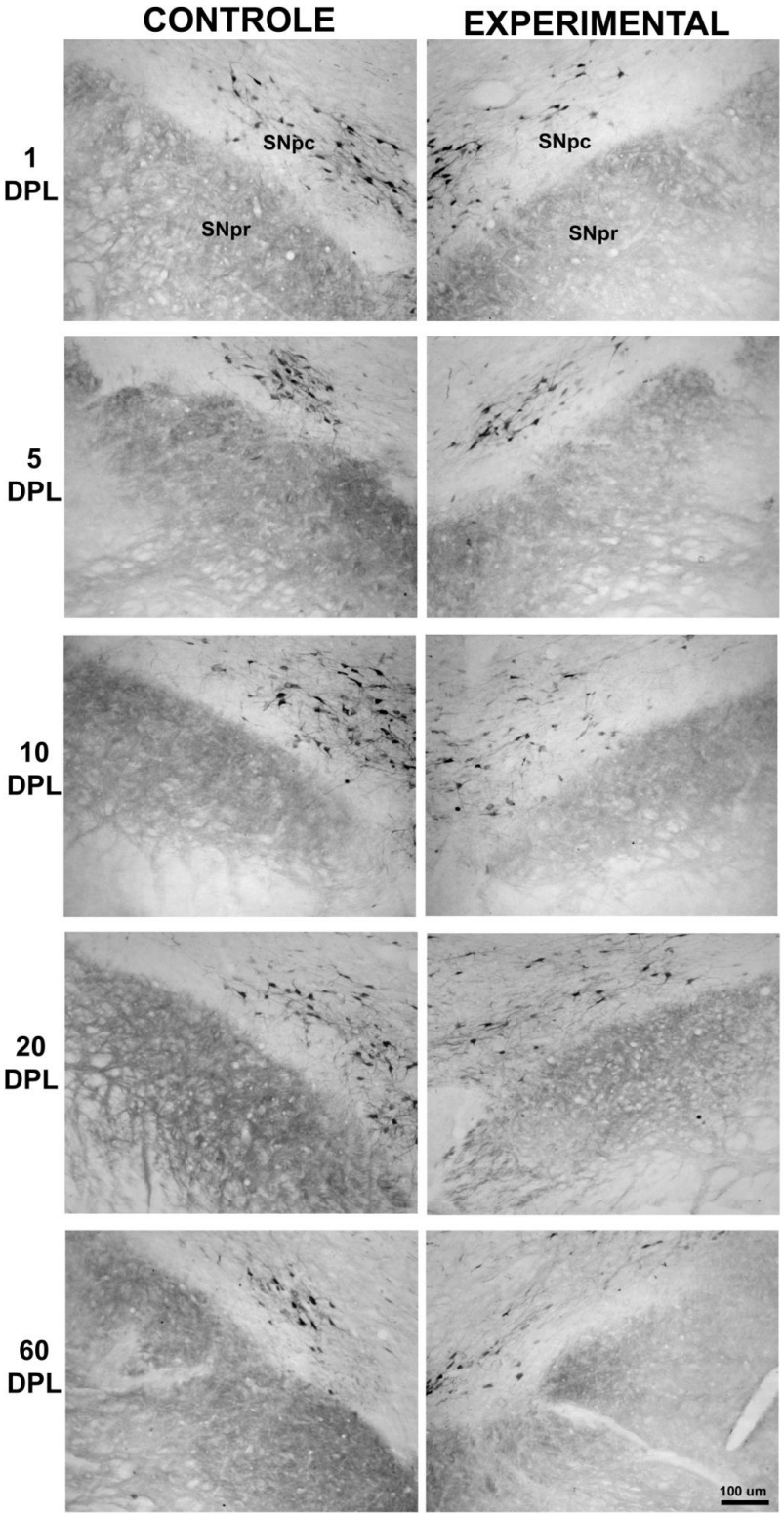
DPL (dias pós-lesão). Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, # diferença estatística.

Figura 33 - Expressão de Calbindina na SPpr de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica.



(DPL) dias pós-lesão (DO) densidade óptica. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferenças estatísticas * Entre lado controle e lado experimental de cada DPL, (a) diferente de 1DPL experimental e (b) diferente de 5 DPL experimental. Valores de *p* mostrados nas tabelas 16 e 17.

Figura 34 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de Calbindina na SNpc e SNpr de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA com 1, 5, 10, 20 e 60 dias pós-lesão.

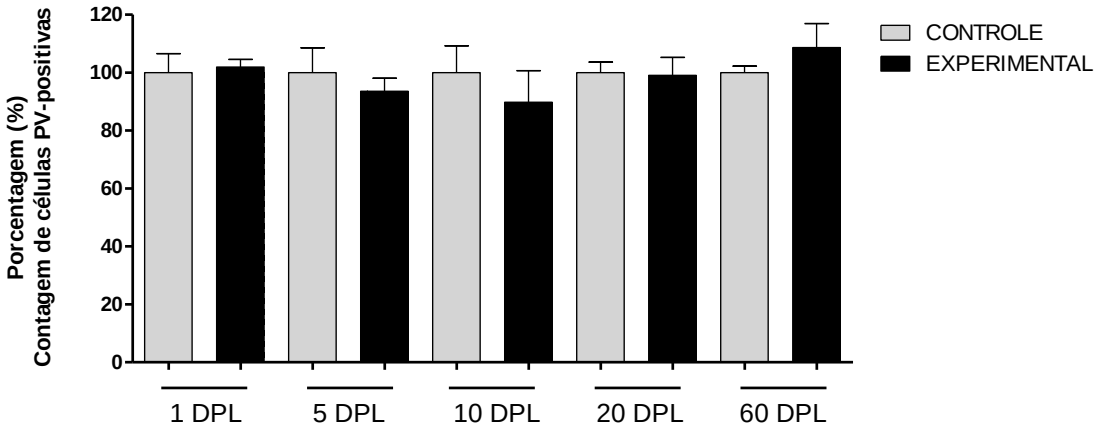


(DPL) dias pós-lesão. Notar uma diminuição crescente da expressão de calbindina nas duas porções da SN no lado experimental ao longo dos períodos pós-lesão.

4.2.6 Decurso temporal da expressão de Parvalbumina nos núcleos da base

Análises quantitativas da contagem de células Parvalbumina-positivas pela técnica de imunohistoquímica mostram que, de maneira geral, não há variação dessas células em nenhuma das estruturas dos núcleos da base estudada. No estriado a ANOVA de duas vias mostra que não há diferenças entre os dias pós-lesão [F (4,40) = 0,565, p = 0,689182], os lados controle e experimental [F (4,40) 0,104, p = 0,748181], e dias pós-lesão e lados controle e experimental [F (4,40) = 0,565, p = 0,689182]. (Figura 35).

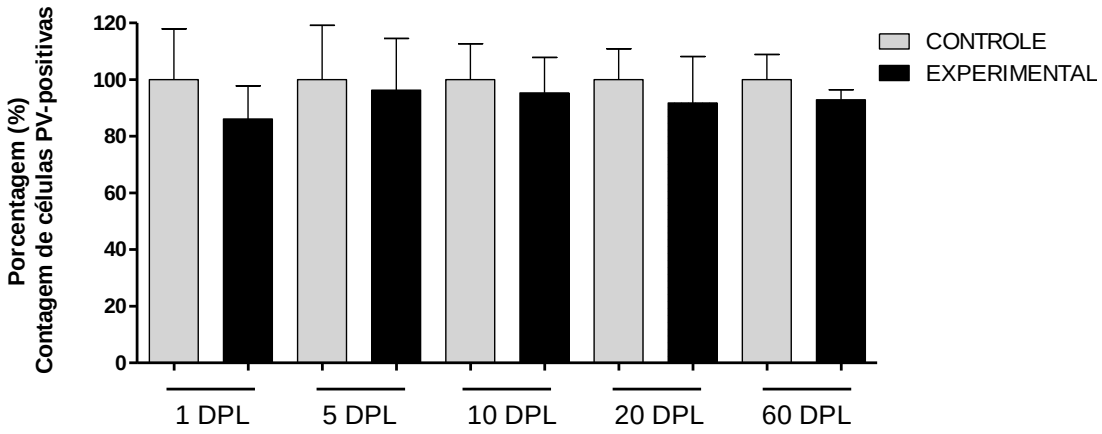
Figura 35 - Contagem de células Parvalbumina (PV)-positivas no estriado de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica e expressa em porcentagem.



(DPL) dias pós-lesão. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. *p* > 0,05 para comparação entre os lados controle e experimental de cada DPL e entre os lados experimentais de todas as DPLs.

No GPe a ANOVA de duas vias mostra que não há diferenças entre os dias pós-lesão [F (4,40) 0,0408, p = 0,996705], os lados controle e experimental [F (4,40) 0,7250, p = 0,399564], e dias pós-lesão e lados controle e experimental [F (4,40) = 0,0408, p = 0,996705]. (Figura 36).

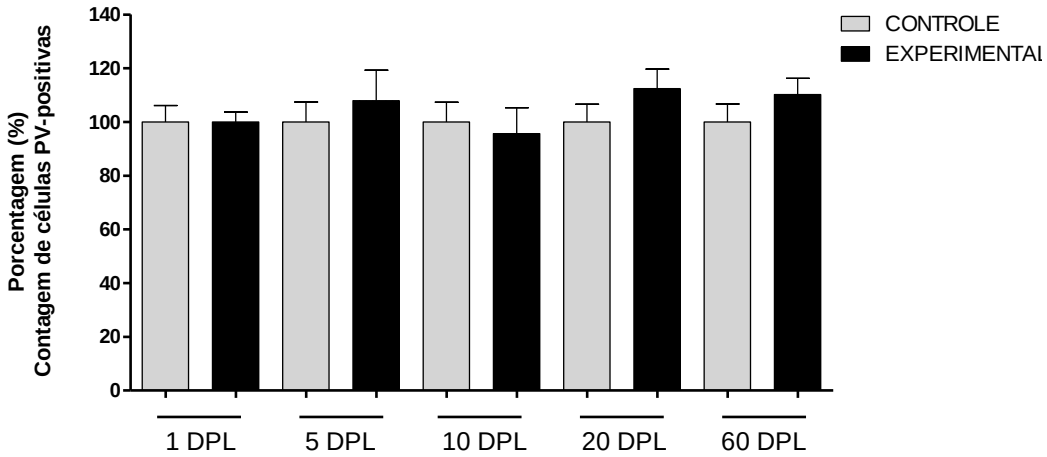
Figura 36 - Contagem de células Parvalbumina (PV)-positivas no GPe de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica e expressa em porcentagem.



(DPL) dias pós-lesão. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. $p > 0,05$ para comparação entre os lados controle e experimental de cada DPL e entre os lados experimentais de todas as DPLs.

No GPi a ANOVA de duas vias mostra que não há diferenças entre os dias pós-lesão [F (4,40) 0,451, p = 0,771079], os lados controle e experimental [F (4,40) 1,232, p = 0,273683], e dias pós-lesão e lados controle e experimental [F (4,40) = 0,451, p = 0,771079]. (Figura 37).

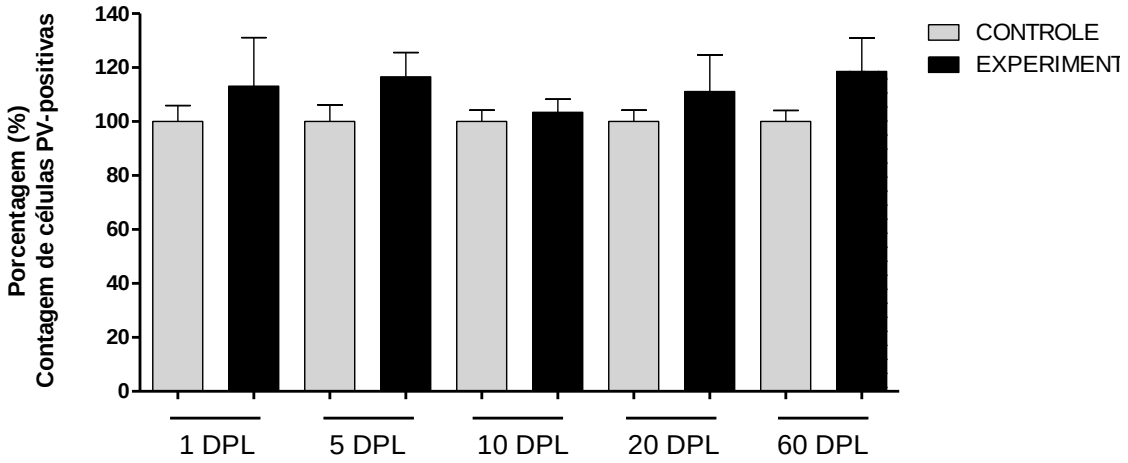
Figura 37 - Contagem de células Parvalbumina (PV)-positivas no GPi de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica e expressa em porcentagem.



(DPL) dias pós-lesão. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. $p > 0,05$ para comparação entre os lados controle e experimental de cada DPL e entre os lados experimentais de todas as DPLs.

Na SNpr a ANOVA de duas vias (n = 5) mostra que não há diferenças entre os dias pós-lesão [F (4,40) 0,215, p = 0,928298] e dias pós-lesão e lados controle e experimental [F (4,40) = 0,215, p = 0,928298]. Entretanto há diferenças entre os lados controle e experimental [F (4,40) 4,202, p = 0,046961]. (Figura 38)

Figura 38 - Contagem de células Parvalbumina (PV)-positivas na SNpr de ratos após 1, 5, 10, 20 e 60 dias da injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA quantificada por imunohistoquímica e expressa em porcentagem.



(DPL) dias pós-lesão. Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. $p > 0,05$ para comparação entre os lados controle e experimental de cada DPL e entre os lados experimentais de todas as DPLs.

4.3 Bloco III - Tratamentos com agonista e antagonista canabinóide no modelo experimental da Doença de Parkinson *in vivo*

Os resultados do bloco III são apresentados de acordo com as comparações feitas para a análise estatística, ou seja, grupo ACEA e grupo AM 251. Em relação aos estudos neuroquímicos, para cada proteína e técnica de quantificação são mostrados no texto os valores de F e *p* das comparações entre os tratamentos, os lados controle e experimental, e tratamentos e lados controle e experimental. Quando a análise estatística mostrou diferenças entre os lados controle e experimental de cada período pós-lesão estudado, os valores das médias da porcentagem ± erro padrão, os valores de *p*, e as diferenças estatísticas são mostrados em tabelas especificadas no texto. Além disso, 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),

as diferenças estatísticas entre os lados controle e experimental para cada tratamento e as diferenças estatísticas entre os lados experimentais. Quando apropriado são mostradas figuras dos cortes histológicos apontando as diferenças encontradas.

4.3.1 Tratamento com ACEA

4.3.1.1 Estudos neuroquímicos

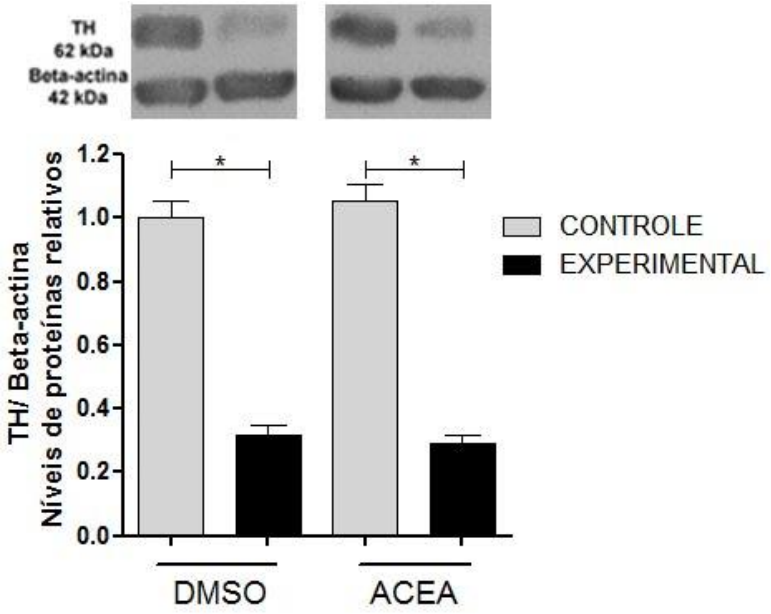
Os resultados do *immunoblotting* para TH no estriado dos animais tratados com ACEA são mostrados na figura 39 e na tabela 18. A análise estatística por ANOVA de duas vias mostra que não há diferenças entre os tratamentos [F (1,16) = 0,1369, p = 0,716262], que há diferenças entre os lados controle e experimental [F (1,16) = 274,0447, p < 0,00001], e não há diferenças entre os tratamentos e lados controle e experimental [F (1,16) = 0,8004, p = 0,384224].

Tabela 18 - Níveis proteicos de TH no estriado de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação pela técnica *immunoblotting* (n = 5).

Tratamento	**Lado controle Média de % ± EP**	**Lado Experimental Média de% ± EP**	***p***
DMSO	100,0 ± 5,6	31,3 ± 1,4*	0,000185
ACEA	105 ± 4.2	30,1 ± 2,6*	0,000185

Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, * diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada tratamento

Figura 39 - Níveis proteicos de TH no estriado de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação por *immunoblotting*.



Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferença estatística * Entre lado controle e lado experimental de cada tratamento. Valores de *p* mostrados na tabela18.

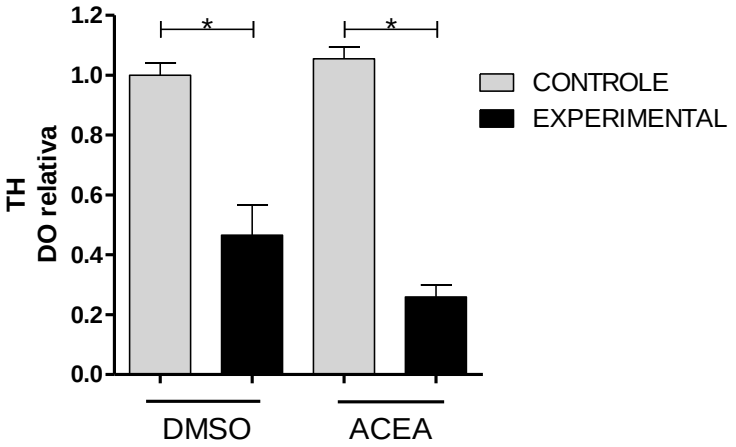
Os resultados da imunohistoquímica para TH, GFAP e OX-42 na SN são mostrados nas figuras 40-43 e os valores de porcentagem nas tabelas 19-21. Para a TH análise estatística por ANOVA de duas vias mostra que não há diferenças entre os tratamentos [F (1,16) = 1,5330, p = 0,233524], que há diferenças entre os lados controle e experimental [F (1,16) = 118,1808, p < 0,00001], e que há diferenças entre os tratamentos e lados controle e experimental [F (1,16) = 4,5817, p = 0,048063] (Tabela 19 e figuras 40 e 41)

Tabela 19 - Expressão de CB_1 TH na SN de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5).

