

**LUCIANA GONZALEZ AUAD**

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

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

Área de Concentração: Fisiologia  
Humana

Orientadora: Profa. Dra. Andréa da  
Silva Torrão

Versão Original

São Paulo  
2012

## RESUMO

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

As doenças neurodegenerativas são desordens progressivas que afetam determinadas populações neuronais do sistema nervoso central, levando a morte neuronal e a ruptura de circuitos neurais. Fatores genéticos, ambientais e a idade contribuem para o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas. Além destes também são apontados como fatores de risco, deficiências de fatores neurotróficos, defeito mitocondrial, acúmulo de elementos neurotóxicos, aumento da formação de radicais livres e/ou estresse oxidativo, defeito no metabolismo energético e defeitos genéticos. O sistema canabinóide vem sendo sugerido como um importante sistema neuroprotetor em diversos modelos de neurodegeneração como, hipóxia aguda e epilepsia, isquemia cerebral, lesão cerebral, excitotoxicidade e modelos de estresses oxidativos. Uma vez que o encéfalo é especialmente vulnerável a danos dos radicais livres, o seu envelhecimento parece estar intimamente associado aos efeitos das ROS. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a participação do sistema canabinóide em um modelo de morte celular *in vitro* induzida pelo peróxido de hidrogênio. O modelo celular utilizado foi a linhagem Neuro 2A. Iniciamos com as padronizações de tempo e curva concentração-resposta do peróxido de hidrogênio e dos agentes canabinóides. Posteriormente realizamos os tratamentos conjugados para verificar a possível função neuroprotetora do sistema canabinóide. Obtivemos resultados de neuroproteção da Metanandamida revertendo o quadro de morte celular induzido pelo peróxido de hidrogênio. Acreditamos que esta neuroproteção seja via CB<sub>1</sub> que inibe os canais de cálcio dependentes de voltagem talvez contribuindo para a redução da progressão da excitotoxicidade. Além disso, um dos mecanismos neuroprotetores do sistema canabinóide comumente proposto é a inibição da liberação de glutamato mediada pelo receptor CB<sub>1</sub>.

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

## ABSTRACT

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

Neurodegenerative diseases are progressive disorder affecting specific neuronal populations in the central nervous system, leading to neuronal death and disruption of neural circuits. Genetic, environmental and age contribute to the development of neurodegenerative diseases. In addition to these are also identified as risk factors, neurotrophic factor deficiencies, defective mitochondrial accumulation of neurotoxic elements, increased formation of free radicals and / or oxidative stress, defects in energy metabolism and genetic defects. The cannabinoid system has been suggested as an important system neuroprotective in several models of neurodegeneration such as acute hypoxia and epilepsy, cerebral ischemia, brain injury, excitotoxicity and oxidative stress models. Once the brain is especially vulnerable to free radical damage, its aging seems to be closely associated with the effects of ROS. The objectives of this study were to evaluate the participation cannabinoid system in a model of in vitro cell death induced by hydrogen peroxide. The model used was the cell line neuro 2A. We begin with the standardization of time and concentration-response curve of hydrogen peroxide and cannabinoid agents. Later we performed the treatments combined to verify the possible neuroprotective effects of the cannabinoid system. We obtained results of neuroprotection methanandamide reversing the framework of cell death induced by hydrogen peroxide. We believe that this is via neuroprotection CB<sub>1</sub> that inhibits calcium channels of voltage-dependent perhaps contributing to the reduction of the progression of excitotoxicity. Furthermore, one of the neuroprotective mechanisms commonly proposed system is the cannabinoid inhibits the release of glutamate mediated by the CB<sub>1</sub> receptor.

