

TALITA APARECIDA DE MORAES VRECHI

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

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

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Andréa da Silva
Torrão

Versão original

São Paulo
2016

RESUMO

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

A neurodegeneração é o resultado da destruição progressiva e irreversível dos neurônios no sistema nervoso central, apresentando causas desconhecidas e mecanismos patológicos não totalmente elucidados. Fatores como a idade, o aumento da formação de radicais livres e/ou estresse oxidativo, defeito no metabolismo energético, a inflamação e acúmulo de elementos neurotóxicos e de proteínas malformadas no lúmen do retículo endoplasmático (RE) contribuem para o desenvolvimento dos processos neurodegenerativos. O sistema canabinoide tem sido proposto como neuroprotetor em diversos modelos de neurodegeneração como hipóxia aguda e epilepsia, isquemia cerebral, lesão cerebral e modelos de estresse oxidativo. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar o papel do sistema canabinoide em uma linhagem de neuroblastoma (Neuro 2a) submetida a condições de estresse oxidativo (H_2O_2), inflamação (LPS) e estresse do RE (tunicamicina), avaliando parâmetros de viabilidade celular e vias de sinalização envolvidas. Nossos resultados mostram que o agonista canabinoide ACEA foi capaz de proteger as células da morte celular causada pela inflamação e pelo estresse de retículo endoplasmático, mas não pelo estresse oxidativo. Esse efeito neuroprotetor exercido pelo ACEA parece pelo menos em parte ocorrer via receptor CB1 no modelo de inflamação e ser independente deste receptor no modelo de estresse de RE. Os efeitos neuroprotectores observados envolveram a modulação dos níveis de proteínas pré-apoptóticas, CHOP e Caspase 12, e da proteína relacionada à sobrevivência celular ERK 1/2. Nossos dados sugerem um papel neuroprotetor do sistema canabinoide em mecanismos relacionados aos processos neurodegenerativos e propõem a manipulação desse sistema como possível alvo terapêutico.

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

ABSTRACT

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

Neurodegeneration is the result of progressive and irreversible destruction of neurons in the central nervous system, with unknown causes and pathological mechanisms not fully elucidated. Factors such as age, increased formation of free radicals and/or oxidative stress, defects in energetic metabolism, inflammation and accumulation of neurotoxic factors and misfolded proteins in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) contribute to the development of neurodegenerative processes. The cannabinoid system has been proposed as neuroprotector in several models of neurodegeneration such as acute hypoxia and epilepsy, cerebral ischaemia, brain injury and oxidative stress models. This work aimed to investigate the role of the cannabinoid system in a neuroblastoma line (Neuro 2a) submitted to oxidative stress (H_2O_2), inflammation (LPS) and ER stress (tunicamycin) conditions, assessing cell viability parameters and signaling pathways involved. Our results show that the ACEA cannabinoid agonist was able to protect cells from cell death caused by inflammation and ER stress, but not from oxidative stress. This neuroprotective effect exerted by ACEA appears to occur at least in part via the CB1 receptor in inflammation model and it seems to be independent of this receptor in the ER stress model. The neuroprotective effects observed involved the modulation of the levels of pre-apoptotic proteins CHOP and Caspase 12 and the cell survival related protein ERK 1/2. Our data suggest a neuroprotective role of the cannabinoid system in mechanisms related to neurodegenerative processes and propose it as possible therapeutic target.