Tratamento	Lado controle Média de % ± EP	Lado Experimental Média de% ± EP	*p*
DMSO	100,0 ± 4,6	46,6 ± 11,3*	0,000246
ACEA	105 ± 3,9	26,0 ± 4,0*	0,000185

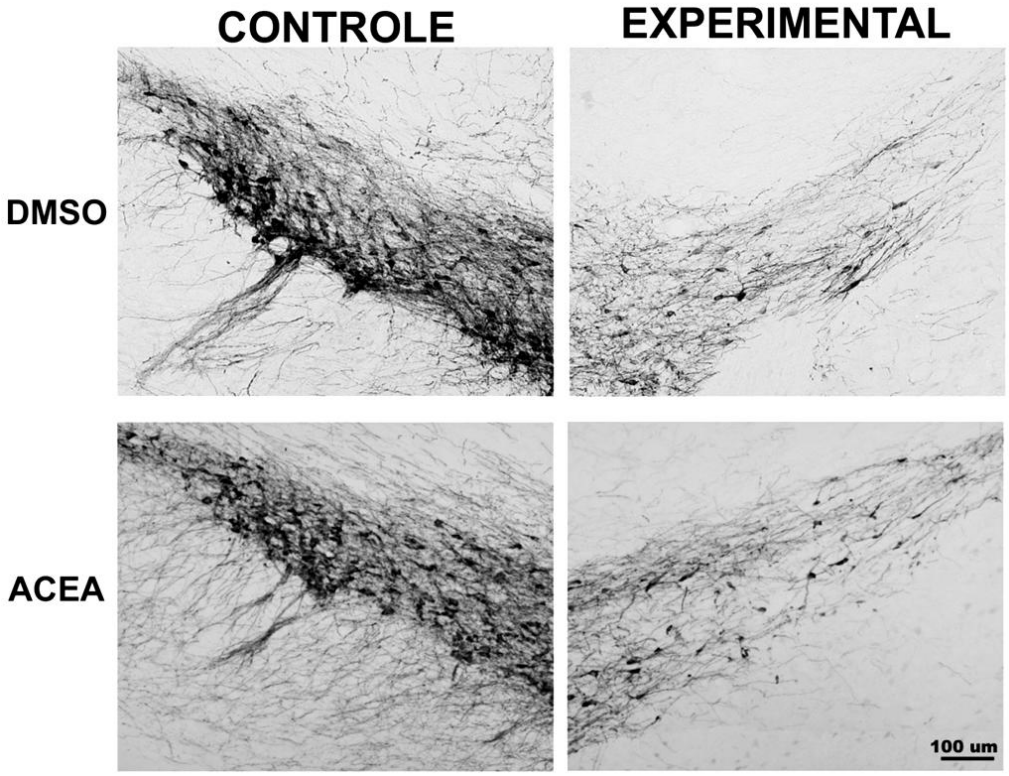
Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, * diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada tratamento.

Figura 40 - Expressão de TH no na SN de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação por imunohistoquímica.



Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferença estatística * Entre lado controle e lado experimental de cada tratamento. Valores de *p* mostrados na tabela19.

Figura 41 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de TH na SNpc de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA.



Notar uma diminuição da expressão de TH nos lados experimentais.

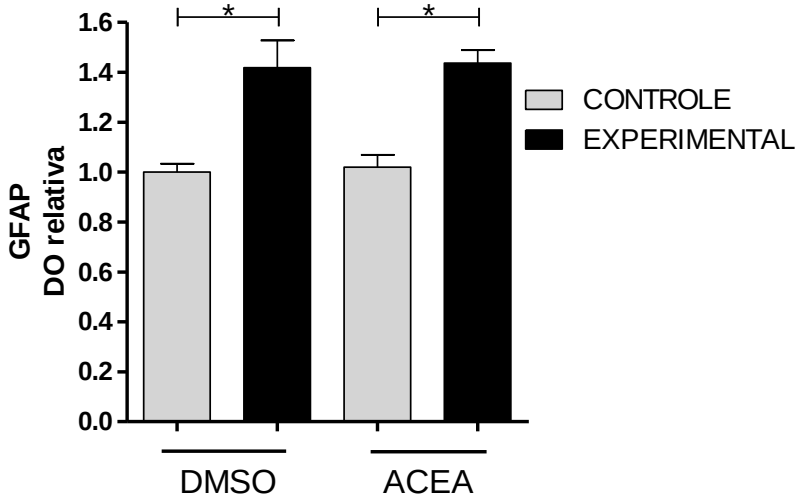
Para a o GFAP a análise estatística por ANOVA de duas vias mostra que não há diferenças entre os tratamentos [F (1,16) = 0,085, p = 0,773900], que há diferenças entre os lados controle e experimental [F (1,16) = 38,211, p = 0,000013], e que não há diferenças entre os tratamentos e lados controle e experimental [F (1,16) = 0,000, p 0,991244] (Tabela 20 e figura 42)

Tabela 20 - Expressão de GFAP na SN de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5).

Tratamento	Lado controle Média de % ± EP	Lado Experimental Média de% ± EP	*p*
DMSO	100,0 ± 3,4	141,9 ± 11,*	0,002493
ACEA	102,1 ± 4,9	143,8 ± 5,2*	0,002569

Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, * diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada tratamento.

Figura 42- Expressão de GFAP no na SN de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação por imunohistoquímica.



Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferença estatística * Entre lado controle e lado experimental de cada tratamento. Valores de *p* mostrados na tabela 20.

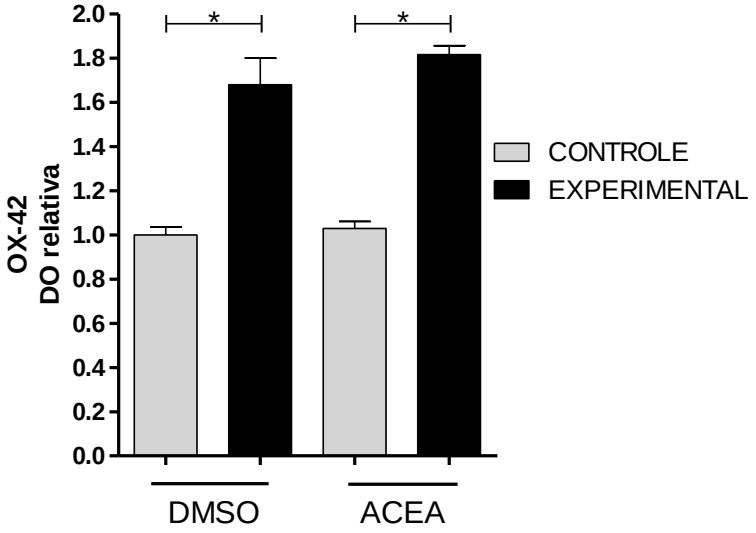
Para a o OX-42 a análise estatística por ANOVA de duas vias mostra que não há diferenças entre os tratamentos [F (1,16) 1,480, p = 0,241409], que há diferenças entre os lados controle e experimental [F (1,16) = 115,686, p < 0,000001], e que não há diferenças entre os tratamentos e lados controle e experimental [F (1,16) = 0,617, p 0,443668] (Tabela 21 e figura 43)

Tabela 21 - Expressão de OX-42 na SN de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5).

Tratamento	**Lado controle**	**Lado Experimental**	***p***
	Média de % ± EP	**Média de% ± EP**	
DMSO	100,0 ± 3,5	168,0 ± 12,1*	0,000194
ACEA	102,9 ± 3,2	181,6 ± 4,0*	0,000186

Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, * diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada tratamento.

Figura 43 - Expressão de OX-42 no na SN de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e ACEA. Quantificação por imunohistoquímica.



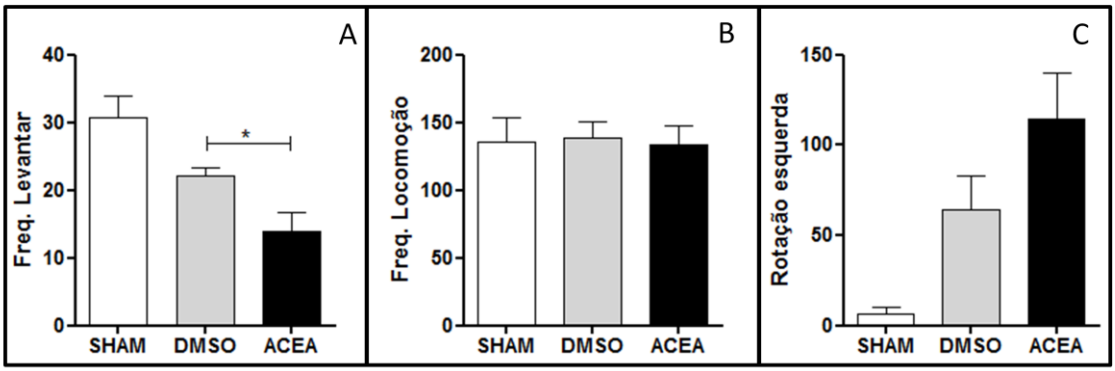
Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferença estatística * Entre lado controle e lado experimental de cada tratamento. Valores de *p* mostrados na tabela 21.

Resumidamente a análise estatística por ANOVA de duas vias mostra para todas as quantificações realizadas diferenças apenas entre os lados controle e experimental, e não diferenças entre os tratamentos.

4.3.1.2 Estudos comportamentais

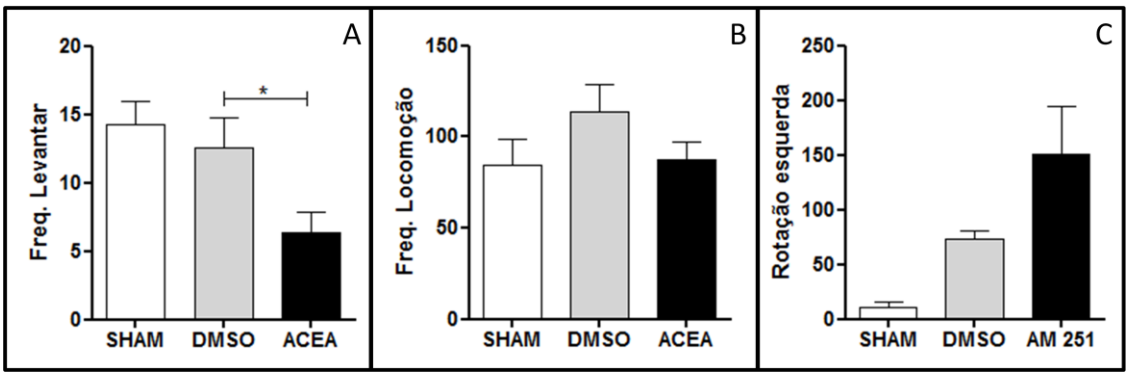
Os resultados dos testes comportamentais para o grupo ACEA são mostrados na figura 44 para os testes realizados 8 dias após a cirurgia e na figura 45 para os testes realizados 15 dias após a cirurgia. Resumidamente o tratamento com ACEA diminuiu a atividade geral dos animais, pois nos dois dias de teste, os animais tratados com ACEA levantaram menos em comparação com os animais tratados com DMSO ($p = 0,0208$ em 8 dias após a lesão e $p = 0,0299$ para 15 dias após a lesão). No parâmetro de frequência de locomoção não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($p > 0,05$). Em relação ao número de rotação, apesar de a análise estatística pelo teste t de Student não ter apresentado significância, os valores de p mostram uma tendência para aumentar o número de rotação dos animais tratados com ACEA quando comparados aos animais tratados com DMSO ($p = 0,08$ para os dois testes).

Figura 44 - Resultados do efeito do tratamento com DMSO e ACEA na atividade geral avaliada em Campo Aberto e na rotação induzida por apomorfina de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA 8 dias após a lesão.



(A) Frequência de Levantar, (B) Frequência de Locomoção, e (C) Rotações para esquerda (n =7-9). Análise estatística por teste t de Student não pareado, * $p < 0,05$, DMSO vs ACEA.

Figura 45 - Resultados do efeito do tratamento com DMSO e ACEA na atividade geral avaliada em Campo Aberto e na rotação induzida por apomorfina de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA 15 dias após a lesão.



(A) Frequência de Levantar, (B) Frequência de Locomoção, e (C) Rotações para esquerda (n = 7-9). Análise estatística por teste t de Student não pareado, * p < 0,05, DMSO vs ACEA.

Tomados em conjunto os resultados dos testes comportamentais mostram que o tratamento com ACEA parece ter sido prejudicial para os comportamentos motores.

4.3.2 Tratamento com AM 251

4.3.2.1 Estudos neuroquímicos

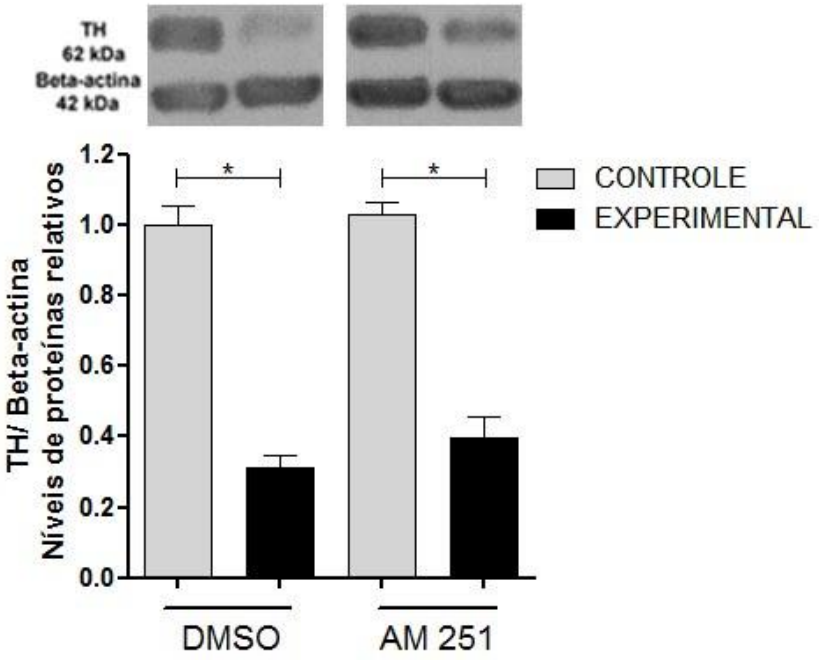
Os resultados do *immunoblotting* para TH no estriado dos animais tratados com AM 251 são mostrados na figura 46 e na tabela 22. A análise estatística por ANOVA de duas vias mostra que não há diferenças entre os tratamentos [F (1,16) = 1,5081, p = 0,237186], que há diferenças entre os lados controle e experimental [F (1,16) = 194,4196, p < 0,00001], e não há diferenças entre os tratamentos e lados controle e experimental [F (1,16) = 0,2787, p = 0,604785].

Tabela 22 - Níveis proteicos de TH no estriado de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação pela técnica *immunoblotting* (n = 5).

Tratamento	Lado controle Média de % ± EP	Lado Experimental Média de% ± EP	*p*
DMSO	100,0 ± 5,6	31,3 ± 1,4*	0,000185
AM 251	103,3 ± 3,3	40,3 ± 3,3*	0,000185

Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, * diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada tratamento

Figura 46 - Níveis proteicos de TH no estriado de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação por *immunoblotting*.



Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferença estatística * Entre lado controle e lado experimental de cada tratamento. Valores de *p* mostrados na tabela 22.

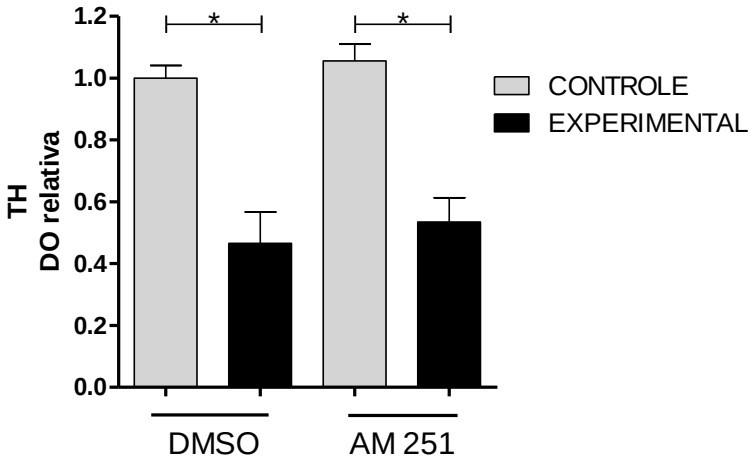
Os resultados da imunohistoquímica para TH, GFAP e OX-42 na SN são mostrados nas figuras 47-50 e os valores de porcentagem nas tabelas 23-25. Para a TH análise estatística por ANOVA de duas vias mostra que não há diferenças entre os tratamentos [F (1,16) = 2,714, p = 0,118942], que há diferenças entre os lados controle e experimental [F (1,16) = 309,056, p < 0,00001], e que não há diferenças entre os tratamentos e lados controle e experimental [F (1,16) = 0,582, p = 0,456457] (Tabela 23 e figuras 47 e 48)

Tabela 23 - Expressão de TH na SNpc de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5).

Tratamento	Lado controle Média de % ± EP	Lado Experimental Média de% ± EP	*p*
DMSO	100,0 ± 4,6	46,6 ± 11,3*	0,000185
AM 251	105,6 ± 5,3	53,5 ± 7,8*	0,000185

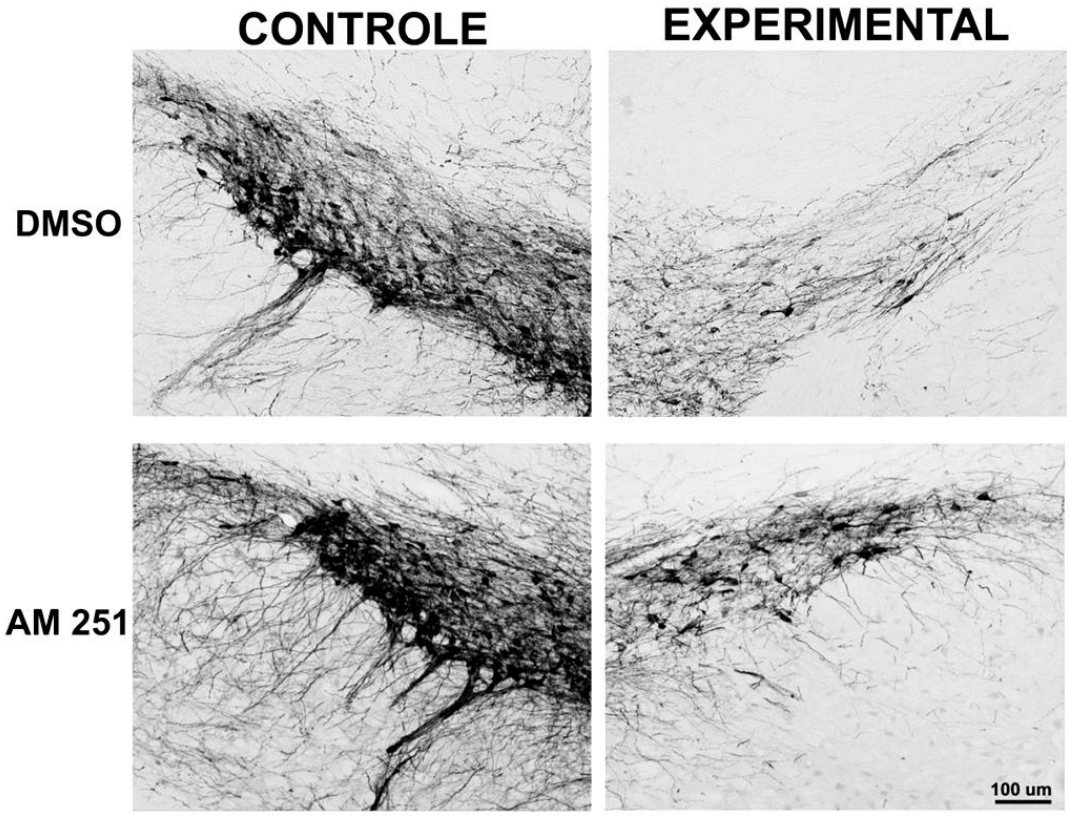
Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, * diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada tratamento.

Figura 47 - Expressão de TH no na SN de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação por imunohistoquímica.



Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferença estatística * Entre lado controle e lado experimental de cada tratamento. Valores de *p* mostrados na tabela 23.

Figura 48 - Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de TH na SNpc de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251.



Notar uma diminuição da expressão de TH nos lados experimentais.

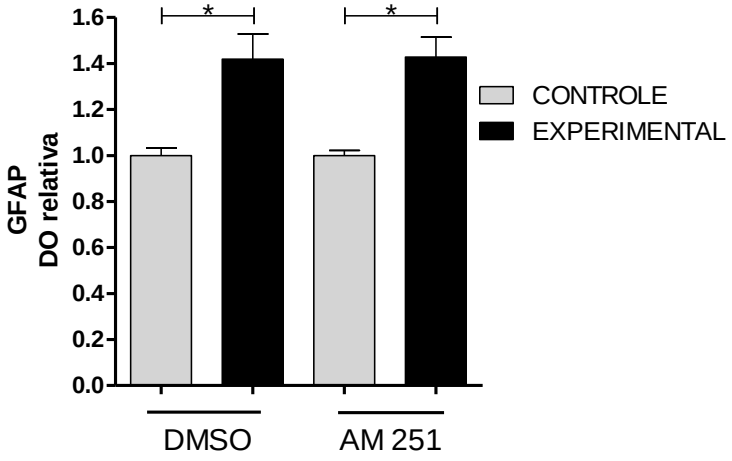
Para a o GFAP a análise estatística por ANOVA de duas vias mostra que não há diferenças entre os tratamentos [F (1,16) = 0,004, p = 0,949140], que há diferenças entre os lados controle e experimental [F (1,16) = 33,865, p = 0,000026], e que não há diferenças entre os tratamentos e lados controle e experimental [F (1,16) 0,005, p 0,943613] (Tabela 24 e figura 49)

Tabela 24 - Expressão de GFAP na SN de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5).

Tratamento	Lado controle Média de % ± EP	Lado Experimental Média de% ± EP	*p*
DMSO	100,0 ± 3,4	141,9 ± 11,*	0,00461
AM 251	99,9 ± 42,3	142,9 ± 8,6*	0,00377

Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, * diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada tratamento.

Figura 49- Expressão de GFAP no na SN de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação por imunohistoquímica.



Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferença estatística * Entre lado controle e lado experimental de cada tratamento. Valores de *p* mostrados na tabela 24.

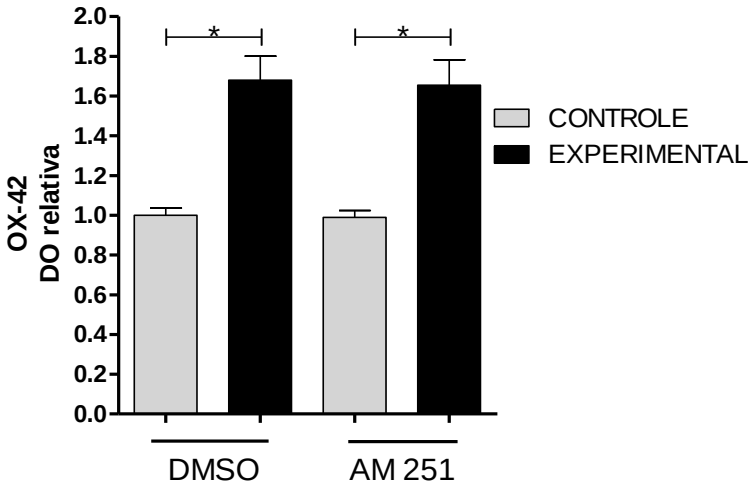
Para a o OX-42 a análise estatística por ANOVA de duas vias mostra que não há diferenças entre os tratamentos [F (1,16) 0,0385, p = 0,846942], que há diferenças entre os lados controle e experimental [F (1,16) = 54,4868, p = 0,000002], e que não há diferenças entre os tratamentos e lados controle e experimental [F (1,16) = 0,0059, p 0,939583] (Tabela 25 e figura 50)

Tabela 25 - Expressão de OX-42 na SN de ratos submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação pela técnica imunohistoquímica (n = 5).

Tratamento	Lado controle Média de % ± EP	Lado Experimental Média de% ± EP	*p*
DMSO	100,0 ± 3,5	168,0 ± 12,1*	0,000554
AM 251	98,9 ± 4,9	165,5 ± 12,7*	0,000644

Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey, * diferença estatística entre lado controle e lado experimental de cada tratamento.

Figura 50 - Expressão de OX-42 no na SN de ratos submetidos a unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO e AM 251. Quantificação por imunohistoquímica.



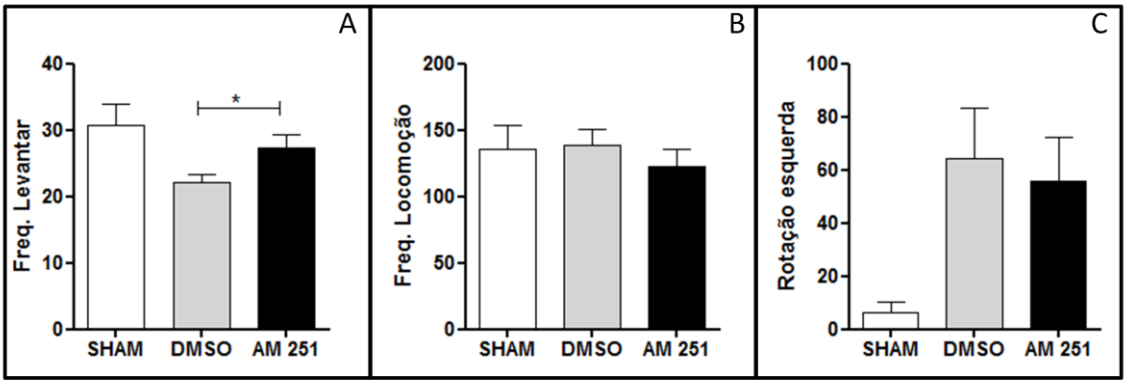
Análise estatística por ANOVA (duas vias) com pós-teste de Tukey. Diferença estatística * Entre lado controle e lado experimental de cada tratamento. Valores de *p* mostrados na tabela 25.

4.3.2.2 Estudos comportamentais

Os resultados dos testes comportamentais para o grupo AM 251 são mostrados na figura 51 para os testes realizados 8 dias após a cirurgia e na figura 52 para os testes realizados 15 dias após a cirurgia. Resumidamente o tratamento com AM 251 aumentou a atividade geral dos animais, pois no primeiro dia de teste (8 dias após a cirurgia), os animais levantaram mais em comparação com os animais tratados com DMSO ($p = 0,0349$), o que não ocorreu no segundo dia de teste ($p > 0,05$). No parâmetro de frequência

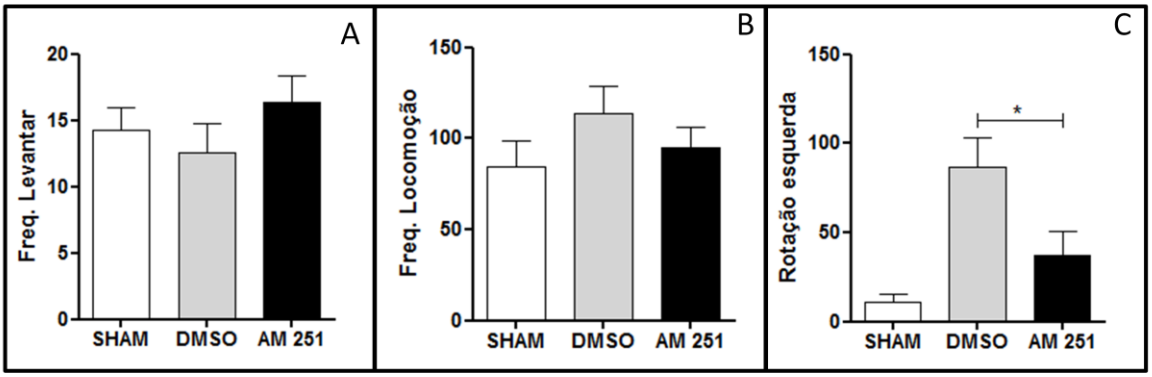
de locomoção não foram observadas diferenças entre os tratamentos (p > 0,05). Em relação ao número de rotação, os animais tratados com AM 251 apresentaram uma diminuição em relação ao grupo tratado com DMSO (p = 0,0383), o que não ocorreu no primeiro dia de testes (p > 0,05).

Figura 51-. Resultados do efeito do tratamento com DMSO e AM 251 na atividade geral avaliada em Campo Aberto e na rotação induzida por apomorfina de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA 8 dias após a lesão.



(A) Frequência de Levantar, (B) Frequência de Locomoção, e (C) Rotações para esquerda (n = 7-9). Análise estatística por teste t de Student não pareado, * p < 0,05, DMSO vs AM 251.

Figura 52 - Resultados do efeito do tratamento com DMSO e AM 251 na atividade geral avaliada em Campo Aberto e na rotação induzida por apomorfina de animais submetidos à indução de DP por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA 15 dias após a lesão.



(A) Frequência de Levantar, (B) Frequência de Locomoção, e (C) Rotações para esquerda (n = 7-9). Análise estatística por teste t de Student não pareado, * p < 0,05, DMSO vs AM 251.

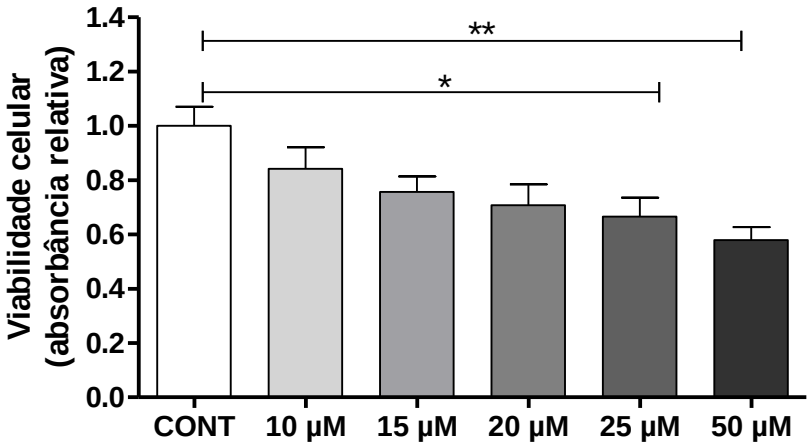
Tomados em conjunto os resultados dos testes comportamentais mostram que o tratamento com AM 251 parece ter sido benéfico para os comportamentos motores.

4.4 Bloco IV - Estudos *in vitro:* cultura de células expostas à 6-OHDA e tratadas com diferentes compostos canabinóides

4.4.1 Curva concentração resposta de 6-OHDA

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para a toxicidade de diferentes concentrações de 6-OHDA na linhagem de células Neuro-2a são mostrados na figura 53. A viabilidade celular diminuiu gradualmente à medida que as concentrações de 6-OHDA aumentaram. A concentração de 50 µM causou uma diminuição de aproximadamente 42% (±3%) na viabilidade celular em relação ao grupo controle ($p < 0,01$). Essa porcentagem é interessante para estudos de neuroproteção, pois apresenta uma toxicidade importante, porém não muito extensa, com possibilidade de melhora e, por este motivo, foi escolhida para o presente estudo.

Figura 53 - Curva concentração-resposta de 6-OHDA em linhagem de células Neuro-2a diferenciada com dbc-AMPc. Viabilidade celular analisada por MTT.

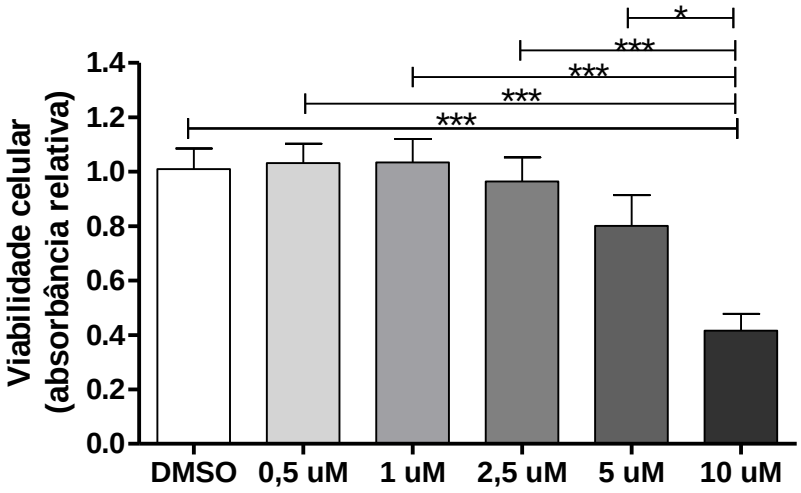


(CONT) controle (n = 4, em duplicatas) Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey, * $p > 0,05$ e ** $p<0,01$.

4.4.2 Curva concentração resposta de canabidiol

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para a toxicidade de diferentes concentrações de canabidiol na linhagem de células Neuro-2a são mostrados na figura 54. Apenas a concentração de 10 µM de canabidiol apresentou toxicidade, com diminuição de aproximadamente 58% (±4%) na viabilidade celular, em comparação com o grupo controle (DMSO) ($p < 0,001$). A concentração escolhida para os tratamentos foi de 2,5 µM.

Figura 54 - Curva concentração-resposta de canabidiol em linhagem de células Neuro-2a diferenciada com dbc-AMPc. Viabilidade celular analisada por MTT.

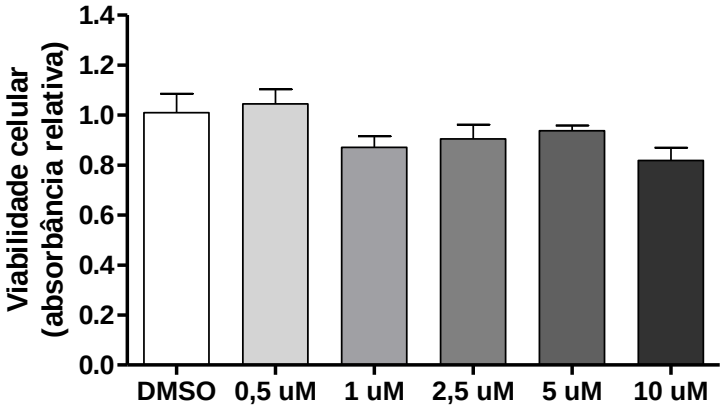


(DMSO) grupo controle (n = 4-5, em duplicatas) Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey, * $p > 0,05$ e *** $p<0,001$.

4.4.3 Curva concentração resposta de AM 404

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para a toxicidade de diferentes concentrações de AM 404 na linhagem de células Neuro-2a são mostrados na figura 55. Nenhuma das concentrações estudadas apresentou toxicidade, ou seja, não houve diminuição da viabilidade celular de nenhum grupo tratado com AM 404 quando comparados ao grupo tratado controle (DMSO) ($p > 0,05$). A concentração escolhida para os tratamentos foi de 10 µM.

Figura 55 - Curva concentração-resposta de AM 404 em linhagem de células Neuro-2a diferenciada com dbc-AMPc. Viabilidade celular analisada por MTT.

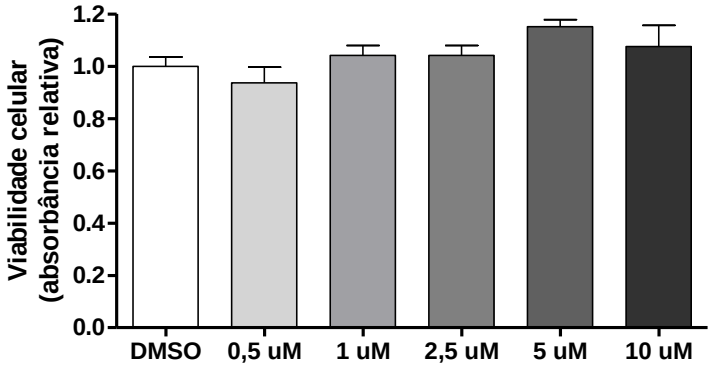


(DMSO) grupo controle (n = 4-5, em duplicatas) Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey

4.4.4 Curva concentração resposta de capsazepina

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para a toxicidade de diferentes concentrações de capsazepina na linhagem de células Neuro-2a são mostrados na figura 56. Nenhuma das concentrações estudadas apresentou toxicidade, ou seja, não houve diminuição da viabilidade celular de nenhum grupo tratado com capsazepina quando comparados ao grupo controle (DMSO) ($p > 0,05$). A concentração escolhida para os tratamentos foi de 5 µM.

Figura 56 - Curva concentração-resposta de capsazepina em linhagem de células Neuro-2a diferenciada com dbc-AMPc. Viabilidade celular analisada por MTT.

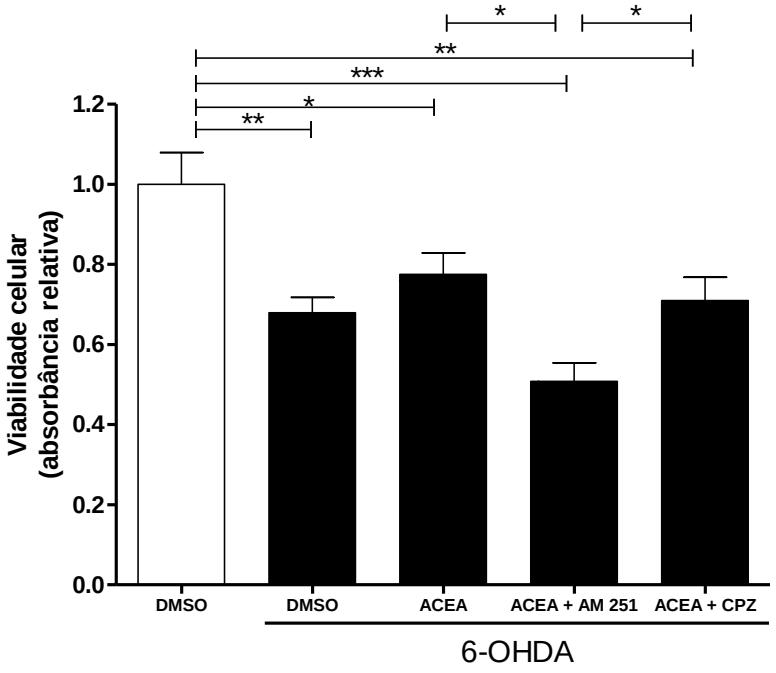


(DMSO) grupo controle (n = 4, em duplicatas) Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey.

4.4.5 Tratamento com ACEA em cultura exposta à 6-OHDA

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para o tratamento com ACEA da linhagem de células Neuro-2a exposta à 6-OHDA são mostrados na figura 57. Resumidamente, todos os grupos expostos à 6-OHDA apresentaram diminuição de viabilidade celular, quando comparados ao grupo controle (DMSO). O grupo 6-OHDA + DMSO apresentou diminuição de 32% (±4%) ($p < 0,01$); o grupo 6-OHDA + ACEA, de 22% (± 5%) ($p < 0,05$), o grupo 6-OHDA+ ACEA + AM 251, de 49% (±5%) ($p < 0,001$), e o grupo 6-OHDA+ ACEA + CPZ, de 29% (±6%) ($p < 0,01$). Portanto o ACEA não foi capaz de impedir a diminuição da viabilidade celular neste modelo.

Figura 57 - Tratamento da linhagem de células Neuro-2a diferenciada com dbc-AMPc e exposta à 6-OHDA, grupo ACEA. Viabilidade celular analisada por MTT.