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

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 ASPECTOS GERAIS**

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

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

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

## **1.2 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

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

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

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

### **1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DEFESAS ANTIOXIDANTES**

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

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

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

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

### *1.3.1 ESTRESSE OXIDATIVO E MORTE CELULAR*

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

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

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

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

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

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

## **1.4 SISTEMA CANABINÓIDE**

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

### **1.4.1 CANABINÓIDES ENDÓGENOS E RECEPTORES**

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

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

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

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

Os efeitos dos canabinóides dependem em grande parte dos receptores canabinóides (CB) nomeados CB<sub>1</sub> (MATSUDA et al., 1990) e CB<sub>2</sub> (MUNRO et al., 1993). Esses receptores apresentam estrutura protéica de sete alças transmembrânicas e agem através de vias de transdução envolvendo a proteína G<sub>i/o</sub> da superfamília das proteínas G, que diminui a atividade da adenililciclase resultando na redução dos níveis intracelulares de AMPc (FELDER et al., 1993; VOGEL et al., 1993). A ativação dos receptores CB<sub>1</sub> ainda pode aumentar a condutância ao K<sup>+</sup> por interferir em canais de K<sup>+</sup> do tipo A (HENRY; CHAVKIN, 1995) ou inibir diretamente a condutância ao Ca<sup>2+</sup> através de canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo N (MACKIE; HILLE, 1992).

Os receptores canabinóides do tipo CB<sub>1</sub> estão entre os receptores mais abundantes no sistema nervoso e a sua distribuição foi bem caracterizada no encéfalo de ratos e humanos. Em estudo com métodos de auto-radiografia, hibridização *in situ* e imuno-histoquímica, as maiores densidades foram encontradas nos gânglios da base (substância negra, globo pálido, núcleo entopeduncular e estriado lateral) e no cerebelo. Altas densidades também foram encontradas nas células piramidais do hipocampo, no giro denteado e nas camadas I e IV do córtex e densidades intermediárias no núcleo acumbens (AMERI, 1999). Também foram descritas populações de CB<sub>1</sub> em astrócitos perivasculares (GLASS et al., 1997; HERKENHAM et al., 1991).

Os receptores canabinóides do tipo CB<sub>2</sub> foram primeiramente relacionados ao sistema imune (PAZOS et al., 2004). No sistema nervoso apresentam um aumento de sua expressão em microglia e astrócitos ativados em situações patológicas, participando do controle de produção local de mediadores inflamatórios, reduzindo os processos neuroinflamatórios. Assim, esses receptores participam de maneira importante de mecanismos que favorecem a sobrevivência neuronal (EHRHART et al., 2005; FERNANDEZ-RUIZ et al., 2000). Esses mecanismos

