

HADASSA BATINGA DA SILVA

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

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

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Andréa da Silva Torrão

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

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

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

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

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

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

1.2 Sistema Endocanabinoide

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

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

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

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

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

É importante ser mencionado que a AEA é capaz de se ligar a vários alvos moleculares que não são acoplados a proteína G, como canais de cátions de membrana. Esses são geralmente modulados por concentrações baixas ou sub-micromolares dos endocanabinoides. Exemplos de canais que são bloqueados quando a AEA se liga a eles: TWIK – canais de K⁺ sensíveis a ácido, canais de K⁺, canais de Ca⁺² tipo T. Por sua vez o receptor vaniloide tipo 1 (VR1 ou TRPV1) – conhecido por ser específico para capsaicina, substância ativa das pimentas – é ativado na presença da AEA (13–15).

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

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

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

Os receptores CB1 também são encontrados em núcleos responsáveis pelo controle da dor, temperatura, ciclo sono-vigília, tronco encefálico e naqueles

relacionados com funções hormonais como hipotálamo, hipófise e várias regiões periféricas (19–23). Os receptores CB1 são encontrados em alta densidade principalmente nas regiões axonais e em terminais nervosos; o mRNA encontrado no corpo celular sugere que eles sejam produzidos no soma e então transportados para os axônios e terminais (18).

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

1.3 Receptor CB1

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

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

Muitos membros da superfamília de receptores acoplados a proteína G contem resíduos de cisteína conservados que ajudam a estabilizar a estrutura

terciária do receptor devido ao seu envolvimento com uma ponte dissulfídica intramolecular; na maioria dos receptores essa ponte acontece nos segundos e terceiros domínios transmembranas extracelulares, também entre o quarto e quinto domínio hidrofóbicos. No entanto, no receptor CB1 nenhuma cisteína foi achada entre as segundas alças extracelulares, mas sim nas terceiras alças extracelulares contendo dois ou mais cisteínas (20).

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

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

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

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

1.4 Via De Sinalização Do Receptor CB1

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

O primeiro relato do início da caracterização da via de sinalização do receptor CB1 começou com Howlett e Fleming (30) descrevendo a inibição que o Δ^8 -Tetrahydrocannabinol e THC exercem sobre a adenilato ciclase demonstrado através de uma curva concentração-resposta bifásica, no qual esse efeito foi bloqueado pela toxina pertussis, indicando que esse efeito foi mediado pela proteína $G_{i/o}$ (20,31).

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

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

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

A estimulação do receptor CB1 *in vitro* e *in vivo* leva a ativação da ERK1/2 em diversos tipos celulares. Para esta ativação outras proteínas precisam ser ativadas e esta ação envolve mecanismos diferentes incluindo a participação da proteína $G_{i/o}$, ativação da fosfatidilinositol 3 cinase (do inglês *phosphatidylinositol 3 kinase* – PI3K), inibição da adenilato ciclase e proteína cinase A (do inglês *protein kinase A* – PKA), e a ativação da Src tirosina cinase FYN (31,34,35). A

ordem e a presença de cada uma delas não se fazem necessariamente presente. Isso vai depender de outros fatores como tipo celular, concentração do ligante e entre outros (31).

Além dessas proteínas, o receptor CB1 modula o metabolismo de esfingolipídio, levando ao aumento dos níveis de ceramida por ativar a hidrólise da esfingomielina ou melhorar a síntese de ceramida – lipídio segundo mensageiro que pode induzir a apoptose e parada do ciclo celular, efeito que não depende do acoplamento do receptor à proteína G, no entanto, parece estar envolvido com o adaptador de proteína FAN (fator associado com ativação neutro da esfingomielinase) (34).

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

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

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

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

1.5 Visão Terapêutica Dos Canabinoides

Estudos farmacológicos ao longo dos últimos anos têm levantado hipóteses baseadas na possibilidade da ação neuroprotetora dos

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

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

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

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

comportamentais (46). Esses dados sugerem que a ação aguda pode ser diferente da ação crônica de concentrações ultra baixas.