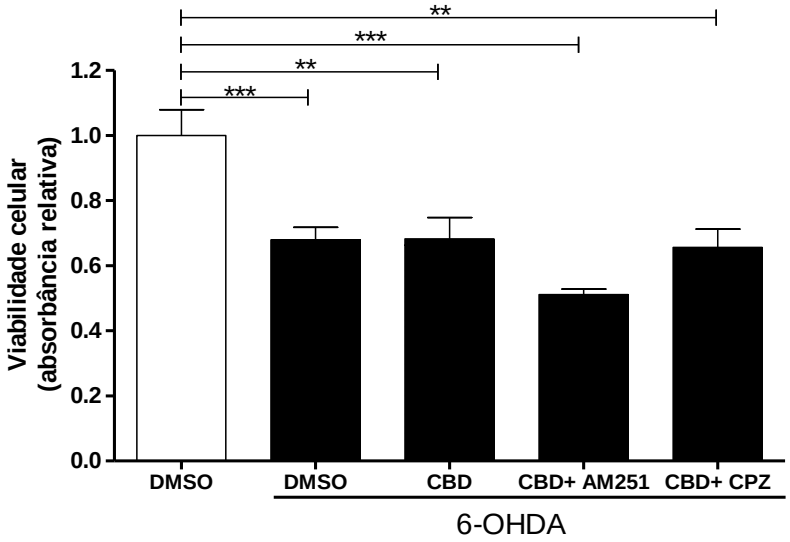


(DMSO) grupo controle, (CPZ) capsazepina, (n = 6, em duplicatas) Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$, ** $p<0,01$, e *** $p<0,001$.

4.4.6 Tratamento com canabidiol em cultura exposta à 6-OHDA

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para o tratamento com canabidiol da linhagem de células Neuro-2a exposta à 6-OHDA são mostrados na figura 58. Resumidamente, todos os grupos que foram expostos a 6-OHDA apresentaram diminuição da viabilidade celular quando comparados ao grupo controle (DMSO).). O grupo 6-OHDA + DMSO apresentou diminuição de 32% (±4%) ($p < 0,001$); o grupo 6-OHDA + CBD, de 32% (± 7%) ($p < 0,01$), o grupo 6-OHDA+ CBD + AM 251, de 49% (±2%) ($p < 0,001$), e o grupo 6-OHDA+ CBD + CPZ, de 34% (±6%) ($p < 0,01$). Porém não houve diferenças entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Figura 58 - Tratamento da linhagem de células Neuro-2a diferenciada com dbc-AMPc e expostas à 6-OHDA, grupo canabidiol (CBD). Viabilidade celular analisada por MTT.



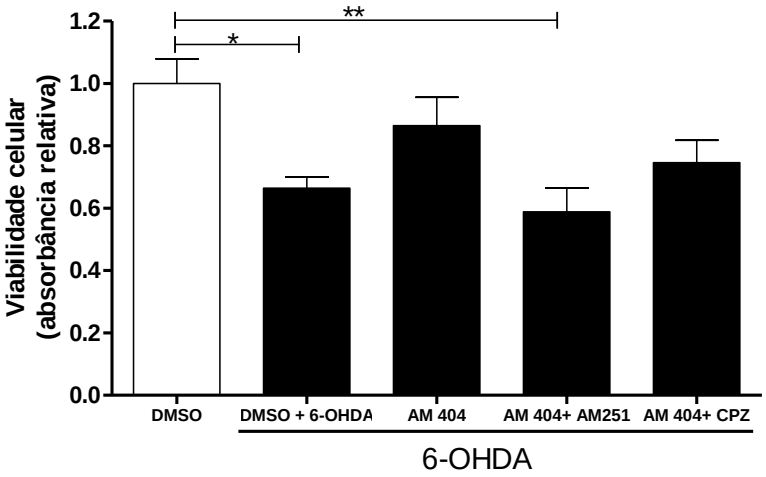
(DMSO) grupo controle, (CPZ) capsazepina, (n = 5-6, em duplicatas) Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey, ** $p<0,01$, e *** $p<0,001$.

4.4.7 Tratamento com AM 404 em cultura exposta à 6-OHDA

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para o tratamento com AM 404 da linhagem de células Neuro-2a exposta à 6-OHDA são mostrados na figura 59. Resumidamente, apenas os grupos 6-OHDA + DMSO e 6-OHDA + AM 404 + AM 251 apresentaram diminuição da viabilidade celular quando comparados ao grupo controle

(DMSO), aproximadamente 34% (± 4%) ($p < 0,05$) e aproximadamente 41% (± 8%) ($p < 0,01$), respectivamente. Os grupos expostos e tratados com AM 404 e AM 404 + CPZ não foram diferentes do grupo controle ($p > 0,05$). Contudo, aparentemente o AM 404 parece diminuir discretamente a viabilidade celular neste modelo de toxicidade por 6-OHDA.

Figura 59 - Tratamento da linhagem de células Neuro-2a diferenciadas com dbc-AMPc e expostas à 6-OHDA, grupo AM 404. Viabilidade celular analisada por MTT.

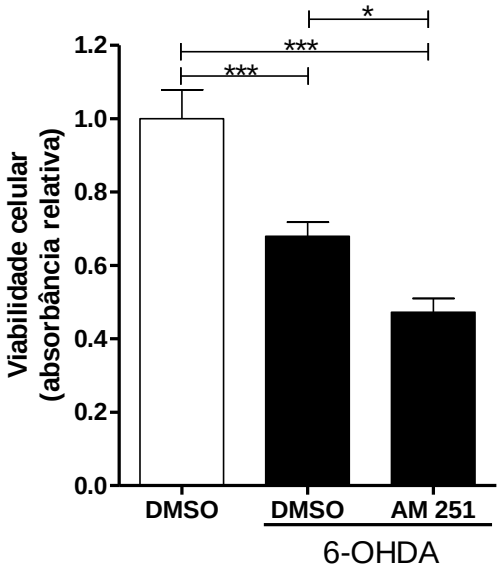


(DMSO) grupo controle, (CPZ) capsazepina, (n = 5-6, em duplicatas) Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$, ** $p<0,01$.

4.4.8 Tratamento com AM 251 em cultura exposta à 6-OHDA

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico MTT para o tratamento com AM 251 da linhagem de células Neuro-2a exposta à 6-OHDA são mostrados na figura 60. Resumidamente, os grupos expostos a 6-OHDA apresentaram diferenças em relação ao grupo controle (DMSO). O grupo 6-OHDA + DMSO apresentou diminuição de 32% (± 4%) e o grupo tratado com 6-OHDA + AM 251, de 53% (± 4%) ($p < 0,001$ para as duas comparações). Porem houve também diferença de 21 % entre os grupos tratados com 6-OHDA + DMSO e 6-OHDA + AM 251 ($p < 0,05$). Esses resultados mostram, portanto, que 10 µM de AM 251 foi prejudicial para a cultura, corroborando inclusive com os resultados apresentados a cima, onde a presença de AM 251, independentemente do composto ao qual ele foi conjugado, mostra diminuição da viabilidade celular.

Figura 60 - Tratamento da linhagem de células Neuro-2a diferenciada com dbc-AMPc e exposta à 6-OHDA, grupo AM 251. Viabilidade celular analisada por MTT.



(DMSO) grupo controle (n = 6, em duplicatas) Análise estatística por ANOVA (uma via) com pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$, *** $p<0,001$.

5 DISCUSSÃO

5.1 Bloco I - Receptores canabinóides CB_1 nos núcleos da base: estudos de imunofluorescência

Os receptores CB_1 são abundantemente expressos nos núcleos da base (AMERI, 1999; HERKENHAM et al., 1991a, b). De maneira geral, eles apresentam uma localização pré-sináptica principalmente em terminais axônicos de neurônios GABAérgicos. As maiores expressões de CB_1 nos núcleos da base estão na SNpr e nas duas porções do globo pálido (ENGLER et al., 2006; HOHMANN; HERKENHAM, 2000; MAILLEUX; VANDERHAEGHEN, 1992; MATSUDA; BONNER; LOLAIT, 1993); no estriado é predominantemente encontrado na porção dorsolateral (VAN WAES et al., 2012) onde é co-localizado com receptores de dopamina D1 e D2 (MESCHLER; HOWLETT, 2001). Não parece haver co-localização de CB_1 com células TH-positivas. (JULIAN et al., 2002).

Em geral, nossos dados estão de acordo com os estudos prévios. A imunorreatividade encontrada exclusivamente em neurópila nos nossos estudos é consistente com a localização pré-sináptica descrita para os receptores CB_1, ao qual tem sido atribuído papel neuromodulador na liberação de neurotransmissores (DI MARZO et al., 1998). Encontramos uma expressão marcante de CB_1 na SNpr e nas duas porções do GP, e moderada no estriado, em sua porção dorsolateral. Além disso, não observamos co-localização de CB_1 com células TH-positivas, especialmente na SN e GPs. Já no estriado a marcação difusa produzida pelos dois anticorpos pode causar a impressão de co-localização, no entanto, já se sabe que essa impressão é causada pela justaposição ou aposição das marcações produzidas pelos dois anticorpos, já que os receptores CB_1 do estriado estão localizados em neurônios que recebem projeções dopaminérgicas da SN, de forma que eles estão apenas próximos e não no mesmo neurônio (JULIAN et al., 2002).

Antes de discutirmos em maiores detalhes a localização dos receptores CB_1, no entanto, é importante ressaltar que os anticorpos existentes no mercado para os receptores CB_1, parecem ser alvo de questionamento na literatura. Embora existam muitos trabalhos publicados mostrando a expressão desses receptores em diversas estruturas no encéfalo, alguns grupos se dedicaram a analisar melhor a qualidade desses anticorpos (GRIMSEY et al., 2008). Por este motivo antes de optarmos pelo anticorpo escolhido fizemos testes com diferentes marcas e ao escolhermos o anticorpo da Cayman, fizemos controles de

marcação, como a omissão do anticorpo para CB_1 para avaliarmos as marcações inespecíficas do anticorpo secundário, e a pré-adsorção com o peptídeo controle correspondente (Cayman). Esses dois controles confirmaram a qualidade da marcação do nosso anticorpo para CB_1. Além disso, nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura que descrevem a marcação do receptor CB_1 nos núcleos da base por imunofluorescência e/ou imunoperoxidase (JULIAN et al., 2002; MÁTYÁS et al., 2006; WALSH et al., 2010) e por estudos com autorradiografia (HERKENHAM et al., 1991b).

A marcação difusa dos receptores CB_1 e a grande densidade de imunorreatividade em algumas regiões, principalmente nos núcleos da base, dificulta as análises de co-localização. Curiosamente são raros os trabalhos que mostram a co-localização dos receptores CB_1 em estudos de dupla-marcação e os resultados não mostram uma co-localização muito clara. Em nossos resultados a situação não é diferente. Apesar das evidências de co-localização obtidas na microscopia óptica, fomos capazes de encontrar apenas poucas co-localizações claras do receptor CB_1 através da microscopia confocal. Por este motivo descreveremos nossos resultados como marcações coincidentes, aposições ou padrões de distribuição semelhantes. A discussão que se segue, foi feita levando em consideração todos esses aspectos.

Como parte do esforço em analisar em mais detalhes a expressão de CB_1 nos núcleos da base, um primeiro aspecto avaliado foi a presença deste receptor em células gliais ou neuronais. A presença de CB_1 em células gliais é bem descrita na literatura. Eles são encontrados em astrócitos (DE FILIPPIS et al., 2009; STELLA, 2010), microglia (CABRAL; MARCIANO-CABRAL, 2005; STELLA, 2010) e oligodendrócitos (MATO et al., 2009; MOLINA-HOLGADO et al., 2002). Nós praticamente não encontramos a presença de CB_1 em células gliais, apenas algumas sugestões esporádicas que não conseguimos concluir se de fato eram co-localizações ou aposições. É importante ressaltar, entretanto, que diferente de nós, a maioria dos estudos que mostram a presença de CB_1 em células da glia foi feita em modelos *in vitro* (STELLA, 2010).

Por outro lado, o CB_1 parece ser predominantemente expresso por neurônios. Dados da literatura sugerem que, nos núcleos da base, os receptores CB_1 estão localizados principalmente em terminais axônicos de neurônios GABAérgicos (JULIAN et al., 2002; KÖFALVI et al., 2005; MATYAS et al., 2006). Para checar a presença de CB_1 em axônios e se eles estão co-localizados em neurônios GABAérgicos, conduzimos estudos de dupla-marcação de CB_1 com PAN (marcador de axônio) e as proteínas ligantes de cálcio

parvalbumina, expressa em neurônios GABAérgicos de projeção na SNpr e GPs (HONTANILLA; PARENT; GIMÉNEZ-AMAYA, 1997; HONTANILLA et al., 1998) e calbindina, expressa em neurônios GABAérgicos no estriado (BRICKELL et al., 1999; MARSICANO; LUTZ, 1999), uma vez que não obtivemos marcação de boa qualidade com anticorpo anti-GABA.

Nós não encontramos marcação de proteínas de neurofilamentos com CB_1 no estriado e GPs. As marcações para essas estruturas eram, em geral, complementares e apenas uma discreta sobreposição foi observada na SNpr. Uma explicação possível para esses resultados pode ser o fato de que a imunomarcação de PAN não é restrita à porção terminal do axônio, onde o CB_1 supostamente está. Entretanto, o padrão de distribuição dos receptores CB_1 foi bastante semelhante ao padrão de distribuição da marcação para parvalbumina nos GPs, e moderadamente na SNpr. Já a calbindina, apresentou uma grande co-localização com o receptor CB_1 na neurópila do estriado, o que corrobora a literatura, que mostra aproximadamente 75% de co-localização de calbindina com CB_1 no estriado. No caso da SNpr, não encontramos na literatura trabalhos que afirmam com clareza que os processos marcados pela calbindina são de fato em neurônios GABAérgicos, entretanto isso parece ser real, devido à semelhança de marcação entre o marcador para GABA (visto nos experimentos do bloco II) e calbindina nessa região. Além disso, já foi descrito que a calbindina é expressa no estriado pelos neurônios GABAérgicos de projeção para a SN e globos pálidos (BRICKELL et al., 1999), podendo gerar uma imunomarcação difusa típica de terminais de neurônios nessas regiões. Nós observamos que as duas marcações estão presentes na SNpr, mas elas são coincidentes apenas em algumas regiões. Tomados em conjunto, esses resultados reforçam os dados que sugerem uma grande expressão dos receptores CB_1 em neurônios GABAérgicos nos núcleos da base (MARSICANO; LUTZ, 1999) .

O resultado mais intrigante que obtivemos foi o padrão de distribuição muito semelhante entre o marcador para dendrito MAP-2 e o CB_1 no estriado e, principalmente nos GPs, o que sugere que os receptores CB_1 podem não ser exclusivamente pré-sinápticos nessa estrutura. Outros estudos mostram a localização pós-sináptica do CB_1 (ONG; MACKIE, 1999 a, b; SALIO et al., 2002) inclusive no estriado, onde ele é expresso em espinhos dendríticos de neurônios GABAérgicos e Glutamatérgicos (FERRÉ et al., 2009). O CB_1 pós-sináptico nos neurônios espinhais médios do estriado, também agem via proteína $G_{i/o}$ (MARTÍN et al., 2008), e interagem com os receptores dopaminérgico D2

(FERRÉ et al., 2010; TEBANO et al., 2009). Extrapolando para as outras estruturas analisadas no presente estudo, o mesmo poderia acontecer nas duas porções do GP. Apesar disso, Brotchie (2003) revisa que a ativação dos receptores CB_1 no GPe promove uma diminuição da recaptação de GABA dos neurônios estriatais que se projetam para o estriado, o que sugere uma localização pré-sináptica do CB_1 (SIERADZAN et al., 2001). Se a nossa hipótese de localização pós-sináptica de CB_1 se confirmar, a participação do sistema canabinóide na circuitaria nos núcleos da base se tornaria ainda mais complexa, já que as ações pré e pós-sináptica de CB_1 podem gerar resultados diferentes, o que sugere que o papel do receptor CB_1 pode ser mais amplo do que meramente mediador da inibição pré-sináptica (ONG; MACKIE, 1999a). Não podemos descartar, no entanto, que da mesma forma como acontece para a TH, o padrão de distribuição para MAP-2 e CB_1 sejam semelhantes, devido à aposição desses dois marcadores.

Resumidamente, levando em consideração nossos resultados e toda a reflexão sobre a marcação dos anticorpos para o receptor CB_1, nossos resultados mostram que o CB_1 está abundantemente expresso nos núcleos da base e parecem estar localizados principalmente em neurônios GABAérgicos. Além disso, o CB_1 parece estar localizado em dendritos de neurônios das duas porções do GP. Nossos resultados, somados aos dados da literatura, sugerem, portanto, a importante participação do sistema canabinóide na circuitaria dos núcleos da base.

5.2 Bloco II - Avaliação do decurso temporal da expressão de diferentes proteínas no modelo experimental da Doença de Parkinson *in vivo*

Para os estudos do decurso temporal em nosso modelo experimental da DP, nossos resultados revelam uma variação estrutura-específica do receptor CB_1 nos núcleos da base bastante complexa e distinta ao longo do tempo. Essa variação foi acompanhada por uma redução de TH geral, a qual foi discretamente revertida no estriado nos períodos pós-lesão mais longos. Nenhuma mudança no número de células parvalbumina-positivas foi observada nos núcleos da base em geral, assim como não houve alterações nos níveis da enzima GAD no estriado e SN. Já para calbindina, observamos um discreto aumento de sua marcação no estriado nos períodos pós-lesão mais curtos e uma redução de sua marcação na SN nos períodos pós-lesão mais longos.

Muitos estudos têm mostrado a participação do sistema canabinóide em diversas doenças neurodegenerativas, sugerindo, muitas vezes, propriedades neuroprotetoras (DE LAGO; FERNÁNDEZ-RUIZ, 2007; GARCÍA-ARENCIBIA et al., 2007; SÁNCHEZ; GARCÍA-MERINO, 2012). Nesse contexto, as altas densidades dos receptores CB_1 (AMERI, 1999; HERKENHAM et al., 1991a, b), inclusive confirmada no presente estudo; e dos ligantes endocanabinóides nos núcleos da base (FERNÁNDEZ-RUIZ, 2009) têm sido exploradas em ralação a DP, o que gera perspectivas para terapia com canabinóides.

Primeiramente, para verificarmos a possível relação entre a expressão dos receptores CB_1 com a progressão da DP, nós analisamos a expressão de TH como marcador de lesão de neurônios dopaminérgicos. Já é de conhecimento da literatura que nesse modelo de DP ocorre a diminuição da expressão de TH, devido a degeneração de neurônios dopaminérgicos (BLANDINI et al., 2007). Em geral, nossos resultados corroboram com os achados da literatura em relação à morte dos neurônios dopaminérgicos, uma vez que observamos a grande diminuição da expressão de TH no lado experimental, no estriado e na SN. No caso da SN, essa diminuição foi gradual ao longo dos períodos pós-lesão analisados, e mais pronunciada nos períodos pós-lesão mais longos como descrito por diversos outros autores (BLANDINI et al., 2007; revisado por BLUM et al., 2001; SCHOBER, 2004; TANAKA; OGAWA; ASANUMA, 2006; TILLERSON et al., 2002). Por outro lado, no estriado observamos um discreto aumento nos níveis de TH nos períodos pós-lesão mais longos, provavelmente pelo aumento de células TH-positivas da ciruitaria interna do estriado. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que descrevem um aumento da produção de dopamina em uma pequena circuitaria dopaminérgica estriatal (HUOT; PARENT, 2007), em resposta à diminuição das aferências dopaminérgicas vindas da SN (PORRITT et al., 2000), resultando em um aumento significativo do número de células TH-positivas, como em nosso modelo de DP.