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

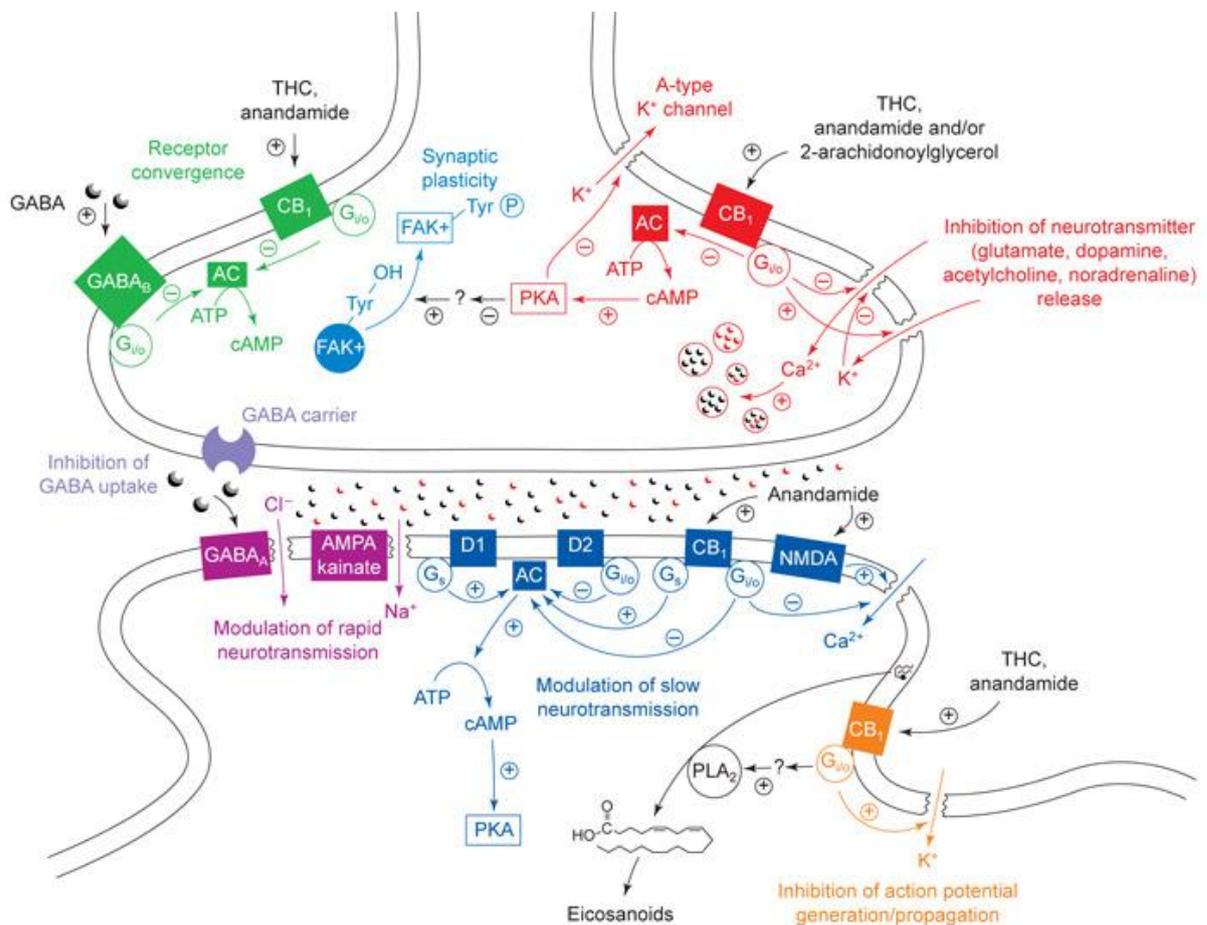
Outros estudos mostram que o endocanabinóide anandamida, além de ligar a receptores canabinóides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, também se liga a outros receptores como VR1 (receptor vanilóide 1), TASK-1 (canal de potássio) e outros receptores não canabinóides acoplados à proteína G ainda não identificados (LUTZ, 2002; ROSS, 2003; SZALLASI; DI MARZO, 2000; VAN DER STELT; DI MARZO, 2005).

#### 1.4.2 MECANISMOS DE AÇÃO DO SISTEMA CANABINÓIDE

Após uma estimulação, os endocanabinóides são liberados por neurônios pós-sinápticos e agem no receptor CB<sub>1</sub> de neurônios pré-sinápticos. Essa ligação desencadeia uma redução da liberação de outros neurotransmissores, como o GABA e o glutamato. Para inativar os endocanabinóides existe uma molécula transportadora de membrana, o transportador de anandamida da membrana celular (AMT), que os leva para dentro das células para que ocorra a degradação enzimática intracelular pela enzima ácido graxo amina hidroxilase (FAAH). O 2-AG também é captado pelo AMT e sofre degradação enzimática intracelular pela monoacilglicerol lipase (MAGL) ou pela FAAH (BASAVARAJAPPA, 2007; FREUND et al., 2003; FRIDE, 2002; HASHIMOTODANI et al., 2007).