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

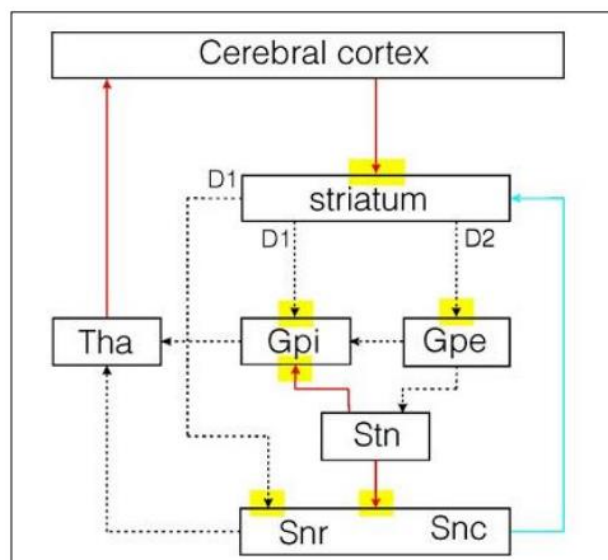
A transmissão dopaminérgica é influenciada pelo sistema endocanabinoide que exerce a função de controlar a liberação de dopamina, embora não tenha sido encontrado nenhuma co-localização ou co-expressão dos receptores CB1 com os neurônios dopaminérgicos, sugerindo assim um controle indireto de sua parte (9,13)

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

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

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

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



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

De acordo com as evidências anteriores, a manipulação do sistema canabinoide nos núcleos da base pode interferir em ambas as direções positivas

e negativas do ponto de vista motor e comportamental. Com isso pode-se levar em consideração que os canabinoides podem regular a liberação de glutamato no estriado e restabelecer a plasticidade sináptica afetada pela desenervação dopaminérgica (54,55).

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

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

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

7 CONCLUSÃO

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

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

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

REFERÊNCIAS¹

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

¹De acordo com:

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

12 MICALE, V. et al. Endocannabinoids and neurodegenerative diseases. **Pharmacological Research: the Official Journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 56, n. 5, p. 382–392, 2007.

13 OHNO-SHOSAKU, T. et al. Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 10, p. 3864–3872, 2002.

14 STELT, M. VAN DER; MARZO, V. Di The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. **European Journal of Pharmacology**, v. 480, n. 1-3, p. 133–150, 2003.

15 KREITZER, A. C AND REGEHR, W. Retrograde signaling by endocannabinoids. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, n. 3, p. 324–330, 2002.

16 ROBBE, D. et al. Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 12, p. 8384–8388, 2002.

17 LISBOA, S. F.; GUIMARÃES, F.S. Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 8, p. 2455–2462, 2012.

18 MACKIE, K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 168, p. 299–325, 2005.

19 MACKIE, K. Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization. **Life Sciences**, v. 77, n. 14, p. 1667–1673, 2005.

20 AMERI, A. The effects of cannabinoids on the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 58, n. 4, p. 315–348, 1999.

21 MATIAS, I. et al. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 8, p. 3171–3180, 2006.

22 BERMÚDEZ-SILVA, F. J. et al. Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. **Diabetologia**, v. 51, n. 3, p. 476–487, 2008.

23 GRANT, I.; CAHN, B. R. Cannabis and endocannabinoid modulators: Therapeutic promises and challenges. **Clinical Neuroscience Research**, v. 5, n. 2-4, p. 185–199, 2005.

- 24 FERNÁNDEZ-RUIZ, J. et al. Role of CB2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 286, n. 1-2 Suppl 1, p. S91–6, 2008.
- 25 ONAIVI, E. S. et al. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 1074, n. 1, p. 514–536, 2006.
- 26 GONG, J. -P. et al. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. **Brain Research**, v. 1071, n. 1, p. 10–23, 2006.
- 27 ROMERO-ZERBO, S. Y.; BERMÚDEZ-SILVA, F. J. Cannabinoids, eating behaviour, and energy homeostasis. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, n. 1-2, p. 52–58, 2014.
- 28 SVÍZENSKÁ, I. et al. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 90, n. 4, p. 501–511, 2008.
- 29 RYBERG, E. et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 7, p. 1092–1101, 2007.
- 30 Howlett, A. C.; Fleming, R. M. Cannabinoid Inhibition of Adenylate Cyclase: Pharmacology of the Response in Neuroblastoma Cell Membranes. **Molecular Pharmacology**, v. 26, p. 532–538, 1984.
- 31 TURU, G.; HUNYADY, L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 44, n. 2, p. 75–85, 2010.
- 32 RHEE, M. H. et al. Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. **Journal of Neurochemistry**, v. 71, n. 4, p. 1525–1534, 1998.
- 33 LAUCKNER, J. E. et al. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 52, p. 19144–19149, 2005.
- 34 GUZMÁN, M. Cannabinoids: potential anticancer agents. **Nature Reviews. Cancer**, v. 3, n. 10, p. 745–755, 2003.
- 35 GALVE-ROPERH, I. et al. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 1385–1392, 2002.

