

FABRÍCIO ALANO PAMPLONA

**LIPOXINA A₄: UM MODULADOR ALOSTÉRICO
ENDOCANABINÓIDE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Florianópolis – SC
2010

FABRÍCIO ALANO PAMPLONA

**LIPOXINA A₄: UM MODULADOR ALOSTÉRICO
ENDOCANABINÓIDE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Reinaldo N. Takahashi

Florianópolis – SC
2010

*“Evite as multidões e os clichês,
pense por si mesmo, independentemente,
seja o jogador de xadrez e não o peão”.*
Ralph Charell

*“Se você não erra,
provavelmente não está trabalhando
em problemas suficientemente desafiadores.
E isto sim é um grande erro”.*
Frank Wilczek, Prêmio Nobel de Física (2004)

*Dedico este trabalho
à mãe natureza,
cujos mistérios nós cientistas
investigamos incansavelmente
com um misto de admiração,
surpresa e incredulidade.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Alfa e Pedro Paulo, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram durante a minha caminhada de formação acadêmica e evolução pessoal, que trocaram minhas fraldas sabendo que um dia serei eu a trocar-lhes;

À minha irmã Gabriela, com quem divido o teto e as contas no final do mês, pela parceria e pelos diversos momentos de alegria que vivemos juntos desde o seu nascimento;

À minha namorada Izabella, pelo amor e cumplicidade irrestritos e pela coragem de me acompanhar, enfrentando de peito aberto os desafios que a vida a dois nos trouxe; a seus pais Mari e Otávio pela compreensão e apoio;

Ao professor Reinaldo, pelos vários anos de parceria científica, pelas longas discussões, pela iluminação nos momentos de dúvida e acima de tudo, por confiar e acreditar no meu potencial;

Aos colaboradores e amigos Juliano Ferreira (UFSM), Octávio Menezes de Lima Jr. (FIOCRUZ) e Filipe Ferreira Duarte (UFSC) por terem participado integralmente na concepção deste projeto de doutorado e por nunca terem medido forças em me ajudar nos momentos em que precisei;

Aos demais colaboradores que foram se juntando ao longo da construção deste estudo, professor João Batista Calixto (UFSC) e sua equipe, em especial a Stefânia e o Alisson, que participaram diretamente de experimentos desta tese;

Aos pesquisadores Carsten Wotjak (Instituto Max Planck de Psiquiatria, Alemanha), Giovanni Marsicano e Isabel Matias (Instituto INSERM, França) por terem aberto as portas de seus laboratórios, e apostarem na minha proposta de trabalho, estabelecendo uma colaboração internacional baseada na mais verdadeira transparência e reciprocidade;

Aos professores do Departamento de Farmacologia, aos quais devo uma parte substancial da minha formação acadêmica, em especial ao professor Giles Rae (UFSC), que despretensiosamente acompanhou de muito perto o desenvolvimento deste trabalho com sinceras e valiosas sugestões;

Aos diversos amigos que fiz nos laboratórios envolvidos direta ou indiretamente nos experimentos desta tese. Agradeço à professora Rosa Maria Ribeiro-do-Valle por ter me permitido realizar experimentos em seu laboratório e à Mari e ao Eduardo que aturaram minhas piadinhas infames;

Aos amigos do lab, Pablo, Rafael, Thiago, Assini, Cris, Sanmara, que acompanharam meus passos durante a realização desta tese e foram sempre fiéis ao espírito de equipe e companheirismo;

Aos amigos do lab "irmão" professor Rui Daniel, Daniel Rial, Filipe, Aderbal, Xikota, Nelsão, Eduardo e Adalba pelas diversas risadas na "hora do cafezinho", que influenciaram positivamente meu olhar científico e não raro resultaram em novos rumos para este e outros estudos que tenho desenvolvido;

Aos funcionários do Departamento da Farmacologia, todos sempre muito solícitos;

Ao desenvolvedor do programa gerenciador de referências EndNote, sem o qual a tarefa de referenciar este documento teria sido incomparavelmente mais árdua;

À Fundação Hübner por viabilizar financeiramente a minha permanência por 18 meses como pesquisador convidado no Instituto Max Planck de Psiquiatria, na Alemanha;

Ao CNPq, CAPES e FAPESC pelo suporte financeiro ao laboratório de Psicofarmacologia e às minhas atividades acadêmicas como doutorando do PPG em Farmacologia-UFSC;

À Ilha de Santa Catarina, cuja beleza me encanta e inspira;