Ao se ligarem aos receptores CB<sub>1</sub>, os canabinóides endógenos desencadeiam uma série de mecanismos intracelulares característicos dos receptores acoplados à proteína G<sub>i/o</sub>. A maioria dos autores descreve três eventos importantes (1) inibição da adenililciclase, levando a uma diminuição dos níveis de AMP<sub>c</sub> intracelular e de proteínas quinases A; (2) estimulação de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP quinase); (3) inibição de canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem do tipo N e P/Q e estimulação de canais de K<sup>+</sup> tipo A resultando em uma diminuição do influxo de cálcio e aumento do efluxo de potássio. As ações dos endocanabinóides nessas vias de sinalização provavelmente contribuem para uma redução na liberação de neurotransmissores em geral (DE PETROCELLIS et al., 2004; DI MARZO et al., 1998; LUTZ, 2002). (**Figura 1**)

**Figura 1 - Bases moleculares da ação neuromoduladora dos endocanabinóides**



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

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

### 1.4.3 SISTEMA CANABINÓIDE, NEUROPROTEÇÃO E NEURODEGENERAÇÃO

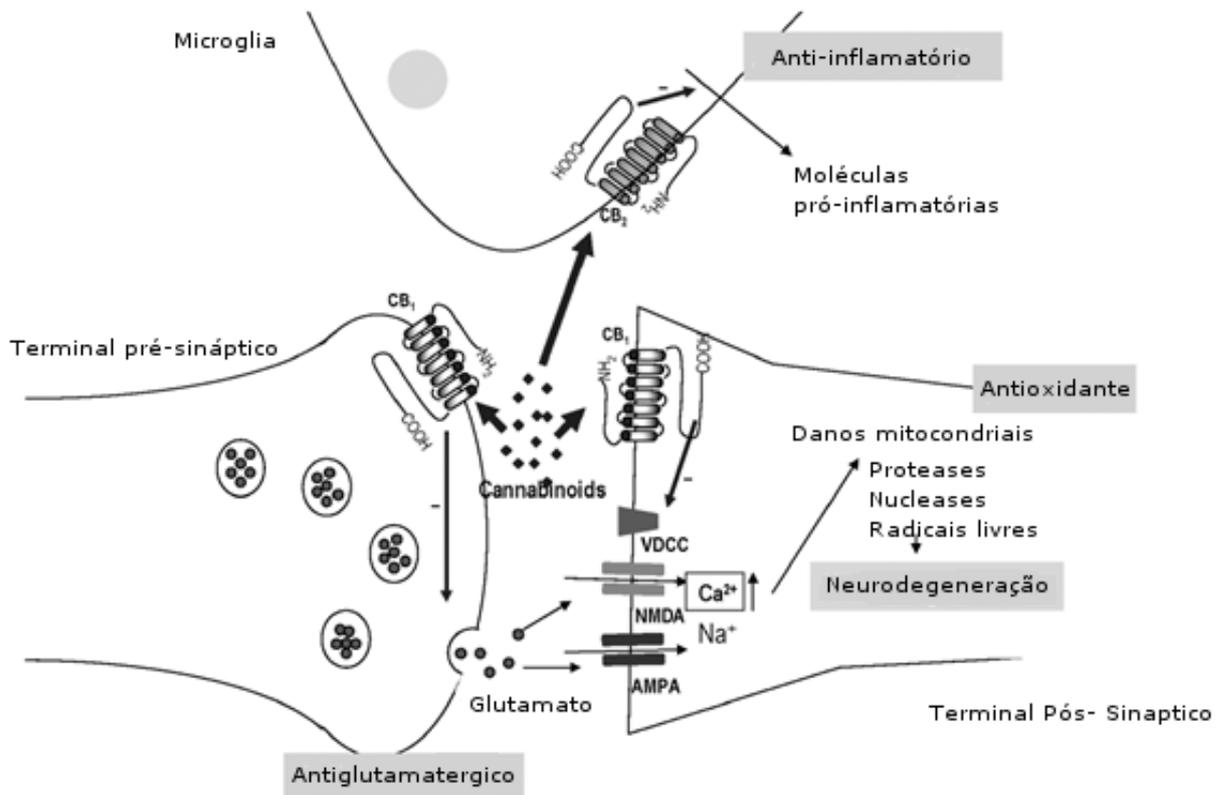
O sistema canabinóide vem sendo sugerido como um importante sistema neuroprotetor em diversos modelos de neurodegeneração (SHEN e THAYER, 1999) como, hipóxia aguda e epilepsia (WALLACE et al., 2003), isquemia cerebral (NAGAYAMA et al., 1999), lesão cerebral (PANIKASHVILI et al., 2001), excitotoxicidade (MARSICANO et al., 2003; VELDHUIS et al., 2003) e modelos de estresses oxidativos (MARSICANO et al., 2003). Alguns destes estudos têm mostrado tanto níveis elevados de endocanabinóides como aumento de expressão dos receptores CB<sub>1</sub> em modelos de lesões centrais em ratos e camundongos (HANSEN et al., 2001; PANIKASHVILI et al., 2001; VAN DER STELT