- 36 WAGER-MILLER, J. et al. Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 121, n. 1-2, p. 83–89, 2002.
- 37 STELT, M. VAN DER; DI MARZO, V. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. **Neuromolecular Medicine**, v. 7, n. 1-2, p. 37–50, 2005.
- 38 FOWLER, C. J. et al. Modulation of the endocannabinoid system: Neuroprotection or neurotoxicity ? **Experimental Neurology**, v. 224, n. 1, p. 37–47, 2010.
- 39 ALBAYRAM, O. et al. Role of CB1 cannabinoid receptors on GABAergic neurons in brain aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 27, p. 11256–11261, 2011.
- 40 SAGREDO, O. et al. Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. **Molecular Neurobiology**, v. 36, n. 1, p. 82–91, 2007.
- 41 HAMPSON, A. J. H. et al. Cannabidiol and (-)-delta 9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. **Medical Sciences**, v. 95, n. July, p. 8268–8273, 1998.
- 42 GARCÍA-ARENCIBIA, M.; et al. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. **Brain Research**, v. 1134, n. 1, p. 162–170, 2007.
- 43 LITTLE, J. P. et al. Therapeutic potential of cannabinoids in the treatment of neuroinflammation associated with Parkinson's disease. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 7, p. 582–590, 2011.
- 44 CHUNG, E. S. et al. Cannabinoids prevent lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat substantia nigra in vivo through inhibition of microglial activation and NADPH oxidase. **Brain research**, v. 1451, p. 110–116, 2012.
- 45 CLARKE, J R. et al. Posttraining activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs object recognition long-term memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, n. 2, p. 374–381, 2008.
- 46 SARNE, Y. et al. The dual neuroprotective-neurotoxic profile of cannabinoid drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1391–401, 2011.
- 47 SARKER, K. P.; MARUYAMA, I. Anandamide induces cell death independently of cannabinoid receptors or vanilloid receptor 1: possible involvement of lipid rafts. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 6, p. 1200–1208, 2003.

48 SHEN, M. et al. Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 14, p. 4322–4334, 1996.

49 KELLEY, B. G.; THAYER, S. A. Anandamide transport inhibitor AM404 and structurally related compounds inhibit synaptic transmission between rat hippocampal neurons in culture independent of cannabinoid CB1 receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 496, n. 1-3, p. 33–39, 2004.

50 ROSSI, S. et al. Cannabinoid CB1 receptors regulate neuronal TNF- α effects in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 6, p. 1242–1248, 2011.

51 HU, H. et al. Brain CB₁ receptor expression following lipopolysaccharide-induced inflammation. **Neuroscience**, v. 227, p. 211–222, 2012.

52 PISANI, V. et al. Dynamic changes of anandamide in the cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients. **Movement Disorders : official Journal of the Movement Disorder Society**, v. 25, n. 7, p. 920–4, 2010.

53 BROTCHE, J. CB cannabinoid receptor signalling in Parkinson's disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 54–61, 2003.

54 MORERA-HERRERAS, T. et al. Endocannabinoid modulation of dopaminergic motor circuits. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, p. 110, 2012.

55 Chaves-Kirsten, G.P. **O receptor canabinóide CB 1 nos núcleos da base e a sua participação no processo degenerativo em modelos da Doença de Parkinson.** 2013. 163f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

56 JEON, P. et al. Cannabinoid receptor agonist protects cultured dopaminergic neurons from the death by the proteasomal dysfunction. **Anatomy & Cell Biology**, v. 44, n. 2, p. 135–142, 2011.