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

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

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

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

1.2 Doenças Neurodegenerativas

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

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

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

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

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

1.3 Estresse oxidativo e morte celular

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

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

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

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

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

1.4 Neuroinflamação

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

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

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

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

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

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

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

1.5 Estresse de Retículo Endoplasmático

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

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

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

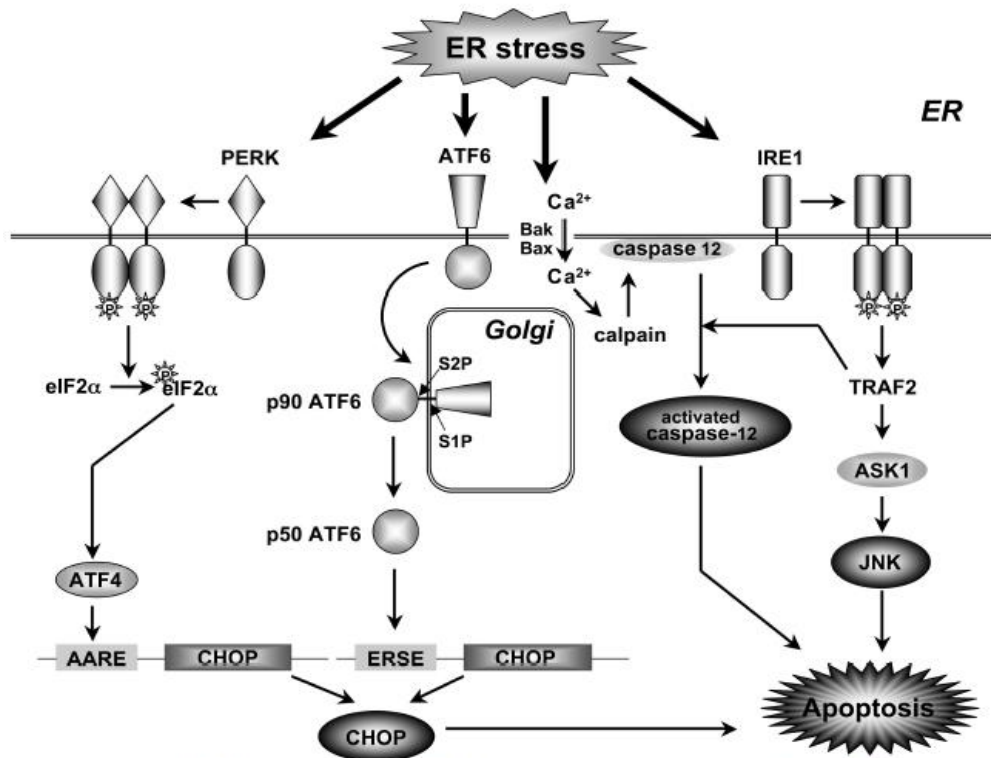
A homeostase do RE é monitorada e mantida através de um programa coordenado chamado de resposta a proteínas malformadas (UPR - *unfolded protein response*), que pode ser ativada em resposta a uma perturbação da homeostase do cálcio, a neuroinflamação, ao estresse oxidativo, a hipóxia ou a privação de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

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

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

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

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



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

1.6 Sistema Canabinoide

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

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

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

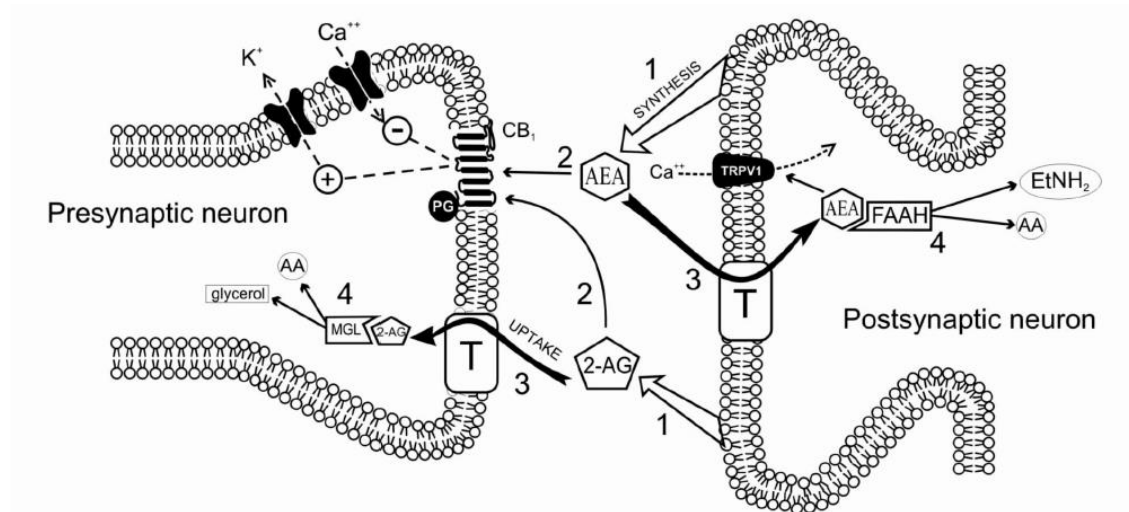
Além disso, há evidências que sugerem a existência de outros alvos da ação dos canabinoides além dos receptores anteriormente citados, como por exemplo, a anandamida também pode se ligar aos receptores vaniloides de potencial transiente do tipo 1 (TRPV1) e ao TASK-1 (canal de potássio) (DI MARZO; MATIAS,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