et al., 2001). Por exemplo, Panikashvili et al. (2001) descrevem um possível envolvimento do endocanabinóide 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) na neuroproteção em estudos com camundongos, uma vez que os níveis desse endocanabinóide apresentam-se aumentados significativamente após lesão no encéfalo. Em alguns estudos os efeitos de neuroproteção foram atenuados pelo SR141716A, um antagonista do receptor CB<sub>1</sub>, onde o efeito protetor parece estar relacionado com a inibição da liberação sináptica de glutamato, sugerindo a participação do receptor canabinóide nesse processo (JACKSON et al., 2005; PARMENTIER-BATTEUR et al., 2002; VAN DER STELT et al., 2002). O envolvimento dos receptores CB<sub>1</sub> e seus ligantes endógenos na neuroproteção também tem sido demonstrado em estudos com camundongos *knock-out* para o receptor CB<sub>1</sub>, que apresentam maior susceptibilidade à neurodegeneração (MARSICANO et al., 2003; PARMENTIER-BATTEUR et al., 2002). Além disso, o mecanismo neuroprotetor dos canabinóides envolve a regulação da atividade de fatores de transcrição relacionados às citocinas (MOLINA-HOLGADO et al., 2007). Alguns estudos também têm investigado o papel neuroprotetor dos canabinóides em modelos *in vitro* (BOBROV et al., 2008; CHEN et al., 2005; GILBERT et al., 2007; KARANIAN et al., 2005; KIM et al., 2005; MARSICANO et al., 2002; ZHUANG et al., 2005), mas os resultados são conflitantes. Por exemplo, Jackson et al. (2004) investigaram o possível papel neuroprotetor do sistema canabinóide em culturas de células do telencéfalo de camundongos *knock-out* para o receptor CB<sub>1</sub>, submetidas ao tratamento agudo com citocinas e observaram que essas células são mais susceptíveis à morte celular por apoptose. Outro estudo realizado com culturas de células de hipocampo de ratos submetidas à