57 MNICH, K. et al. Inhibition by anandamide of 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 8184-8197, 2010.

58 KULICH, S. M.; CHU, C. T. Role of reactive oxygen species in extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation and 6-hydroxydopamine cytotoxicity. **Journal of Biosciences**, v. 28, n. 1, p. 83–89, 2003.

59 KULICH, S. M. et al. 6-Hydroxydopamine induces mitochondrial ERK activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, n. 3, p. 372–383, 2007.

60 KULICH, S. M.; CHU, C. T. Sustained extracellular signal-regulated kinase activation by 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 77, n. 4, p. 1058–1066, 2001.

61 MACHADO, A. et al. Peripheral inflammation increases the damage in animal models of nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration: possible implication in Parkinson's disease incidence. **Parkinson's disease**, v. 2011, p. 3937-3969, 2011.

62 OLMSTED, J. B. et al. Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 65, n. 1, p. 129–136, 1970.

63 RIOS, C. et al. Mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuriteogenesis. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 4, p. 387–395, 2006.

64 CALDERÓN, F. H. et al. PC12 and Neuro 2a Cells Have Different Susceptibilities to Acetylcholinesterase – Amyloid Complexes, Amyloid25–35 Fragment, Glutamate, and Hydrogen Peroxide. **Journal of Neuroscience research**, v. 56, p. 620–631, 1999.

65 JORDAN, J. D. et al. Cannabinoid receptor-induced neurite outgrowth is mediated by Rap1 activation through G(alpha)o/i-triggered proteasomal degradation of Rap1GAPII. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 12, p. 11413–11421, 2005.

66 TREMBLAY, R. G. et al. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 186, n. 1, p. 60–67, 2010.

67 AUAD, L. G. **A metanandamida , um agonista canabinóide , protege a linhagem de neuroblastoma neuro2a**. 2012. 25f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

68 LASTRES-BECKER, I. et al. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: Relevance to Parkinson ' s disease. **Neurobiology of Disease**, v. 19, p. 96 – 107, 2005.

69 LINDEGREN, H. et al. Loss of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in scrapie-infected N2a cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 71, n. 2, p. 291–299, 2003.

70 DOWNER, E. J.; FOGARTY, M. P.; et al. Tetrahydrocannabinol-induced neurotoxicity depends on CB1 receptor-mediated c-Jun N-terminal kinase activation in cultured cortical neurons. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 3, p. 547–57, 2003.

71 OWUSU-ANSAH, E.; YAVARI, A.; BANERJEE, U. A protocol for in vivo detection of reactive oxygen species. **Nature Protocol Exchange**, 2008. Disponível em: <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/414>. Acesso em: 15 Out. 2014.

72 CAI, H. et al. Vascular Biology Protocols. In: N Sreejayan, J Ren (Ed.); **Methods in Molecular Medicine**. Totowa, NJ: Humana Press Inc, v.000.2007, p. 293 – 311.

73 PERTWEE, R. G. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. **Life Sciences**, v. 76, n. 12, p. 1307–1324, 2005.

74 GRUNDY, R.I. et al. Cannabinoids and neuroprotection. **Molecular Neurobiology**, v. 24, n. 1-3, p. 29–51, 2001.

75 MARSICANO, G. et al. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, n. 3, p. 448–456, 2002.

76 OKADA, M. et al. The facilitating and suppressing effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on the rise in intrasynaptosomal Ca²⁺ concentration in rats. **Neuroscience Letters**, v. 140, n. 1, p. 55–58, 1992.

77 RUBOVITCH, V. et al. The cannabinoid agonist DALN positively modulates L-type voltage-dependent calcium-channels in N18TG2 neuroblastoma cells. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 101, n. 1-2, p. 93–102, 2002.

78 LUNDIUS, E.G. et al. Functional GPR37 trafficking protects against toxicity induced by 6-OHDA, MPP⁺ or rotenone in a catecholaminergic cell line. **Journal of Neurochemistry**, v. 124, n. 3, p. 410–7, 2013.

79 HARATO, M. et al. Bupivacaine-induced apoptosis independently of WDR35 expression in mouse neuroblastoma Neuro2a cells. **BMC Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 149 - 150, 2012.