Existem poucos estudos que estabelecem uma relação direta entre a variação da expressão dos receptores CB_1 com o desenvolvimento da DP. Além disso, esses estudos além de apresentarem resultados bastante controversos, são dedicados na grande maioria das vezes apenas ao estriado e/ou SN (CASTEELS et al., 2010; SILVERDALE et al., 2001; WALSH et al., 2010), e raramente, às outras estruturas do núcleos da base.

Nossos dados mostram que a diminuição de dopamina é acompanhada pela redução da expressão dos receptores CB_1 apenas na SN, que se inicia já nos períodos mais curtos pós-lesão e que gradualmente decresce ao longo do tempo. No estriado, entretanto, não

foram observadas mudanças na expressão dos receptores CB_1. Interessantemente, nas duas porções do GP nós observamos uma variação bifásica do receptor CB_1, com aumento inicial de sua expressão seguida de uma redução. Entretanto, essa variação ocorreu de forma diferente para as duas porções; no GPe o aumento da expressão dos receptores CB_1 permaneceu até 10 dias pós-lesão, enquanto no GPi isso foi observado apenas no primeiro dia após a lesão.

Um padrão bifásico de mudanças para o receptor CB_1 nos núcleos da base foi observado em estudos usando camundongos com deleção de genes Park específicos (GARCÍA-ARENCIBIA et al., 2009; GARCÍA-ARENCIBIA; GARCÍA; FERNÁNDEZ-RUIZ, 2009). Nos estágios precoces assintomáticos da DP (camundongos com 12 meses de idade) a dessensibilização/*downregulation* do CB_1 ocorre no GP e SN, particularmente no camundongo com deficiência na α-sinucleína, o que está associado à disfunção dopaminérgica. Em contrapartida, os estágios mais avançados da DP (camundongos mais velhos que 12 meses de idade), caracterizados pela degeneração nigral profunda associada ao aparecimento dos sintomas parkinsonianos, estão associados a uma *upregulation* dos receptores CB_1 (GARCÍA-ARENCIBIA et al., 2009; GARCÍA-ARENCIBIA; GARCÍA; FERNÁNDEZ-RUIZ, 2009).

Em encéfalos *post-mortem* de pacientes com DP também foi encontrada uma diminuição nos níveis de RNAm para o receptor CB_1 (HURLEY; MASH; JENNER, 2003). Um recente estudo empregando a técnica de PET (*positron emission tomography*) utilizando um radioligante específico para o receptor CB_1 reportou uma diminuição considerável do receptor CB_1 na SN de pacientes com DP, concomitantemente com um discreto aumento desse receptor nas áreas de projeção de dopamina (VAN LAERE et al., 2012). Em contrapartida, outro trabalho mostra que não há alteração de CB_1 no estriado em humanos (avaliação de encéfalos *post-mortem),* mesmo em pacientes com PD avançada, e conclui que esses receptores podem ser alvos de estratégias terapêuticas, porém faltam estudos simultâneos entre os sistemas dopaminérgico e canabinóide (FARKAS et al., 2012). Nesse contexto, é importante lembrar que o modelo de DP experimental do presente estudo é o que mais se aproxima do quadro encontrado em humanos, gerando uma morte dopaminérgica seletiva e gradual (revisado por SCHOBER, 2004; TILLERSON et al., 2002)

Em modelos animais utilizando agentes tóxicos, níveis reduzidos do RNAm para o receptor CB_1 foram encontrados no estriado do modelo de DP induzido por reserpina em

ratos (SILVERDALE et al., 2001). Walsh e colaboradores (2010) descreveram uma redução da expressão dos receptores CB_1 na SN ao longo do tempo (1-28 dias) em modelo de 6-OHDA. Uma vez que os receptores CB_1 da SNpr são localizados principalmente nos terminais GABAérgicos, os autores atribuíram a diminuição da expressão dos receptores CB_1 a um efeito tóxico indireto da 6-OHDA nos neurônios GABAérgicos, que levaria à uma degeneração desses neurônios e, consequentemente, à diminuição dos receptores CB_1. Entretanto, nós não observamos qualitativamente alterações na expressão de GABA no estriado, ou diferenças quantitativas nos níveis de GAD no estriado e na SN, ou nos números de células parvalbumina e calbindina-positivas no estriado, em nenhum dos períodos pós-lesão analisados. Portanto, os nossos resultados obtidos para o receptor CB_1 não parecem estar relacionados a uma possível degeneração dos neurônios GABAérgicos.

É importante lembrar que a transmissão GABAérgica é alterada na DP (ALEXANDER; CRUTCHER, 1990), por isso esperávamos variações nos níveis de GAD e GABA, o que não foi observado no presente estudo para o estriado e SN. No caso do GABA, como já citado anteriormente, a qualidade no anticorpo é questionável e, portanto, ele pode não ser sensível o suficiente para detectar tais variações. Já para a enzima GAD apesar de não ter havido alterações em seus níveis, não podemos descartar que a atividade da enzima esteja alterada, o que não foi investigado em nossos estudos.

Ainda sobre os marcadores de neurônios GABAérgicos, não foram observadas alterações no número de células parvalbumina-positivas também nas outras estruturas avaliadas. No caso da calbindina, embora tenhamos usado para marcar neurônios GABAérgicos, encontramos resultados bastante interessantes, que foram além dos nossos objetivos. No caso do estriado em nosso modelo de DP, observamos um aumento da expressão da calbindina em 1 e 5 dias pós-lesão. Estudos mostram que em processos lesivos, onde ocorre o aumento de cálcio, a calbindina pode aumentar a atividade das enzimas Ca^{2+} ATPase para regular a concentração de $Ca^{2+,}$ tamponando sua sobrecarga, protegendo os neurônios, portanto, de danos excitotóxicos (NG et al., 1996; AIRAKSINEN; THOENEN; MEYER, 1997). Resultados semelhantes foram vistos em diferentes modelos de processos lesivos como isquemia, (FREIMANN et al., 2010), e em modelo experimental de DP. Por exemplo, camundongos transgênicos que superexpressam Calbindina-D28k tratados com MPTP, mostraram um processo lesivo menor (aumento de TH) quando comparados aos camundongos selvagens tratados com MPTP (YUAN et al., 2013). Portanto, o aumento de calbindina observado no presente estudo pode ter sido uma

tentativa dos neurônios de se protegerem da excitotoxicidade promovia pela 6-OHDA no estriado.

Curiosamente, observamos uma diminuição das células calbindina-positivas na SNpc e em neurópila na SNpr. Esses dados estão de acordo com a literatura, pois, trabalhos mostram que em pacientes de DP existe uma redução da expressão de calbindina e de seus níveis de RNAm na SN, e uma redução moderada no envelhecimento. Essa redução nos níveis de calbindina tanto nas doenças neurodegenerativas, como no envelhecimento, são devido a eventos pós-transcripcionais (IACOPINO; CHRISTAKOS, 1990; JELLINGER, 1999). Além disso, no caso da SNpc parte dos neurônios dopaminérgicos que expressam TH coexpressam calbindina, dependendo da região analisada (NEMOTO; HIDA; ARAI, 1999). Esses dados além de explicarem a diminuição de calbindina observada na SNpc, explicam também o fato dessa diminuição ter sido heterogenia, já que a calbindina está presente em outros neurônios (não dopaminérgicos), que não sofreram degeneração. Portanto os resultados da expressão de calbindina na SN em nosso modelo corroboram com os dados da literatura de pacientes com DP.

No caso da SNpr, os resultados obtidos para a calbindina são bastante semelhantes aos obtidos para os receptores CB_1, o que poderia sugerir diminuição dos processos GABAérgicos. Como vimos na microscopia confocal, as coincidências de marcação entre calbindina e CB_1 na SNpr não ocorrem em todas as áreas. Além disso, não foram observadas reduções no número de corpos celulares calbindina-positivos no estriado que se projetam para a SNpr, podendo ser essa diminuição, portanto, nos níveis de calbindina produzidos pelos neurônios e não uma diminuição no número de neurônios. Contudo, esses dados podem sugerir que existe uma resposta dos neurônios GABAérgicos frente a falta de dopamina, e em nossos estudos verificamos que essa resposta pode passar pelo controle de cálcio e pela regulação do receptores CB_1.

Os dados da literatura sobre a diminuição dos receptores CB_1 na SN em modelos de DP são controversos. Por exemplo, González e colaboradores (2006) observaram que a injeção intracerebroventricular de 6-OHDA aumentou a expressão dos receptores CB_1 na SN, sugerindo uma superativação da transmissão canabinóide nesse modelo. Os autores ainda reportam que essa superatividade do sistema canabinóide é revertida pela ação do antagonista rimonabanto, o qual deve ter uma potencial atividade anti-hipocinética no parkinsonismo moderado, representando um possível alvo de estratégia terapêutica.

Embora bastante explorado em outras doenças neurodegenerativas, a expressão de CB_1 no GP ainda não foi bem explorada em modelos animais da PD. Por exemplo, estudos com diferentes modelos transgênicos da doença de Huntington, mostram diminuição dos receptores CB_1 no estriado e na SN (DOWIE et al., 2009), e alterações seletivas da expressão do receptor em diferentes regiões dos núcleos da base, incluindo os GPs, dependendo do estágio de progressão na doença (CASTEELS et al., 2011). Em tecido de encéfalos de pacientes com doença de Huntington, uma drástica redução da expressão dos receptores CB_1 foi encontrada nos dois segmentos do GP (ALLEN et al., 2009). Em ratos com encefalomielite autoimune experimental, um modelo animal de esclerose múltipla, uma diminuição dos receptores CB_1 foi encontrada principalmente em estruturas dos núcleos da base (CABRANES et al., 2005). Embora tenha sido observada uma diminuição de CB_1 no GP e também na SN em um modelo transgênico de camundongos com deficiência da α-sinucleína (GARCÍA-ARENCIBIA et al., 2009), não há na literatura atual trabalhos que mostrem a expressão do receptor CB_1 no GP no modelo de DP utilizado em nossos estudos.

Portanto, o presente estudo mostra pela primeira vez a variação da expressão dos receptores CB_1 nas quatro estruturas dos núcleos da base que expressam esse receptor, inclusive nos dois segmentos do GP, no modelo de injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA em ratos. Essas informações são importantes para o entendimento do envolvimento dos receptores CB_1 na circuitaria dos núcleos da base nas condições da DP.

A literatura aponta para o envolvimento do sistema canabinóide na circuitaria dos núcleos da base e que esse sistema sofre mudanças em doenças neurodegenerativas (GARCÍA-ARENCIBIA; GARCÍA; FERNÁNDEZ-RUIZ, 2009; VAN DER STELT; DI MARZO, 2003). Aparentemente o sistema canabinóide e o sistema dopaminérgico exercem um controle mútuo entre si. Na DP, por exemplo, foi sugerido que mudanças no sistema canabinóide podem participar da geração dos sintomas ou fazer parte de um mecanismo de compensação para balancear o desequilíbrio fisiológico dos núcleos da base causado pela falta de dopamina (VAN DER STELT; DI MARZO, 2003). Além dos estudos mencionados anteriormente sobre as variações da expressão dos receptores CB_1 em modelos de DP, outros estudos mostram mudanças nos níveis de ligantes endocanabinóides, como, por exemplo, a anandamida (GIUFFRIDA et al., 1999) ou mudanças dos transportadores de membrana de endocanabinóides e da enzima FAAH (GUBELLINI et al., 2002).

Em relação aos nossos achados, acreditamos que a variação estrutura-específica da expressão dos receptores CB_1 obtida ao longo do tempo, pode ser uma resposta plástica como parte do mecanismo de compensação nos núcleos da base frente ao processo lesivo da DP. A participação do sistema canabinóide em processos de plasticidade foi vista em outros estudos como ablação retiniana (CHAVES et al., 2008), desaferentação vestibular bilateral vestibular (BAEK et al., 2011), em epilepsia induzida por pilocarpina (FALENSKI et al., 2009), dentre muitos outros.

Assim, analisando os nossos dados da expressão dos receptores CB_1, juntamente com as alterações que ocorrem na transmissão GABAérgica na DP (ALEXANDER; CRUTCHER, 1990) acreditamos que esses eventos podem estar integrados. É importante ressaltar que não observamos evidências de degeneração de neurônios GABAérgicos em nosso modelo, mas esses resultados foram procurados apenas para descartar a hipótese de que a expressão dos receptores CB_1 estaria diminuída por conta de uma degeneração GABAérgica, mas esses dados, não excluem de forma alguma a relação entre os dois sistemas. A diminuição da transmissão de GABA para a SNpr e para o GPi promove um aumento da atividade neuronal dessas duas estruturas. Em contrapartida, o aumento da liberação de GABA para o GPe gera uma grande inibição dessa estrutura (ALEXANDER; CRUTCHER, 1990). Em condições fisiológicas, a ativação dos receptores CB_1 pré-sinápticos em neurônios GABAérgicos inibem a liberação de GABA (WILSON; NICOLL, 2001). Portanto, a nossa hipótese é de que a diminuição dos receptores CB_1 na SNpr e no GPi em nosso modelo de DP, pode ser uma resposta plástica na tentativa de aumentar a liberação da transmissão GABAérgica. Seguindo o mesmo raciocínio, os níveis aumentados da expressão do CB_1 no GPe poderia levar a uma diminuição da liberação de GABA, o que poderia recuperar parte de sua atividade neuronal. No caso do GPe é importante lembrar que apesar de um aumento inicial, em 60 dias após a lesão ocorre a diminuição da expressão de CB_1. Alguns autores descrevem que a ativação do CB_1 deve aumentar a os níveis de GABA no GPe por reduzir sua recaptação das aferências estriatais para esta estrutura (revisado por BENARROCH, 2007; VENDEROVA; BROWN; BROTCHIE, 2005). É possível, portanto, que esta diminuição de CB_1 no GPe vista em 60 dias pós-lesão seja uma tentativa de aumentar a recaptação de GABA nessa estrutura

Concluindo, nossos dados indicam uma complexa modulação da expressão dos receptores CB_1 nos núcleos da base ao longo do tempo, em nosso modelo de DP. Essa modulação está de acordo com resultados observados em modelos transgênicos da DP e

mais importantemente, em pacientes com DP. O fato de as mudanças na expressão dos receptores CB_1 serem estrutura-específica, nos leva a especular que nossos dados ajudam a explicar a participação do sistema canabinóide em um possível mecanismo de compensação na DP, possivelmente relacionado com plasticidade neuronal. Além disso, nossos dados validam o modelo de injeção estriatal de 6-OHDA como um bom modelo animal para os estudos do sistema canabinóide na DP.

5.3 Bloco III - Tratamentos com agonista e antagonista canabinóide no modelo experimental da Doença de Parkinson *in vivo*

Para o tratamento *in vivo* com compostos canabinóides, nossos resultados mostram que ouve diminuição para TH e aumento da ativação astrocitária (GFAP) e microglial (OX-42) para todos os tratamentos realizados, e poucas foram as diferenças desses parâmetros entre os grupos. Já os estudos comportamentais mostram que, aparentemente, o tratamento com ACEA foi prejudicial, enquanto o tratamento com AM 251 foi benéfico, em relação às respostas motoras.

Como o esperado, as injeções de 6-OHDA geraram diferenças em relação à expressão de TH entre os lados controle e experimental, e a presença de ativação glial, mostrada pela maior expressão de OX-42 e GFAP, no lado experimental, confirmando um processo inflamatório, já bem conhecido em modelos de DP (SILVA; FUXE; CHADI, 2009). Entretanto, embora sem diferença estatística, o grupo tratado com ACEA mostrou níveis menores de TH, sugerindo uma piora na progressão da doença com o uso desse composto.

As análises comportamentais foram conduzidas para avaliarmos os possíveis comprometimentos ou melhoras motores causados pelos tratamentos com canabinóides. Inicialmente fizemos apenas comparações entre o grupo SHAM e os animais com injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA e tratados com DMSO, para avaliarmos se o nosso modelo experimental da DP, apresentava diferenças nas respostas motoras comportamentais em relação a um animal sem a injeção de 6-OHDA. A apomorfina é um agonista de receptores dopaminérgicos que age rapidamente após a administração subcutânea (JAHANSHAHI et al., 2010). Em animais lesados unilateralmente com 6-OHDA, a ação da apomorfina ocorre principalmente no lado intacto. Dessa forma o animal apresenta um comportamento de rotação em direção ao lado onde não ocorreu a lesão, ou seja, ao lado contralateral à lesão (HUDSON et al., 1993). Nos nossos estudos, como lesamos o estriado direito, era esperada uma maior

frequência de rotação para o lado esquerdo, como de fato aconteceu para todos os grupos com a maioria dos animais. A outra análise comportamental utilizada foi a observação da atividade locomotora geral dos animais em CA. A atividade locomotora geral em CA manual é avaliada pela frequência de locomoção (por quantos quadrados o animal passou) e pela frequência de levantar (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1989). Assim, era esperada uma diminuição em pelo menos um desses parâmetros em nossos animais lesados por 6-OHDA. Observamos diferenças na rotação induzida por apomorfina, onde os animais DP-induzidos apresentaram maior número de rotações para a esquerda; e na atividade locomotora geral, através da frequência de levantar, onde os animais DP-induzidos levantaram menos vezes. Portanto esses dados confirmam a eficiência da lesão em relação a parâmetros comportamentais motores, como mostrado por outros estudos com modelos animais da DP, tanto em relação à rotação induzida por apomorfina (REAL et al., 2013), quanto à diminuição da atividade locomotora (RAUCH; SCHWABE; KRAUSS, 2010; WINNER et al., 2009).

Posteriormente as comparações foram feitas apenas entre os grupos DMSO e ACEA e DMSO e AM 251. Observamos um aumento na média do número de rotações nos dois dias de teste dos animais tratados com ACEA quando comparado aos animais tratados com DMSO, porém, como as variações foram grandes para este grupo, não foram observadas significâncias estatísticas. É importante ressaltar que apesar desse teste ser muito utilizado em modelos de indução de DP unilateral, existe ainda discussões a respeito do efeito de rotação induzida pela apomorfina, principalmente no que diz respeito à que extensão de morte dos neurônios dopaminérgicos este efeito acontece (PRZEDBORSKI et al., 1995; SINDHU; SARAVANAN; MOHANAKUMAR, 2006; SINDHU et al., 2006). Kirik, Rosenblad e Björklund (1998), por exemplo, demonstraram que o teste com apomorfina apresentou muita variabilidade entre os animais do mesmo grupo e resultados inconsistentes, como o ocorrido para o nosso grupo tratado com ACEA. Os resultados só foram significantes em animais que receberam uma concentração maior da droga. Já para o grupo tratado com AM 251, no segundo dia de teste, observamos uma diminuição no número de rotações quando comparado ao grupo tratado com DMSO, indicando uma melhora no quadro comportamental.

Para os testes de atividade geral, nossos dados mostram que o grupo tratado com ACEA apresentou uma diminuição no parâmetro de levantar, quando comparado ao grupo tratado com DMSO, nos dois dias de teste. Em contrapartida, o grupo tradado com AM 251 mostrou melhora nesse parâmetro, ou seja, a frequência de levantar foi maior quando comparada ao grupo tratado com DMSO, apenas no primeiro dia de testes. Acreditamos que

essa diferença não foi observada no segundo dia de teste, pois, de maneira geral, houve uma diminuição progressiva na atividade geral avaliada no CA quando comparamos o primeiro e o segundo dia de testes. Isso aconteceu, pois, provavelmente no segundo dia a arena já não mais representava novidade para os animais, o que explicaria a diminuição na atividade exploratória de maneira geral (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1989). Inclusive este fato pode ter interferido, no sentido de mascarar a diferença no parâmetro de levantar, no segundo dia de exposição ao CA para todos os grupos.