toxicidade por AMPA mostra que a inibição do transporte e da degradação dos endocanabinóides, parece proteger as células e que esse efeito neuroprotetor é via receptor CB<sub>1</sub> que por sua vez mobiliza fatores neurotróficos responsáveis pela manutenção sináptica e sobrevivência celular (KARANIAN et al., 2005). Por outro lado, outro estudo mostra um efeito apoptótico do THC em cultura de córtex de ratos, onde parece haver um bloqueio do ciclo celular (DOWNER et al., 2003).

Muitos desses estudos atribuem os efeitos neuroprotetores dos canabinóides em modelos *in vitro* aos mecanismos dependentes dos receptores CB<sub>1</sub> relacionados à interação com a proteína quinase A (KIM et al., 2005) que pode resultar numa redução ou bloqueio da liberação do cálcio intracelular em condições neurotóxicas (ZHUANG et al., 2005). Guo e Ikeda em 2004 sugerem que a ativação dos receptores CB<sub>1</sub> inibe os canais de cálcio dependentes de voltagem talvez contribuindo para a redução da progressão da excitotoxicidade. Além disso, um dos mecanismos neuroprotetores do sistema canabinóide comumente proposto é a inibição da liberação de glutamato mediada pelo receptor CB<sub>1</sub> (JACKSON et al., 2005; TAKAHASHI; CASTILLO, 2006) possivelmente via mecanismo retrógrado (BREIVOGEL et al., 2004).

Os mecanismos moleculares subjacentes às propriedades neuroprotetoras dos canabinóides são bastante diversos e, freqüentemente, complementares. Estes incluem alguns eventos não mediados por receptores de canabinóides (antagonismo de receptores NMDA, propriedades antioxidantes) e outras, que são definitivamente mediadas tanto por receptor CB<sub>1</sub> como por CB<sub>2</sub>, incluindo a sua capacidade para: (a) modular, via receptores CB<sub>1</sub> pré-sinápticos, as transmissões excitatórias glutamatérgicas e a plasticidade sináptica; (b) estimular a ação do GABA; (c) modular as respostas imunes e a libertação de mediadores inflamatórios via receptores CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> e não CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>, localizados nos neurônios, astrócitos, microglia, macrófagos, neutrófilos e linfócitos; (d) ativar de vias de sinalização citoprotetoras; (e) modular a excitabilidade e a homeostase do Ca<sup>2+</sup>, através de ações sobre os canais do Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>, e receptores NMDA e; (f) melhorar o suprimento sanguíneo ao cérebro lesionado (DE LAGO et al., 2007) (**Figura 2**).

**Figura 2 – Mecanismos Neuronal e Gliais da Neuroproteção dos Canabinóides**



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

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

## 6 CONCLUSÕES

Com este estudo podemos concluir que a metanandamida, um agonista do sistema canabinóide, reduziu a morte celular da linhagem Neuro 2A induzida pelo estresse oxidativo. Este efeito protetor parece ser pelo menos em parte via receptores CB<sub>1</sub> expressos na linhagem Neuro 2A. O modelo *in vitro* utilizado em nossos estudos parece ser útil tanto para a avaliação de mecanismos relacionados aos processos neurodegenerativos, como para o entendimento da participação do sistema canabinóide nesses processos.

## REFERÊNCIAS\*

- AKSENOV, M. Y. et al. The expression of key oxidative stresshandling genes in different brain regions in Alzheimer's disease. **J. Mol. Neurosci.**, v. 11, p. 151-164, 1998.
- AMERI, A. The effects of cannabinoids on the brain. **Prog. Neurobiol.**, v. 58, p. 315-348, 1999.
- ARENDS, M. J.; MORRIS, R. G.; WYLLIE, A. H. Apoptosis: the role of the endonuclease. **Am. J. Pathol.**, v. 136, p. 593-608, 1990.
- ASHTON, C. H.; MOORE, P. B.; GALLAGHER, P.; YOUNG, A. H. Cannabinoids in bipolar affective disorder: a review and discussion of their therapeutic potential. **J. Psychopharmacol.**, v. 19, p. 293-300, 2005.
- BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. I. **DNA Repair**. Elsevier, v.3, p. 1109, 2004.
- BASAVARAJAPPA, B. S. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. Protein. **Pept. Lett.**, v. 14, p. 237-246, 2007.
- BERRA, C.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse Oxidativo, Lesões no Genoma e Processos de Sinalização no Controle do Ciclo Celular. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.
- BOBROV, M. Y.; LIZHIN, A. A.; ANDRIANOVA, E. L.; GRETSKAYA, N. M.; FRUMKINA, L. E.; KHASPEKOV, L. G.; BEZUGLOV, V. V. Antioxidant and neuroprotective properties of N-arachidonoyldopamine. **Neurosci. Lett.**, v. 24, p. 6-11, 2008.
- BREIVOGEL, C. S.; WALKER, J. M.; HUANG, S. M.; ROY, M. B.; CHILDERS, S. R. Cannabinoid signaling in rat cerebellar granule cells: G-protein activation, inhibition of glutamate release and endogenous cannabinoids. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 81-91, 2004.
- BRITTO, L. R.; TORRÃO, A. S.; HAMASSAKI-BRITTO, D. E.; MPODOZIS, J.; KEYSER, K. T.; LINDSTROM, J. M.; KARTEN, H. J. Effects of retinal lesions upon the distribution of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the chick visual system. **J. Comp. Neurol.**, v. 15, p. 473-484, 1994.
- CALDERÓN, F. H.; BONNEFONT, A.; MUÑOZ, F. J.; FERNÁNDEZ, V.; VIDELA, L. A.; INESTROSA, N. C. PC12 and neuro 2a cells have different susceptibilities to acetylcholinesterase-amyloid complexes, amyloid25-35 fragment, and hydrogen peroxide. **J. Neurosci. Res.**, v. 56, p. 620-631, 1999.
- CARLINI, E. A.; CUNHA, J. M. Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 21, p. 417S-427S, 1981.