80 WHITTON, P.S. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 8, p. 963–976, 2007.

81 FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. A Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Parkinson's Disease**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

82 HA, K.-S. et al. Nitric oxide prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells through cGMP-dependent PI3 kinase/Akt activation. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 9, p. 1036–1047, 2003.

83 LATCHOUMYCANDANE, C. et al. Dopaminergic neurotoxicant 6-OHDA induces oxidative damage through proteolytic activation of PKC δ in cell culture and animal models of Parkinson's disease. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 256, n. 3, p. 314 - 323, 2011.

84 KANTHASAMY, A. et al. Novel cell death signaling pathways in neurotoxicity models of dopaminergic degeneration: relevance to oxidative stress and neuroinflammation in Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v. 31, n. 5, p. 555–561, 2010.

85 TUFEKCI, K. U.; GENÇ, S.; GENÇ, K. The endotoxin-induced neuroinflammation model of Parkinson's disease. **Parkinson's Disease**, v. 2011, Article ID 487450, p. 1 - 25, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

98 BAKER, C. L.; MCDUGALL, J. J. The cannabinomimetic arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA) acts on capsaicin-sensitive TRPV1 receptors but not cannabinoid receptors in rat joints. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 8, p. 1361–1367, 2004.

99 GULLAPALLI, S. et al. Characterization of active and inactive states of CB1 receptor and the differential binding state modulation by cannabinoid agonists, antagonists and inverse agonists. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 8, p. 1215–1219, 2010.

100 PRICE, M. R. et al. Allosteric Modulation of the Cannabinoid CB 1 Receptor. **Molecular Neurodegeneration**, v. 68, n. 5, p. 1484–1495, 2005.

101 GATLEYL, S. J. et al. Binding of the non-classical cannabinoid CP 55,940, and the diarylpyrazole AM251 to rodent brain cannabinoid receptors. **Pharmacology Letters**, v. 61, n. 14, p. 191–197, 1997.

102 BAUR, R.; GERTSCH, J.; SIGEL, E. The cannabinoid CB1 receptor antagonists rimonabant (SR141716) and AM251 directly potentiate GABA(A) receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 8, p. 2479–2484, 2012.

103 DAVIS, M. I.; RONESI, J.; LOVINGER, D. M. A predominant role for inhibition of the adenylate cyclase/protein kinase A pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 49, p. 48973–48980, 2003.

104 ASIMAKI, O.; MANGOURA, D. Cannabinoid receptor 1 induces a biphasic ERK activation via multiprotein signaling complex formation of proximal kinases PKC ϵ , Src, and Fyn in primary neurons. **Neurochemistry International**, v. 58, n. 2, p. 135–144, 2011.

- 105 CHEN, J.; ERRICO, S. L.; FREED, W. J. Reactive oxygen species and p38 phosphorylation regulate the protective effect of 9 -tetrahydrocannabinol in the apoptotic response to NMDA. **Neuroscience Letters**, v. 389, n. 2, p. 99–103, 2005.
- 106 SCOTTER, E., GRAHAM, S., GLASS, M. The Cannabinoid Receptors. In: PH Reggio (Ed.); **The Cannabinoid Receptors**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009, p. 153–171.
- 107 IBRAHIM, B. M.; ABDEL-RAHMAN, A. A Differential modulation of brainstem phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling underlies WIN55,212-2 centrally mediated pressor response in conscious rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 340, n. 1, p. 11–18, 2012.
- 108 BOUABOULA, M. et al. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. **The Biochemical Journal**, v. 312, p. 637– 641, 1995.
- 109 HOU, R. C. -W. et al. Effect of sesame antioxidants on LPS-induced NO production by BV2 microglial cells. **Neuroreport**, v. 14, n. 14, p. 1815–9, 2003.
- 110 CUNNINGHAM, K. A.; CHAPMAN, N. M.; CARSON, S. D. Caspase-3 activation and ERK phosphorylation during CVB3 infection of cells: influence of the coxsackievirus and adenovirus receptor and engineered variants. **Virus Research**, v. 92, n. 2, p. 179–186, 2003.
- 111 TRAN, S. E. et al. MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 16484–16490, 2001.