No que diz respeito aos resultados que obtivemos para o grupo ACEA, eles não concordam com grande parta da literatura para o sistema canabinóide, pois, de maneira geral os agonistas canabinóides ou a ativação do receptor CB_1 por canabinóides endógenos são apontados como sendo neuroprotetores em diversos modelos de neurotoxicidade, como hipóxia aguda, excitotoxicidade, e modelos de estresses oxidativos e traumáticos, tanto *in vitro* como *in vivo*. (GILBERT et al., 2007 ; JACKSON et al., 2004, 2005; PANIKASHVILI et al., 2001, 2006; PARMENTIER- BATTEUR et al., 2002; VAN DER STELT et al., 2002, 2005; ZANI et al., 2007).

No caso específico da DP, embora sejam poucos os realizados nesta área, a literatura aponta os agonistas canabinóides, tais como o WIN55212-2, THC, canabidiol, entre outros, como apresentando papel neuroprotetor (CARROLL et al., 2012; GARCÍA-ARENCIBIA et al., 2007; LASTRES-BECKER et al., 2005; PRICE et al., 2009; VAN VLIET et al., 2008). Por exemplo, os agonistas canabinóides WIN 55,212-2 e JWH015 reduzem a ativação microglial e consequentemente a degeneração de neurônios dopaminérgicos, induzida por MPTP em camundongos e melhoram o rendimento motor desses animais logo nos primeiros dias após a administração de MPTP (PRICE et al., 2009). Neste mesmo modelo, outro trabalho mostra que os tratamentos com WIN55,212-2 e HU210, aumentam os níveis de dopamina na SN e nas fibras dos neurônios dopaminérgicos que se projetam para o estriado, melhoram funções motoras, suprimem a produção de estresse oxidativo pela NADPH oxidase; e reduzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias pela micróglia ativada (CHUNG et al., 2011). Outros estudos mostram que a propriedades antioxidantes do THC e do canabidiol (LASTRES-BECKER et al., 2005), do AM 404 (GARCIA-ARENCIBIA et al., 2007), e do fitocanabinóide Δ^9-THCV (tetrahidrocanabivarina) (GARCÍA et al., 2011), podem exercer papel neuroprotetor em ratos lesados por 6-OHDA ou lipopolissacarídeos (LPS).

No caso específico do agonista ACEA, encontramos apenas um trabalho na literatura que tratou ratos com injeção de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial com 1

mg/Kg deste agonista, e não foram observados efeitos neuroprotetores, porém os efeitos também não foram prejudiciais como visto em nosso modelo (GARCÍA-ARENCIBIA et al., 2007). Entretanto, a literatura também aponta que alguns modelos em que a ativação dos receptores CB_1 pode não ter efeito algum, ou ainda, ser prejudicial à lesão (revisado por VAN DER STELT; DI MARZO, 2005b). Por exemplo, em modelo de isquemia cerebral causada por oclusão bilateral da carótida em gerbils, a administração de ACEA aumentou a área da lesão (LANDUCCI et al., 2011). Já em relação a outros tipos de neurodegeneração, estudos mostram que agonistas canabinóides podem atuar como adjuvantes em processos neurodegenerativos, como por exemplo, em cultura primária de córtex de ratos, onde o THC induz apoptose bloqueando o ciclo celular (DOWNER; FOGARTY; CAMPBELL, 2003).

Vale lembrar, porém, que estamos lidando com duas abordagens que, por si só, já apresentam grandes variações de resultados, o sistema canabinóide e a DP. No caso do sistema canabinóide, é importante ressaltar que os seus compostos devem exercer efeitos diferentes em células neuronais dependendo do sinal (dose, tipo de agente, tempo de exposição), e o nosso protocolo, assim como qualquer outro está sujeito a essas variáveis (GUZMÁN, 2003). No caso da variável de doses em especial, estudos descrevem que doses diferentes de canabinóides podem apresentar efeitos diferentes (revisado por GROTENHERMEN, 2003), como por exemplo, doses mais baixas causam efeitos estimulatórios e doses mais altas causam efeitos inibitórios (SARNE et al., 2011). Em uma revisão bastante completa sobre o papel dúbio do sistema canabinóide em relação à neuroproteção ou neurotoxicidade, Sarne e colaboradores (2011) fazem um levantamento de que as doses de canabinóides normalmente neuroprotetoras estão entre 1 e 10 mg/kg em um tratamento agudo. Exatamente as faixas em que usamos em nosso estudo. Entretanto, a maioria dos trabalhos envolve a neurotoxicidade por aumento de cálcio intracelular, o que é equilibrado pela ativação de receptores canabinóides. No caso da DP, Blandini e colaboradores (2008) fazem uma revisão a respeito do modelo da DP por injeções de 6-OHDA, e analisam os diferentes resultados dependentes da dose de droga utilizada, do local exato da injeção, se a injeção é uni ou bilateral; que fase da lesão está sendo investigada e quais regiões dos núcleos da base foram analisadas, entre outros. E se levarmos em consideração ainda outros modelos animais de DP, os resultados podem ser ainda mais variados.

Em relação aos animais tratados com AM 251, de maneira geral, os animais apresentaram um menor número de rotação para esquerda e maior frequência no parâmetro de levantar no CA. De fato os antagonistas canabinóides têm sido apontados pela literatura como possíveis alvos terapêuticos para aliviar os sintomas da DP. Por exemplo, estudos mostram que o rimonabanto possui efeito anti-hipocinético em modelo de DP por injeção intracerebroventricular de 6-OHDA, por aumentar a liberação de glutamato das aferências excitatórias corticoestriatas (GARCÍA-ARENCIBIA et al., 2008). Além dos efeitos neuroprotetores devido às propriedades anti-oxidantes do Δ^9-THCV em ratos DP-induzidos por 6-OHDA observados por García e colaboradores (2011), a sua capacidade de bloquear o receptor CB_1 mostra melhoras em diversos parâmetros motores avaliados em campo aberto (*computer-aided actimeter*), e esses resultados foram semelhantes aos obtidos com rimonabanto. Nesses animais ainda não foram observadas mudanças nos níveis de dopamina no estriado e na SN, mas sim nos níveis de glutamato no estriado. Outro estudo mostrou que os antagonistas CB_1, rimonabanto e AM 251, só mostraram efeitos antiparkinsonianos quando a degeneração nigral foi muito severa (FERNANDEZ-ESPEJO et al., 2005).

Muitos trabalhos mostram a ação dos antagonistas canabinóides como adjuvantes no tratamento com levodopa, transformada em dopamina pela enzima dopa-descarboxilase, que apesar de proporcionar melhora do controle muscular e da resposta cognitiva e psíquica nos primeiros 5 anos do tratamento, passa a apresentar complicações motoras e induzir discinesias, por mecanismos ainda não elucidados (JAIN; BENKO; SAFRANEK, 2012). Assim estudos mostram que o rimonabanto, parece ser um bom adjuvante para a levodopa, em termos de comportamento motor, aumentando o número de passos dos animais, em modelo de injeção unilateral de 6-OHDA (KELSEY; HARRIS; CASSIN, 2009). Este estudo ainda mostrou que mesmo quando utilizado isoladamente, o rimonabanto foi capaz de gerar melhoras no quadro motor dos animais DP-induzidos. O antagonista seletivo do receptor CB_1 1-[7-(2-clorofenil)-8-(4-clorofenil)-2-metilpirazol[1,5-a]-[1,3,5]triazina-4-]-3-elilaminoazedina-tidina-3-ácido carboxílico amida benzenosulfonato, CE, aumentou a ação antiparkinsoniana da levodopa ao mesmo tempo que reduziu seus efeitos secundários, em macacos lesados por MPTP (CAO et al., 2007). O rimonabanto reverteu efeitos motores prejudiciais específicos da levodopa também em modelo de DP de ratos tratados com reserpina (SEGOVIA et al., 2003).

Nossos resultados mostram apenas melhoras no quadro comportamental e não no quadro histopatológico, sugerindo que o AM 251 deve interferir apenas na circuitaria dos neurônios remanescentes e não na sobrevivência de células nos núcleos da base. Interessantemente, apesar de termos escolhido um tratamento de janela curta (apenas 4 dias após a cirurgia de indução de DP), a melhoria nos testes comportamentais permaneceram no segundo dia de testes. Este tipo de efeito já foi observado para outros compostos em outros modelos de neuroinflamação. Por exemplo, camundongos pré-tratados 4 dias com curcumina mostram melhoras dos déficits cognitivos mesmo após 10 dias da injeção de LPS (KAWAMOTO et al., 2012).

Em conclusão, nossos resultados para o tratamento *in vivo* com compostos canabinóides, mostram que o agonista do receptor CB_1, ACEA, parece ter sido prejudicial à lesão, tanto nos estudos neuroquímicos (discretamente), como nos estudos comportamentais. Por outro lado, o tratamento com o antagonista do receptor CB_1, AM 251, embora não tenha apresentado diferenças neuroquímicas, mostrou melhoras nos testes comportamentais.

5.4 Bloco IV - Estudos *in vitro:* cultura de células expostas à 6-OHDA e tratadas com diferentes compostos canabinóides

Como discutido em detalhes no bloco III, os agonistas canabinóides e os canabinóides com propriedades antioxidantes, parecem exercer efeitos neuroprotetores em diferentes modelos de DP (CARROLL et al., 2012; GARCÍA-ARENCIBIA et al., 2007; LASTRES-BECKER et al., 2005; PRICE et al., 2009; VAN VLIET et al., 2008) Como as condições do tratamento *in vivo* são bastante complexas e não conseguimos observar tais efeitos, buscamos a cultura de células, como alternativa para avaliação desses efeitos. Assim a abordagem escolhida para o presente estudo, foi a avaliação da viabilidade celular em uma linhagem de neurônios diferenciada em células dopaminérgicas e exposta à toxicidade de 6-OHDA. Nossos resultados mostram que, de maneira geral, o tratamento com ACEA, canabidiol e AM 404, não apresentaram diferenças na viabilidade celular, quando comparados ao grupo tratado com DMSO. Entretanto, para o grupo tratado com AM 404, apesar de não haver diferença estatística entre este grupo e o tratado com DMSO, a média de viabilidade para esse grupo foi maior, e ainda não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle (sem a 6-OHDA). Nossos resultados mostram ainda, que a presença de AM 251, independentemente do composto ao qual ele foi conjugado, diminuiu a viabilidade celular.

Conforme visto em modelos animas de DP, compostos canabinóides também são estudados como agentes protetores em estudos *in vitro* para DP. Assim, um estudo mostra que o HU-210, um agonista canabinóide não seletivo, aumentou a sobrevivência de cultura de células granulares de cerebelo de rato expostas à 6-OHDA. Porém, este efeito neuroprotetor foi significativamente maior quando foi utilizado um meio condicionado obtido a partir de culturas de células gliais mistas tratadas com o composto canabinóide, do que quando o composto era adicionado diretamente no cultivo de neurônios, sugerindo que este canabinóide deve exercer o efeito protetor via células da glia (LASTRES-BECKER et al., 2005). Em nosso estudo, utilizamos cultura pura de neurônios, e talvez essa seja uma possível explicação para não termos visto efeitos protetores claros em nosso modelo. Outro estudo mostra que a anandamida inibe a apoptose induzida pela 6-OHDA em linhagem de células PC12, todavia este efeito protetor perece ser independente dos receptores canabinóides CB_1 e CB_2 e do receptor TRPV1 (MNICH; FINN; DOWD, 2010).

No caso do AM 251, acreditamos que os efeitos prejudiciais vistos no presente estudo estejam relacionados à dose de 10 mg/Kg. Dados do nosso grupo ainda não publicados com esse mesmo protocolo de estudos *in vivo*, mostram que doses menores de AM 251 não apresentam tais efeitos.

Contudo podemos observar que os resultados dos estudos *in vivo* e *in vitro* se diferiram no que diz respeito a sobrevivência dos neurônios. De qualquer forma, devemos lembrar que os canabinóides são referidos como sendo agentes neuromoduladores e eles podem controlar a sobrevivência ou morte dos neurônios. Essas diferenças podem estar relacionadas a vários fatores: (1) a neuroproteção por parte dos canabinóides ocorre de maneira diferenciada em estudos *in vivo* e *in vitro*, e isto se deve ao seu impacto supracitado em vários tipos de células nos estudos *in vivo*, o que não ocorre nos estudos *in vitro*, (2) os canabinóides devem exercer efeitos diferentes em células neuronais dependendo do sinal (dose, tipo de agente, tempo de exposição), (3) endo e exocanabinóides devem possuir comportamentos farmacológicos diferentes, e (4) a origem da célula neural e seu estado de diferenciação podem afetar a sensibilidade à morte (GUZMÁN, 2003).

Contudo, de maneira geral, nosso modelo de cultura de células não foi um bom modelo para avaliarmos os efeitos do sistema canabinóide em modelo de 6-OHDA *in vitro*. Além disso, os resultados foram opostos aos estudos *in vivo*, entretanto este fato está de acordo com a literatura do sistema canabinóide.

5.5 Discussão geral

Nosso estudo teve o objetivo geral de avaliar o receptor CB_1 nos núcleos da base com abordagens morfológicas e farmacológicas. Para isso, iniciamos nosso estudo buscando o padrão de distribuição de CB_1 com marcadores para glia e neurônios nas quatro estruturas dos núcleos da base que expressam esse receptor, estriado, GPe, GPi e SNpr. De maneira geral, nossos dados mostram a presença do receptor CB_1 em neurônios, principalmente os GABAérgicos, e nenhuma evidência clara deste em neurônios dopaminérgicos, ambos os dados confirmados pela literatura (HERKHNAN et al., 1991a; JULIAN et al., 2002)

Dada a grande expressão de CB_1 nos núcleos da base e o fato do sistema canabinóide participar de maneira importante dessa circuitaria (VAN DER STELT; DI MARZO, 2003) partimos então para a investigação da expressão de CB_1 em modelo de DP induzida por injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA em ratos, em diferentes períodos pós-lesão (1, 5, 10, 20 e 60 dias). Complementamos este estudo ainda, com a avaliação de TH, como controle da lesão dos neurônios dopaminérgicos; e de GABA, enzima GAD, parvalbumina e calbindina como controle de uma possível degeneração de neurônios GABAérgicos. Nossos dados da avaliação temporal dessas proteínas mostram que, de maneira geral, ocorre uma diminuição gradual de TH do lado experimental em todos os períodos pós-lesão estudados. O CB_1 possui uma variação complexa e bem peculiar para cada estrutura como já discutido no bloco II e os resultados para os marcadores do sistema GABAérgico mostram não haver uma neurodegeneração expressiva desses neurônios, porém eles devem passar por processos de plasticidade, como mostrado pelas alterações dos receptores CB_1 e de calbindina nos núcleos da base.

Nossos resultados somados ao fato de que o CB_1 diminui na SN de pacientes com DP (VAN LAERE et al., 2012), e a grande discussão que se faz a respeito de que o sistema canabinóide pode participar de mecanismos compensatórios na circuitaria alterada pela DP (VAN DER STELT; DI MARZO, 2003) nos levaram a investigar os efeitos do tratamento com agentes canabinóides no nosso modelo experimental de DP. O tratamento com ACEA, agonista do receptor CB_1, parece agravar a degeneração provocada por 6-OHDA. Entendemos que nossos resultados mostram dados opostos à grande maioria dos trabalhos apresentados da literatura, entretanto quando avaliamos estes dados juntamente com os estudos de decurso temporal, é tentador especular que a ativação aguda dos receptores

canabinóides pode agravar a lesão em nosso modelo, e talvez por este motivo exista uma diminuição geral da expressão dos receptores CB_1 na DP. Concordando com Van der Stelt e Di Marzo (2003) acreditamos que essa diminuição da expressão de CB_1 possa ser um mecanismo compensatório da circuitaria dos núcleos da base frente à lesão causada pela 6-OHDA, ou seja, por algum motivo o sistema canabinóide precisa ficar menos ativo, o que justificaria um agravamento da lesão com a utilização de agentes que ativam agudamente o receptor CB_1. No mesmo raciocínio, o bloqueio dos receptores CB_1, pode ser uma estratégia terapêutica interessante como vimos com a utilização do antagonista AM 251.

Os experimentos com cultura de células são uma alternativa interessante para estudar aspectos específicos de um agente tóxico como a 6-OHDA, por exemplo, porém, eles podem trazer resultados opostos aos estudos *in vivo*, como ocorreu no presente estudo. Por este motivo, acreditamos que os resultados dos estudos *in vivo* são mais próximos da realidade da DP.

6 CONCLUSÕES

O objetivo geral do presente estudo era o de aprofundar o conhecimento sobre o sistema canabinóide na circuitaria dos núcleos da base de ratos. Para isso iniciamos nosso trabalho investigando a distribuição dos receptores CB_1 nos núcleos da base, bem como possíveis co-localizações destes com diferentes marcadores. O receptor CB_1 é abundantemente expresso na circuitaria dos núcleos da base predominantemente em neurônios GABAérgicos, principalmente no GPe, no GPi e na SNpr onde apresentam uma localização pré-sináptica. Além disso, o receptor CB_1 não apresenta co-localização com neurônios dopaminérgicos e aparece muito esparsamente em células da glia nessa circuitaria. Por fim, uma parcela desses receptores parece também apresentar uma localização pós-sináptica, principalmente no GPe e no GPi.

Outra abordagem consistiu em avaliar a variação temporal da expressão de CB_1 e de proteínas relacionadas aos sistemas dopaminérgicos e GABAérgicos no modelo experimental da DP produzido pela injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA em ratos. Os receptores CB_1 apresentaram uma variação de expressão estrutura-específica complexa e distinta nos núcleos da base ao longo do tempo. Além disso, como não observamos diminuição no número de neurônios GABAérgicos neste modelo, mas observamos modulação de proteínas expressas por esses neurônios, como o próprio receptor CB_1 e a calbindina, concluímos que os neurônios GABAérgicos apresentam respostas plásticas frente a diminuição de dopamina, as quais acreditamos estarem relacionadas a mecanismos de compensação, principalmente no que se refere ao sistema canabinóide.

Por fim, avaliamos os efeitos do tratamento com compostos canabinóides em parâmetros neuroquímicos e comportamentais no modelo experimental de DP *in vivo* e sobre a viabilidade celular em um modelo *in vitro*. A ativação do receptor CB_1 pelo agonista ACEA parece ter sido prejudicial à lesão, tanto nos estudos neuroquímicos (discretamente), como nos estudos comportamentais. Por outro lado, o bloqueio do receptor CB_1 pelo antagonista AM251 embora não tenha produzido alterações neuroquímicas, mostrou efeitos benéficos nos testes de comportamento motor, sendo este composto uma possível estratégia terapêutica para os sintomas da DP. Embora não tenhamos observado grandes diferenças na viabilidade celular com os tratamentos de forma geral, o AM 404 (inibidor da recaptação de canabinóides endógenos) diminui discretamente a morte celular produzida pela exposição à 6-OHDA em nosso modelo. Comparando nossos dados de tratamento com compostos

canabinóides nos ratos e na cultura de células concluímos ainda que os resultados podem ser diferenciados, ou até opostos, entre as abordagens *in vivo* e *in vitro*.

REFERÊNCIAS*

AGID, Y. Parkinson's disease: pathophysiology. **Lancet,** v. 337, p. 1321-1324, 1991.

AIRAKSINEN, M. S.; THOENEN, H.; MEYER, M. Vulnerability of midbrain dopaminergic neurons in calbindin-D28k-deficient mice: lack of evidence for a neuroprotective role of endogenous calbindin in MPTP-treated and weaver mice. **Eur. J. Neurosci.,** v. 9, p. 120-127, 1997.

ALEXANDER, G. E.; CRUTCHER, M.. .D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. **Trends Neurosci**., v. 13, p. 266-271, 1990.