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

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

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

CHAN, K. C.; MONG, M. C.; YIN, M. C. Antioxidative and Anti-Inflammatory Neuroprotective Effects os Astaxanthin and Canthaxanthin in Nerve Growth Factor Differentiated PC12 Cells. **Journal of Food Science**, v. 74, n.7, p. H225-H231, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DOWNER, E. J.; FOGARTY, M. P.; CAMPBELL, V. A. Tetra-hydrocannabinol-induced neurotoxicity depends on CB<sub>1</sub> receptor mediated c-Jun N-terminal kinase activation in cultured cortical neurons. **Br. J. Pharmacol.**, v. 140, p. 547–557, 2005.

EHRHART, J.; OBERGON, D.; MRI, T.; HOU, H.; SUN, N.; BAI, Y. et al. Stimulation of CB<sub>2</sub> suppresses microglial activation. **J. Neuroinflamm.**, v. 12, p. 22-29, 2005.

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

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

FERNANDEZ, R. S.; COTTER, T. G. Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. **Biochem. Pharmacol.**, n. 48, p. 675-681, 1994.

FERNANDEZ-RUIZ, J.; BERRENDERO, F.; HERNANDEZ, M. L.; JA, R. The endogenous cannabinoid system and brain development. **Trends Neurosci.**, v. 23, p. 14-20, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MARSICANO, G.; GOODENOUGH, S.; MONORY, K.; HERMANN, H.; EDER, M.; CANNICH, A.; AZAD, S. C.; CASCIO, M. G.; GUTIERREZ, S. O.; VAN DER STELT, M.; LOPEZ-RODRIGUEZ, M. L.; CASANOVA, E.; SCHUTZ, G.; ZIEGLGANSBERGER, W.; DI MARZO, V.; BEHL, C.; LUTZ, B. CB1 cannabinoid

receptors and on-demand defense against excitotoxicity. **Science**, v. 302, p. 84-88, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PAN, X.; IKEDA, S. R.; LEWIS, D. L. Rat brain cannabinoid receptor modulates N type Ca<sup>2+</sup> channels in a neuronal expression system. **Mol. Pharmacol.**, v. 49, p. 707–714, 1996.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VASQUEZ, C.; NAVARRO-POLANCO, R. A.; HUERTA, M.; TRUJILLO, X.; ANDRADE, F.; TRUJILLO HERNANDEZ, B.; HERNANDEZ, L. Effects of cannabinoids on endogenous K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in HEK293 cells. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 81, p. 436-442, 2003.

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

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

WALLACE, M. J.; BLAIR, R. E.; FALENSKI, K. W.; MARTIN, B. R.; DELORENZO, R. J. The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 307, p. 129-37, 2003.

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

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

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