1.6.1 Mecanismo de ação do sistema canabinoide

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

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

Figura 2 - Mecanismo de ação dos endocanabinoides.



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

1.6.2 Sistema canabinoide e neuroproteção

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

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

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

CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- SUBRAMARIAM, S.; UNSICKER, K. ERK and cell death: ERK 1/2 in neuronal death. *FEBS J.*, v. 277, p. 22-29, 2010.
- TAKATSUKI, A.; KAWAMURA, K.; OKINA, M.; KODAMA, Y.; ITO, T.; TAMURA, G. The structure of tunicamycin. *Agric. Biol. Chem.*, v. 41, p- 2307-2309, 1977.
- THOMAS, P. J.; QU, B. H.; PEDERSEN, P. L. Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.*, v. 20, p. 456-459, 1995.
- TORRÃO, A. S.; CAFÉ-MENDES, C. C.; REAL, C. C.; HERNANDES, M. S.; FERREIRA, A. F. B.; SANTOS, T. O.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; MAZUCANTI, C. H. Y.; FERRO, E. S.; SCAVONE, C.; BRITTO, L. R. G. Different Approaches, One Target: Understanding Cellular Mechanisms of Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Ver. Bras. Psiquiatr.*, v. 34, p. 194-218, 2012.
- TURU, G.; HUNYADY, L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Mol. Endocr.*, v. 44, n.2, p. 75-85, 2010.
- TYAGI, E.; AGRAWAL, R.; NATH, C.; SHUKLA R. Influence of LPS-induced neuroinflammation on acetylcholinesterase activity in rat brain. *J. Neuroimmunol.*, v. 205, p. 51-56, 2008.
- VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZU. M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Inter.*, v. 160, p. 1-40, 2006.
- VANDENABEELE, P.; FIERS, W. Is amyloidogenesis during Alzheimer's disease due to an IL-1-/IL-6-mediated 'acute phase response' in the brain? *Immunol. Today.* v.12, p. 217-219; 1991.
- VAN DER STELT, M.; DI MARZO, V. Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. *Prostaglan. Other Lipid Mediat.*, v. 77, p. 111-122, 2005.
- VAN DER STELT, M.; DI MARZO, V. Endovanilloids. *Eur. J. Biochem.*, v. 271, p. 1827-1834, 2004.
- VAN DER STELT, M.; VELDHUIS, W. B.; BAR, P. R.; VELDINK, G. A.; VLIEGENTHART, J. F.; NICOLAY, K. Neuroprotection by D9-tetrahydrocannabinol, the main compound in marijuana, against oabain-induced in vivo excitotoxicity. *J. Neurosci.*, v. 21, p. 6475-6579, 2001.
- WANG, X.; FAN, Z.; WANG, B.; LUO, J.; ZUN-LI, K. Activation of double-stranded RNA-activated protein kinase by mild impairment of oxidative metabolism in neurons. *Journ. Neurochem.*, v. 103, p. 2380-2390, 2007.

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

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

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

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

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

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

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

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