ALLEN, K. L.; WALDVOGEL, H. J.; GLASS, M.; FAULL, R. L. Cannabinoid (CB(1)), GABA(A) and GABA(B) receptor subunit changes in the globus pallidus in Huntington's disease. **J. Chem. Neuroanat**., v. 37, p. 266-281, 2009.

ALVARES, L. O.; GENRO, B. P.; VAZ BREDA, R.; PEDROSO, M. F.; DA COSTA, J. C.; QUILLFELD, T. J. A. AM251, a selective antagonist of the CB_1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. **Brain Res.,** v. 1075, p. 60-67, 2006.

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

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

BEAL, M.. F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nat. Rev. Neurosci**., v. 2, p. 325-334, 2001

BEGBIE, J.; DOHERTY, P.; GRAHAM, A. Cannabinoid receptor CB_1 expression follows neuronal differentiation in the early chick embryo. **J. Anat.,** v. 205, p. 213-218, 2004.

BELTRAMO, M.; STELLA, N.; CALIGNANO, A.; LIN, S. Y.; MAKRIYANNIS, A.; PIOMELLI, D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. **Science**, v. 277, p. 1094-1097, 1997.

BENARROCH, E. Endocannabinoids in basal ganglia circuits: implications for Parkinson disease. **Neurology**, v. 69, p. 306-309, 2007.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Atividade geral: conceito e medidas. **Psicologia**, v. 6, p. 43-48,1989.

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

BLANDINI, F.; LEVANDIS, G.; BAZZINI, E.; NAPPI, G.; ARMENTERO, M. T. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. **Eur. J. Neurosci.,** v. 25, p. 397-405, 2007.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. **Parkinsonism Relat. Disord.,** v. 2, p. 124-129, 2008.

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N.; NISSOU, M.; BENABID, A. L.; SADOUL, R.; VERNA, J. M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog. Neurobiol.,** v. 65, p. 135-172, 2001.

BRICKELL, K. L.; NICHOLSON, L. F.; WALDVOGEL, H. J.; FAULL, R. L. Chemical and anatomical changes in the striatum and substantia nigra following quinolinic acid lesions in the striatum of the rat: a detailed time course of the cellular and GABA(A) receptor changes. **J. Chem. Neuroanat**., v. 17, p. 75-97, 1999.

BROADHURST, P. L. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. **Fortschr. Psychosom.,** v. 1, p. 63–69, 1960.

BROTCHIE, J. M. CB_1 cannabinoid receptor signalling in Parkinson's disease. **Curr. Opin. Pharmacol**., v. 3, p. 54-61, 2003

CABRAL, G. A.; MARCIANO-CABRAL, F. Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. **J. Leukoc. Biol**., v. 78, p. 1192-1197, 2005.

CABRANES, A.; VENDEROVA, K.; DE LAGO, E.; FEZZA, F.; SÁNCHEZ, A.; MESTRE, L.; VALENTI, M.; GARCÍA-MERINO, A.; RAMOS, J. A.; DI MARZO, V.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Decreased endocannabinoid levels in the brain and beneficial effects of agents activating cannabinoid and/or vanilloid receptors in a rat model of multiple sclerosis. **Neurobiol. Dis**., v. 20, p. 207-217, 2005.

CAO, X.; LIANG, L.; HADCOCK, J. R.; IREDALE, P. A.; GRIFFITH, D. A.; MENNITI, F. S.; FACTOR, S.; GREENAMYRE, J. T.; PAPA, S. M. Blockade of cannabinoid type 1 receptors augments the antiparkinsonian action of levodopa without affecting dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated rhesus monkeys. **J. Pharmacol. Exp. Ther**., v. 323, p. 318-326, 2007.

CARROLL, C. B.; ZEISSLER, M. L.; HANEMANN, C. O.; ZAJICEK, J. P. Δ(9) -THC exerts a direct neuroprotective effect in a human cell culture model of Parkinson's disease. **Neuropathol. Appl. Neurobiol**. [Epub ahead of print]. 2012

CASTEELS, C.; LAUWERS, E.; BAITAR, A.; BORMANS, G.; BAEKELANDT, V.; VAN LAERE, K. In vivo type 1 cannabinoid receptor mapping in the 6-hydroxydopamine lesion rat model of Parkinson's disease. **Brain Res**., v. 1316, p. 153-162, 2010.

CASTEELS, C.; VANDEPUTTE, C.; RANGARAJAN, J. R.; DRESSELAERS, T.; RIESS, O.; BORMANS, G.; MAES, F.; HIMMELREICH, U.; NGUYEN, H.; VAN LAERE, K. Metabolic and type 1 cannabinoid receptor imaging of a transgenic rat model in the early phase of Huntington disease. **Exp. Neurol**., v. 229, p. 440-449, 2011.

CHAVES, G. P.; NOGUEIRA, T. C.; BRITTO, L. R.; BORDIN, S.; TORRÃO, A. S. Retinal removal up-regulates cannabinoid CB(1) receptors in the chick optic tectum**. J. Neurosci. Res**., v. 15, p. 1626-1634, 2008.

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.

CUMMINGS, J. L. Depression and Parkinson's disease: a review**. Am. J. Psychiatry**, v. 149, p. 443-544, 1009.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, p. 889-909, 2003.

DE FILIPPIS, D.; STEARDO, A.; D'AMICO, A.; SCUDERI, C.; CIPRIANO, M.; ESPOSITO, G.; IUVONE, T. Differential cannabinoid receptor expression during reactive gliosis: a possible implication for a nonpsychotropic neuroprotection. **ScientificWorldJournal**, v. 9, p. 229-235, 2009.

DE LAGO, E.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Cannabinoids and neuroprotection in motor-related disorders. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets**, v. 6, p. 377-387, 2997.

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.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway**. Exp. Neurol**., v. 175, p. 303-317, 2002.

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. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? **Nat. Rev. Drug Discov.,** v. 7, p. 438–455, 2008.

DOWIE, M. J.; BRADSHAW, H .B.; HOWARD, M. L.; NICHOLSON, L. F.; FAULL, R. L.; HANNAN, A. J; GLASS, M. Altered CB_1 receptor and endocannabinoid levels precede motor symptom onset in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **Neuroscience,** v. 163, p. 456-465, 2009.

DOWNER, E. J.; FOGARTY, M. P.; CAMPBELL, V. A. Tetrahydrocannabinol-induced neurotoxicity depends on CB_1 receptor-mediated c-Jun N-terminal kinase activation in cultured cortical neurons. **Br. J. Pharmacol.,** v. 140, p. 547-557, 2003.

ENGLER, B.; FREIMAN, I.; URBANSKI, M.; SZABO, B. Effects of exogenous and endogenous cannabinoids on GABAergic neurotransmission between the caudate-putamen and the globus pallidus in the mouse. **J. Pharmacol. Exp. Ther**., v. 316, p. 608-617, 2006

FALENSKI, K. W.; CARTER, D. S.; HARRISON, A. J.; MARTIN, B. R.; BLAIR, R. E.; DELORENZO, R. J. Temporal characterization of changes in hippocampal cannabinoid CB(1) receptor expression following pilocarpine-induced status epilepticus. **Brain Res**., v. 25, p. 64-72, 2009.

FARKAS, S.; NAGY, K.; JIA, Z.; HARKANY, T.; PALKOVITS, M.; DONOHOU, S. R.; PIKE, V. W.; HALLDIN, C.; MÁTHÉ, D.; CSIBA, L.; GULYÁS, B. The decrease of dopamine D_2/D_3 receptor densities in the putamen and nucleus caudatus goes parallel with maintained levels of CB_1 cannabinoid receptors in Parkinson's disease: a preliminary autoradiographic study with the selective dopamine D_2/D_3 antagonist [^{3}H]raclopride and the novel CB_1 inverse agonist [^{125}I]SD7015. **Brain Res. Bull**., v. 87, p. 504-510, 2012.

FARSANDAJ, N.; GHAHREMANI, M. H.; OSTAD, S. N. Role of cannabinoid and vanilloid receptors in invasion of human breast carcinoma cells. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v. 31, p. 377-387, 2012.

FERNANDEZ-ESPEJO, E.; CARABALLO, I.; DE FONSECA, F. R.; EL BANOUA, F.; FERRER, B.; FLORES, J. A.; GALAN-RODRIGUEZ, B. Cannabinoid CB_1 antagonists possess antiparkinsonian efficacy only in rats with very severe nigral lesion in experimental parkinsonism. **Neurobiol. Dis.,** v. 18, p. 591-601, 2005

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.

FERNÁNDEZ-RUIZ, J.; ROMERO, J.; VELASCO, G.; TOLÓN, R. M.; RAMOS, J. A.; GUZMÁN, M. Cannabinoid CB_2 receptor: a new target for the control of neural cell survival?. **Trends Pharmacol.**, v. 28, p. 39-45, 2007.

FERNÁNDEZ-RUIZ, J.; PAZOS, M. R.; GARCÍA-ARENCIBIA, M.; SAGREDO, O.; RAMOS, J. A Role of CB_2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. **Mol Cell Endocrinol.,** v. 286, p. 91-96,2008.

FERNÁNDEZ-RUIZ, J. The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. **Br. J. Pharmacol.**, v. 156, p. 1029-1040, 2009.

FERRÉ, S.; GOLDBERG, S. R.; LLUIS, C.; FRANCO, R.. Looking for the role of cannabinoid receptor heteromers in striatal function. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 26-34, 2009.

FERRÉ, S.; LLUÍS, C.; JUSTINOVA, Z.; QUIROZ, C.; ORRU, M.; NAVARRO, G.; CANELA, E. I.; FRANCO, R.; GOLDBERG, S. R. Adenosine-cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal function. **Br. J. Pharmacol**., v. 160, p. 443-453, 2010.

FOWLER, C. J.; NILSSON, O.; ANDERSSON, M.; DISNEY, G.; JACOBSSON, S. O. P.; TIGER, G. Pharmacological properties of cannabinoid receptors in the avian brain: similarity of rat and chicken cannabinoid1 receptor recognition sites and expression of cannabinoid2 receptor-like immunoreactivity in the embryonic chick brain. **Pharmacol. Toxicol**., v. 88, p. 213-222, 2001.

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

FREIMANN, F. B.; CROME, O.; SHEVTSOVA, Z.; BÄHR, M.; KÜGLER, S. Evaluation of long-term upregulation of Calbindin D28K as a preventive approach for ischaemic stroke. **Int. J. Stroke**, v. 5, p. 319-320, 2010.

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

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.

GARCÍA, C.; PALOMO-GARO, C.; GARCÍA-ARENCIBIA, M.; RAMOS, J.; PERTWEE, R.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid Δ^9-THCV in animal models of Parkinson's disease. **Br. J. Pharmacol.**, v. 163, p. 1495-1506, 2011.

GARCÍA-ARENCIBIA, M.; GONZÁLEZ, S.; DE LAGO, E.; RAMOS, J. A.; MECHOULAM, R.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. **Brain Res**., v. 1134, p. 162-170, 2007.

GARCÍA-ARENCIBIA, M.; FERRARO, L.; TANGANELLI, S.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Enhanced striatal glutamate release after the administration of rimonabant to 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Neurosci. Lett**., v. 438, p. 10-13, 2008.

GARCÍA-ARENCIBIA, M.; GARCÍA, C.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Cannabinoids and Parkinson's disease. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets**, v. 8, p. 432-439, 2009.

GARCÍA-ARENCIBIA, M.; GARCÍA, C.; KURZ, A.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, J. A.; GISPERT-SÁCHEZ, S.; MENA, M. A.; AUBURGER, G.; DE YÉBENES, J. G.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Cannabinoid CB_1 receptors are early downregulated followed by a further upregulation in the basal ganglia of mice with deletion of specific park genes. **J. Neural. Transm. Suppl.**, v. 73, p. 269-275, 2009.

GATLEY, S. J.; GIFFORD, A. N.; VOLKOW, N. D.; LAN, R.; MAKRIYANNIS, A. 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB_1 receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 307, p. 331-338, 1996.

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.

GIUFFRIDA, A.; PARSONS, L. H.; KERR, T. M.; RODRÍGUEZ DE FONSECA, F.; NAVARRO, M.; PIOMELLI, D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. **Nat. Neurosci.,** v. 2, p. 358-363, 1999.

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

GONZÁLEZ, S.; SCORTICATI, C.; GARCÍA-ARENCIBIA, M.; DE MIGUEL, R.; RAMOS, J. A.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Effects of rimonabant, a selective cannabinoid CB_1 receptor antagonist, in a rat model of Parkinson's disease. **Brain Res.,** v. 1073-1074, p. 209-219, 2006.

GRIGOR'IAN, G. A; BAZIAN, A. S. The experimental models of Parkinson's disease in animals. **Usp. Fiziol. Nauk.,** v. 38, p. 80-88, 2007.

GRIMSEY, N. L.; GOODFELLOW, C. E.; SCOTTER, E. L.; DOWIE, M. J.; GLASS, M.; GRAHAM, E. S. Specific detection of CB_1 receptors; cannabinoid CB_1 receptor antibodies are not all created equal! **J. Neurosci. Methods**, v., 171, p. 78-86, 2008.

GROTENHERMEN, F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. **Clin Pharmacokinet**., v. 42, p. 327-360, 2003.

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

GUBELLINI, P.; PICCONI, B.; BARI, M.; BATTISTA, N.; CALABRESI, P.; CENTONZE, D.; BERNARDI, G.; FINAZZI-AGRÒ, A.; MACCARRONE, M. J. Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. **Neuroscience,** v.22, p. 6900-6907, 2002.

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

HASHIMOTODAN, I. Y.; OHNO-SHOSAKU, T.; KANO, M. Endocannabinoids and Synaptic Function in the CNS. **Neurocientist**, v. 13, p. 127-137, 2007.

HENDERSON, J. M.; WATSON, S.; HALLIDAY, G. M.; HEINEMANN, T.; GERLACH, M. Relationships between various behavioural abnormalities and nigrostriatal dopamine depletion in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat. **Behav. Brain. Res**., v. 139, p. 105-13, 2003.

HENDERSON, J. M.; WATSON, S. Convulsive and postural effects of lesioning the mid-substantia nigra pars reticulata in naïve and 6-hydroxydopamine lesioned rats. **Brain Res. Bull.**, v. 60, p. 179-185, 2003.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; LITTLE, M. D.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; DE COSTA, B. R; RICE, K. C. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v. 87, p. 1932-1936, 1990.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; DE COSTA, B. R.; RICHFIELD, E. K. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. **Brain Res.,** v. 547, p. 267-274, 1991a.

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

HILLARD, C. J.; MANNA, S.; GREENBERG, M. J.; DICAMELLI, R.; ROSS, R. A.; STEVENSON, L. A.; MURPHY, V.; PERTWEE, R. G.; CAMPBELL, W.B. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 289, p. 1427-1433, 1999.

HOHMANN, A. G.; HERKENHAM, M. Localization of cannabinoid CB(1) receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study. **Synapse**, v. 37, p. 71-80, 2000.

HONTANILLA, B.; PARENT, A.; GIMÉNEZ-AMAYA, J. M. Parvalbumin and calbindin D-28k in the entopeduncular nucleus, subthalamic nucleus, and substantia nigra of the rat as revealed by double-immunohistochemical methods. **Synapse**, v. 25, p. 359-367, 1997.

HONTANILLA, B.; PARENT, A.; DE LAS HERAS, S.; GIMÉNEZ-AMAYA, J. M. Distribution of calbindin D-28k and parvalbumin neurons and fibers in the rat basal ganglia. **Brain Res. Bull.,** v. 47, p. 107-116, 1998.

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.; BREIVOGEL, C. S.; CHILDERS, S. R.; DEADWYLER, S. A.; HAMPSON, R. E.; PORRINO, L. J. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 345-358, 2004.

HUDSON, J. L.; VAN HORNE, C. G.; STRÖMBERG, I.; BROCK, S.; CLAYTON, J.; MASSERANO, J.; HOFFER, B. J.; GERHARDT, G. A. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. **Brain Res**., v. 626, p. 167-174, 1993.

HUOT, P.; PARENT, A. Dopaminergic neurons intrinsic to the striatum. **J. Neurochem**., v. 101, p. 1441-1447, 2007.

HURLEY, M. J.; MASH, D. C.; JENNER, P. Expression of cannabinoid CB_1 receptor mRNA in basal ganglia of normal and parkinsonian human brain. **J. Neural. Transm.,** v. 110, p. 1279-1288, 2003.

IACOPINO, A. M.; CHRISTAKOS, S. Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. **Proc. Nat.l Acad. Sci. U S A**, v. 87, p. 4078-4082, 1990.

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. J.; DIEMEL, L. T.; PRYCE, G.; BAKER, D. Cannabinoids and neuroprotection in CNS inflammatory disease. **J. Neuro.l Sci.,** v. 233, p. 21-25, 2005.

JAHANSHAHI, M.; JONES, C. R.; ZIJLMANS, J.; KATZENSCHLAGER, R.; LEE, L.; QUINN, N.; FRITH, C. D.; LEES, A. J. Dopaminergic modulation of striato-frontal connectivity during motor timing in Parkinson's disease. **Brain**, v. 3, p. 727-745, 2010.

JAIN, L.; BENKO, R.; SAFRANEK, S. Clinical inquiry. Which drugs work best for early Parkinson's disease? **J. Fam. Pract.,** v. 61, p. 106-108, 2012.

JELLINGER, K. A. Post mortem studies in Parkinson's disease--is it possible to detect brain areas for specific symptoms? **J. Neural. Transm. Suppl.**, v. 56, p. 1-29, 199.

JORDAN, J. D.; HE, J. C.; EUNGDAMRONG, 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(alpha)o/i-triggered proteasomal degradation of Rap1GAPII. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 11413-11421, 2005.

JULIAN, M. D.; MARTIN, A. B.; CUELLAR, B.; RODRIGUEZ DE FONSECA, F.; NAVARRO, M.; MORATALLA, R.; GARCIA-SEGURA, L. M. Neuroanatomical relationship between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia. **Neuroscience,** v. 119, p. 309-318, 2002.

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. **J. Neurosci**., v. 25, p. 7813-7820, 2006.

KAWAMOTO, E. M.; SCAVONE, C.; MATTSON, M. P.; CAMANDOLA, S. Curcumin requires Tumor Necrosis Factor α signaling to alleviate cognitive impairment elicited by Lipopolysaccharide. **Neurosignals**, 2012. In press.

KELSEY, J. E.; HARRIS, O.; CASSIN, J. The CB(1) antagonist rimonabant is adjunctively therapeutic as well as monotherapeutic in an animal model of Parkinson's disease. Behav **Brain Res**., v. 203, p. 304-307, 2009.

KHASPEKOV, L. G.; BRENZ VERCA, M. S.; FRUMKINA, L. E.; HERMANN, H.; MARSICANO, G.; LUTZ, B. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. **Eur. J. Neurosci.**, v. 19, p. 1691-1698, 2004.

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.

KIRIK, D.; ROSENBLAD, C.; BJÖRKLUND, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Exp. Neurol.,** v. 152, p. 259-277, 1998.

KÖFALVI, A.; RODRIGUES, R. J.; LEDENT, C.; MACKIE, K.; VIZI, E. S.; CUNHA, R. A.; SPERLÁGH, B. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. **J. Neurosci.,** v. 25, p. 2874-2884, 2005.

KWAK, J. Y.; JUNG, J. Y.; HWANG, S. W.; LEE, W. T.; OH, U. A capsaicin-receptor antagonist, capsazepine, reduces inflammation-induced hyperalgesic responses in the rat: evidence for an endogenous capsaicin-like substance. **Neuroscience,** v. 86, p. 619-626, 1998.

LABANDEIRA-GARCIA, J. L.; ROZAS, G.; LOPEZ-MARTIN, E.; LISTE, I.; GUERRA, M. J. Time course of striatal changes induced by 6-hydroxydopamine lesion of the nigrostriatal pathway, as studied by combined evaluation of rotational behaviour and striatal Fos expression. **Exp. Brain Res**., v. 108, p. 69-84, 1996.

LANDUCCI, E.; SCARTABELLI, T.; GERACE, E.; MORONI, F.; PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E. CB_1 receptors and post-ischemic brain damage: studies on the toxic and neuroprotective effects of cannabinoids in rat organotypic hippocampal slices. **Neuropharmacology**, v. 60, p. 674-682, 2011.

LASTRES-BECKER, I.; CEBEIRA, M.; DE CEBALLOS, M. L.; ZENG, B. Y.; JENNER, P.; RAMOS, J. A.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. J. Increased cannabinoid CB_1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets. **Eur. J. Neurosci.,** v. 14, p. 1827-1832, 2001.

LASTRES-BECKER, I.; MOLINA-HOLGADO, F.; RAMOS, J. A.; MECHOULAM, R.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. **Neurobiol. Dis.,** v. 19, p. 96-107, 2005.

LEONELLI, M.; BRITTO, L. R.; CHAVES, G. P.; TORRAO, A. S. Developmental expression of cannabinoid receptors in the chick retinotectal system. **Develop**. **Brain Res.,** v. 156, p. 176-182, 2005.

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

MAILLEUX, P.; VANDERHAEGHEN, J. J. Distribution of the neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. **Neuroscience,** v. 48, p. 655-688, 1992.

MARSICANO, G.; LUTZ, B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. **Eur. J. Neurosci.,** v. 1, p. 4213-4225, 1999.

MARSICANO, G.; MOOSMANN, B.; HERMANN, H.; LUTZ, B.; BEHL, C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB_1. **J. Neurochem**., v. 80, p. 448-456, 2002

MARTÍN, A. B.; FERNANDEZ-ESPEJO, E.; FERRER, B.; GORRITI, M. A.; BILBAO, A.; NAVARRO, M.; RODRIGUEZ DE FONSECA, F.; MORATALLA, R. Expression and function of CB_1 receptor in the rat striatum: localization and effects on D1 and D2 dopamine receptor-mediated motor behaviors. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 1667-1679, 2008.

MATO, S.; DEL OLMO, E.; PAZOS, A. Ontogenetic development of cannabinoid receptor expression and signal transduction functionality in the human brain. **Eur. J. Neurosci.**, v. 17, p. 1747-1754, 2003.

MATO, S.; ALBERDI, E.; LEDENT, C.; WATANABE, M.; MATUTE, C. CB_1 cannabinoid receptor-dependent and -independent inhibition of depolarization-induced calcium influx in oligodendrocytes. **Glia**, v. 57, p. 295-306, 2009.

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.

MATSUDA, L. A.; BONNER, T. I.; LOLAIT, S. J. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. **J. Comp. Neurol.,** v. 327, p. 535-550, 1993.

MÁTYÁS, F.; YANOVSKY, Y.; MACKIE, K.; KELSCH, W.; MISGELD, U.; FREUND T. F. Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia. **Neuroscience,** v. 137, p. 337-361, 2006.

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..

MECHOULAM, R.; PARKER, L. A. The Endocannabinoid System and the Brain. **Annu. Rev. Psychol.**, v. 64, p. 21-47, 2013.

MECHOULAM, R.; SPATZ, M.; SHOHAMI, E. Endocannabinoids and neuroprotection. **Sci. STKE,** v. 129 re5, 2002.

MECHOULAM, R. Discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their possible roles in neuroprotection and aggression**. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 66, p. 93-99, 2002

MESCHLER, J. P.; HOWLETT, A. C. Signal transduction interactions between CB_1 cannabinoid and dopamine receptors in the rat and monkey striatum. **Neuropharmacology**, v. 40, p. 918-926, 2001.

MNICH, K.; FINN, D. P.; DOWD, E.; GORMAN, A. M. Inhibition by anandamide of 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells. **Int. J. Cell Biol**., v. 2010:818497, 2010.

MOLINA-HOLGADO, E.; VELA, J. M.; ARÉVALO-MARTÍN, A.; ALMAZÁN, G.; MOLINA-HOLGADO, F.; BORRELL, J.; GUAZA, C. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. **J. Neurosci.,** v. 22, p. 9742-9753, 2002.

MORERA-HERRERAS, T.; RUIZ-ORTEGA, J. A.; GÓMEZ-URQUIJO, S.; UGEDO, L. Involvement of subthalamic nucleus in the stimulatory effect of Delta(9)-tetrahydrocannabinol on dopaminergic neurons. **Neuroscience,** v. 151, p. 817-823, 2008

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

NEMOTO, C.; HIDA, T.; ARAI, R. Calretinin and calbindin-D28k in dopaminergic neurons of the rat midbrain: a triple-labeling immunohistochemical study. **Brain Res**., v. 846, p. 129-136, 1999.

NG, M. C.; IACOPINO, A. M.; QUINTERO, E. M.; MARCHES, F.; SONSALLA, P. K.; LIANG, C. L.; SPECIALE, S. G.; GERMAN, D. C. The neurotoxin MPTP increases calbindin-D28k levels in mouse midbrain dopaminergic neurons.Brain **Res. Mol. Brain Res**., v. 36, p. 329-336, 1996.

ONAIVI, E. S.; ISHIGURO, H.; GONG, J. P.; PATEL, S.; PERCHUK, A.; MEOZZI, P. A.; MYERS, L.; MORA, Z.; TAGLIAFERRO, P.; GARDNER, E.; BRUSCO, A.; AKINSHOLA, B. E.; LIU, Q. R.; HOPE, B.; IWASAKI, S.; ARINAMI, T.; TEASENFITZ, L.; UHL, G. R. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB_2 receptors in brain. **Ann. N Y Acad. Sci.,** v. 1074, p. 514-536, 2006.

ONG, W. Y.; MACKIE, K. A light and electron microscopic study of the CB_1 cannabinoid receptor in the primate spinal cord. **J. Neurocytol.,** v. 28, p. 39-45, 1999a.

ONG, W. Y.; MACKIE, K. A light and electron microscopic study of the CB_1 cannabinoid receptor in primate brain. **Neuroscience,** v. 92, p. 1177-1191, 1999b

O'SULLIVAN, S. E.; KENDALL, D. A. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease. **Immunobiology**, v. 215, p. 611-616, 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.

PANIKASHVILI, D.; SHEIN, N. A.; MECHOULAM, R.; TREMBOVLER, V.; KOHEN, R.; ALEXANDROVICH, A.; SHOHAMI, E. The endocannabinoid 2-AG protects the blood-brain barrier after closed head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines. **Neurobiol. Dis**., v. 22, p. 257-264, 2006.

PAPA, S. M. The cannabinoid system in Parkinson's disease: multiple targets to motor effects. **Exp. Neurol**., v.211, p. 334-338, 2008.

PARMENTIER-BATTEUR, S.; JIN, K.; MAO, X. O.; XIE, L. GREENBERG D. A.; Increased severity of stroke in CB_1 cannabinoid receptor Knock-out mice. **J. Neurosci**., v. 22, p. 9771-9775, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2005.

PEGORINI, S.; ZANI, A.; BRAIDA, D.; GUERINI-ROCCO, C.; SALA, M. Vanilloid VR1 receptor is involved in rimonabant-induced neuroprotection. **Br. J. Pharmacol**., v. 147, p. 552-559, 2006.

PERTWEE, R. G. Pharmacology of cannabinoid CB_1 and CB_2 receptors. **Pharmacol. Ther.,** v. 74 , p. 129-180, 1997.

PERTWEE, R. G. Cannabinoid receptors and pain**. Prog. Neurobiol.,** v. 63, p. 569-611, 2001.

PERTWEE, R. G. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB_1 receptors. **Life Sci**., v. 76, p. 1307-1324, 2005.

PETITET, F.; JEANTAUD, B.; REIBAUD, M.; IMPERATO, A.; DUBROEUCQ, M. C. Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. **Life Sci**., v. 63, p. 1-6, 1998.

PORRITT, M. J.; BATCHELOR, P. E.; HUGHES, A. J.; KALNINS, R.; DONNAN, G. A.; HOWELLS, D. W. New dopaminergic neurons in Parkinson's disease striatum. **Lancet**, v. 356, p. 44-50, 2000.

PRICE, D. A.; MARTINEZ, A. A.; SEILLIER, A.; KOEK, W.; ACOSTA, Y.; FERNANDEZ, E.; STRONG, R.; LUTZ, B.; MARSICANO, G.; ROBERTS, J. L.; GIUFFRIDA, A. WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against

nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci**., v. 29, p. 2177-2186, 2009.

PRZEDBORSKI, S.; LEVIVIER, M.; JIANG, H.; FERREIRA, M.; JACKSON-LEWIS, V.; DONALDSON, D.; TOGASAKI, D. M. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Neuroscience**, v. 67, p. 631-647, 1995.

PURISAI, M. G.; MCCORMACK, A. L.; CUMINE, S.; LI, J.; ISLA, M. Z.; DI MONTE, D. A. Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. **Neurobiol. Dis**., v. 25, p. 392-400, 2007

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.

RAUCH, F.; SCHWABE, K.; KRAUSS, J. K. Effect of deep brain stimulation in the pedunculopontine nucleus on motor function in the rat 6-hydroxydopamine Parkinson model. **Behav. Brain. Res**., v. 210, p. 46-53, 2010.

REAL, C. C.; FERREIRA, A. F. B.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; TORRÃO, A. S.; PIRES, R. S.; BRITTO, L. R. G. BDNF receptor blockade hinders the beneficial effects of exercise in a rat model of Parkinson´s disease. **Neuroscience,** 2013. In press.

ROMERO, J.; BERRENDERO, F.; PÉREZ-ROSADO, A.; MANZANARES, J.; ROJO, A.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. J.; DE YEBENES, J. G.; RAMOS, J. A. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB_1 receptor mRNA levels in the caudate-putamen**. Life Sci.**, v. 66, p. 485-494, 2000.

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

RUPAREL, N. B.; PATWARDHAN, A. M.; AKOPIAN, A. N.; HARGREAVES, K. M. Desensitization of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) by the TRP vanilloid 1-selective cannabinoid arachidonoyl-2 chloroethanolamine. **Mol. Pharmacol.**, v. 80, p. 117-123, 2011.

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, 2007a.

SAGREDO, O.; RAMOS, J. A.; DECIO, A.; MECHOULAM, R.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Cannabidiol reduced the striatal atrophy caused 3-nitropropionic acid in vivo by mechanisms independent of the activation of cannabinoid, vanilloid TRPV1 and adenosine A2A receptors. **Eur. J .Neurosci.,** v.26, p. 843-851, 2007b.

SALIO, C.; FISCHER, J.; FRANZONI, M. F.; CONRATH, M. Pre- and postsynaptic localizations of the CB_1 cannabinoid receptor in the dorsal horn of the rat spinal cord. **Neuroscience**, v. 110, p. 755-764, 2002.

SÁNCHEZ, A. J.; GARCÍA-MERINO, A. Neuroprotective agents: cannabinoids. **Clin. Immunol.,** v. 142, p. 57-67, 2012.

SANTOS, C. M. New Agents Promote Neuroprotection In Parkinson Models. **CNS Neurol. Disord. Drug. Targets**. 2012. [Epub ahead of print]

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

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.

SCHMIDT, N.; FERGER, B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. **J. Neural. Transm.,** v. 108, p. 1263-1282, 2001.

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

SCHWARTING, R. K; HUSTON, J. P. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. **Prog Neurobiol**., v. 50, p. 275-331, 1996.

SEGOVIA, G.; MORA, F.; CROSSMAN, A. R.; BROTCHIE, J. M. Effects of CB_1 cannabinoid receptor modulating compounds on the hyperkinesia induced by high-dose levodopa in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, v. 18, p. 138-149, 2003.

SIERADZAN, K. A.; FOX, S. H.; HILL, M.; DICK, J. P.; CROSSMAN, A. R.; BROTCHIE, J. M. Cannabinoids reduce levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a pilot study. **Neurology**, v. 57, p. 2108-2111, 2001.

SILVA, C.; FUXE, K.; CHADI, G. Involvement of astroglial fibroblast growth factor-2 and microglia in the nigral 6-OHDA parkinsonism and a possible role of glucocorticoid hormone on the glial mediated local trophism and wound repair. **J. Neural. Transm. Suppl.,** v. 73, p. 185-202, 2009.

SILVERDALE, M. A.; MCGUIRE, S.; MCINNES, A.; CROSSMAN, A. R.; BROTCHIE, J. M. Striatal cannabinoid CB_1 receptor mRNA expression is decreased in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease. **Exp. Neurol**., v. 169, p. 400-406, 2001.

SINDHU, K. M.; SARAVANAN, K. S.; MOHANAKUMAR, K. P. Behavioral differences in a rotenone-induced hemiparkinsonian rat model developed following intranigral or median forebrain bundle infusion. **Brain Res**., v. 1051, p. 25-34, 2006.

SINDHU, K. M.; BANERJEE, R.; SENTHILKUMAR, K. S.; SARAVANAN, K. S.; RAJU, B. C.; RAO, J. M.; MOHANAKUMAR, K. P. Rats with unilateral median forebrain bundle, but not striatal or nigral, lesions by the neurotoxins MPP+ or rotenone

display differential sensitivity to amphetamine and apomorphine. **Pharmacol. Biochem. Behav.,** v. 84, p. 321-329, 2006.

SMEYNE, R. J.; JACKSON-LEWIS, V. The MPTP model of Parkinson's disease. **Brain Res. Mol. Brain. Res.,** v. 134, p. 57-66, 2005.

STELLA, N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. **Glia,** v. 58, p. 1017-1030, 2010.

SZALLASI, A.; DI MARZO, V. New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. **Trends Neurosci**., v. 10, p. 491-497, 2000

TAGLIAFERRO, P.; JAVIER RAMOS, A.; ONAIVI, E. S.; EVRARD, S. G.; LUJILDE, J.; BRUSCO, A. R. Neuronal cytoskeleton and synaptic densities are altered after a chronic treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. **Brain Res.,** v. 1085, p. 163-176, 2006.

TANAKA, K.; OGAWA, N.; ASANUMA, M. Molecular basis of 6-hydroxydopamine-induced caspase activations due to increases in oxidative stress in the mouse striatum. **Neurosci. Lett.,** v. 410, p. 85-9, 2006.

TEBANO, M. T.; MARTIRE, A.; CHIODI, V.; PEPPONI, R.; FERRANTE, A.; DOMENICI, M. R.; FRANK, C.; CHEN, J. F.; LEDENT, C.; POPOLI, P. Adenosine A2A receptors enable the synaptic effects of cannabinoid CB_1 receptors in the rodent striatum. **J Neurochem**., v. 110, p. 1921-1930, 2009.

THOMAS, A.; BAILLIE, G. L.; PHILLIPS, A. M.; RAZDAN, R. K.; ROSS, R. A.; PERTWEE, R. G. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB_1 and CB_2 receptor agonists in vitro. **Br. J. Pharmacol**., v. 150, p. 613-623, 2007.

THYAGARAJAN, B.; POTIAN, J. G.; GARCIA, C. C.; HOGNASON, K.; CAPKOVÁ, K.; MOE, S. T.; JACOBSON, A. R.; JANDA, K. D.; MCARDLE, J. J. Effects of hydroxamate metalloendoprotease inhibitors on botulinum neurotoxin A poisoned mouse neuromuscular junctions. **Neuropharmacology**, v. 58, p. 1189-1198, 2009..

TILLERSON, J. L.; COHEN, A. D.; CAUDLE, W. M.; ZIGMOND, M. J.; SCHALLERT, T.; MILLER, G. W. Forced nonuse in unilateral parkinsonian rats exacerbates injury**. J Neurosci**., v.22, p. 6790-9, 2002.

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. **Rev. Bras. Psiquiatr.,** 2013. In press.

TREMBLAY, R. G.; SIKORSKA, M.; SANDHU, J. K.; LANTHIER, P.; RIBECCO-LUTKIEWICZ, M.; BANI-YAGHOUB, M. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. **J. Neurosci. Methods**, v. 186, p. 60-67, 2010.

TSOU, K.; BROWN, S.; SANUDO-PENA, M. C.; MACKIE, K.; WALKER, J. M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB_1receptors in the rat central nervous system. **Neuroscience,** v. 83, p. 393-411, 1998.

ULLRICH, O.; MERKER, K.; TIMM, J.; TAUBER, S. Immune control by endocannabinoids - New mechanisms of neuroprotection? **J. Neuroimmunol**., v. 184, p. 127-135, 2007.

VAN DER STELT, M.; DI MARZO, V.. The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. **Eur. J .Pharmacol.,** v. 480, p. 133-150, 2003.

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, 2005a.

VAN DER STELT, M.; DI MARZO, V. Cannabinoid receptors and their role in Neuroprotection. **Neuromol. Med**., v. 7, p. 37-50, 2005b.

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

VAN LAERE, K.; CASTEELS, C.; LUNSKENS, S.; GOFFIN, K.; GRACHEV, I. D.; BORMANS, G.; VANDENBERGHE, W. Regional changes in type 1 cannabinoid receptor availability in Parkinson's disease in vivo. **Neurobiol. Aging,**v. 33, p. 620.e 1-8, 2012.

VAN VLIET, S. A.; VANWERSCH, R. A.; JONGSMA, M. J; OLIVIER, B.; PHILIPPENS, I. H. Therapeutic effects of Delta9-THC and modafinil in a marmoset Parkinson model. **Eur Neuropsychopharmacol.,** v. 18, p. 383-389, 2008.

VAN WAES, V.; BEVERLEY, J. A.; SIMAN, H.; TSENG, K. Y.; STEINER, H. CB_1 Cannabinoid Receptor Expression in the Striatum: Association with Corticostriatal Circuits and Developmental Regulation. **Front. Pharmacol.**, p. 3:21, 2012.

VENDEROVA, K.; BROWN, T. M.; BROTCHIE, J. M. Differential effects of endocannabinoids on [(3)H]-GABA uptake in the rat globus pallidus. **Exp .Neurol.**, v. 194, p. 284-287, 2005.

WALSH, S.; MNICH, K.; MACKIE, K.; GORMAN, A. M.; FINN, D. P.; DOWD, E. Loss of cannabinoid CB_1 receptor expression in the 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal terminal lesion model of Parkinson's disease in the rat. **Brain Res. Bull**., v. 5, p. 543-548, 2010.

WILSON, R. I.; NICOLL, R. A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. **Nature**, v. 410, p. 588-592, 2001.

WINNER, B.; DESPLATS, P.; HAGL, C.; KLUCKEN, J.; AIGNER, R.; PLOETZ, S.; LAEMKE, J.; KARL, A.; AIGNER, L.; MASLIAH, E.; BUERGER, E.; WINKLER, J. Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. **Exp. Neurol.,** v. 219, p. 543-552, 2009.

YUAN, H. H.; CHEN, R. J.; ZHU, Y. H.; PENG, C. L.; ZHU, X. R. The neuroprotective effect of overexpression of calbindin-D(28k) in an animal model of Parkinson's disease. **Mol. Neurobiol,**, v. 47, p. 117-122, 2013.

ZANI, A.; BRAIDA, D.; CAPURRO, V.; SALA, M. Delta9-tetrahydrocannabinol (THC) and AM 404 protect against cerebral ischaemia in gerbils through a mechanism involving cannabinoid and opioid receptors. **Br. J. Pharmacol.,** v. 152, p. 1301-1311, 2007.

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.