Um sincero Muito Obrigado.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	VII
LISTA DE ABREVIACÕES	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS.....	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1-BREVE HISTÓRIA DA DESCOBERTA DOS ENDOCANABINÓIDES.....	2
1.2-DISTRIBUIÇÃO NEURONAL DOS RECEPTORES CANABINÓIDES.....	6
1.3-OS ENDOCANABINÓIDES, SÍNTESE E DEGRADAÇÃO	11
1.4- FARMACOLOGIA DOS ENDOCANABINÓIDES	18
1.5-A DINÂMICA DA SINAPSE ENDOCANABINÓIDE.....	21
1.6-INTERAÇÃO ENTRE OS ENDOCANABINÓIDE E OUTROS EICOSANÓIDES.....	25
1.7-LIPOXINAS: DA PERIFERIA AO CÉREBRO	27
2-JUSTIFICATIVA	33
3-OBJETIVO	34
3.1-GERAL	34
3.2-ESPECÍFICOS	34
4-MÉTODOS	35
4.1-ANIMAIS.....	35
4.2-SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS.....	35
4.3-PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	37
4.3.1-Administração intracerebroventricular.....	37
4.3.2-Procedimentos comportamentais <i>in vivo</i>	39
4.3.2.1-Testes preditivos para atividade canabimimética.....	39
4.3.3-Procedimentos funcionais <i>in vitro</i>	41
4.3.3.1-Contração de ducto deferente de rato induzida eletricamente.	41
4.3.4-Procedimentos bioquímicos <i>in vitro</i>	42
4.3.4.1-Preparação das frações celulares	42
4.3.4.2-Ensaio de ligação em receptores canabinóides CB ₁	42
4.3.4.3-Atividade enzimática da FAAH, enzima de degradação da AEA	43
4.3.4.4-Atividade enzimática da MAGL, enzima de degradação do 2-AG.....	44

4.3.4.5-Determinação da expressão de receptores ALX por Western blot	44
4.3.5-Procedimentos bioquímicos ex vivo	45
4.3.5.1-Dosagem de endocanabinóides no cérebro	45
4.3.5.2-Dosagem de LXA ₄ no cérebro	45
4.3.6-Sequência experimental	46
4.3.6.1-Grupo 1: A LXA ₄ induz efeitos similares aos de canabinóides no sistema nervoso central?.....	46
4.3.6.2-Grupo 2: Em busca de um mecanismo de ação para os efeitos centrais da LXA ₄	48
4.3.6.3-Grupo 3: Possível relevância fisiológica da interação entre derivados da lipoxigenase e endocanabinóides no sistema nervoso central.....	50
4.3.6.4-Grupo 4: A 15-epi-LXA ₄ gerada pela aspirina compartilha dos efeitos canabimiméticos observados para a LXA ₄ de ocorrência natural?.....	51
4.4-ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5-RESULTADOS	54
5.1-GRUPO 1: A LXA ₄ INDUZ EFEITOS SIMILARES AOS DE CANABINÓIDES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL?	54
5.2-GRUPO 2: EM BUSCA DE UM MECANISMO DE AÇÃO PARA OS EFEITOS CENTRAIS DA LXA ₄	58
5.3-GRUPO 3: POSSÍVEL RELEVÂNCIA FISIOLÓGICA DA INTERAÇÃO ENTRE DERIVADOS DA LIPOXIGENASE E ENDOCANABINÓIDES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	67
5.4-GRUPO 4: A 15-EPI-LXA ₄ GERADA PELA ASPIRINA COMPARTILHA DOS EFEITOS CANABIMIMÉTICOS OBSERVADOS PARA A LXA ₄ DE OCORRÊNCIA NATURAL? ..	70
6-DISCUSSÃO.....	74
CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
ANEXO 1.....	132
ANEXO 2.....	138
ANEXO 3.....	140

LISTA DE ABREVIACÕES

2-AG – 2 araquidonil glicerol
AEA - anandamida
AMP – adenosina monofosfato
ANOVA – análise de variância
ATP – adenosina trifosfato
CCK – colecistocinina
CMC – carbóxi metil celulose
COX – cicloxigenase
DAG – diacil glicerol
DMSO - dimetil sufóxido
DNA – ácido desoxirribonucleico
FAAH – amido hidrolase de ácidos graxos
HPLC – cromatografia líquida de alta performance
i.c.v. – via intracerebroventricular
i.p. – via intraperitoneal
IL – interleucina
IP3 – inositol trifosfato
LOX – lipoxigenase
LTP – potenciação de longo prazo
LXA₄ - lipoxina A₄
MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno
MAGL – mono acil glicerol lipase
mRNA – RNA mensageiro
NADA – n-araquidonil dopamina
NAPE – n-araquidonil fosfatidil etanolamina
p.o. – via oral
PBS – solução salina tamponada com fosfato
PKC – proteína quinase C
PLA - fosfolipase A
PLC – fosfolipase C
PLD – fosfolipase D
PMSF - fluoreto de fenilmetanosulfonila
PVDF - fluoreto de polivinilideno
SNC – sistema nervoso central
 Δ^9 -THC – Δ^9 - tetra hidrocanabinol

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Artigos publicados anualmente (1990-2008) em revistas científica indexadas com os termos “cannabinoid” (CB), “endocannabinoid” (eCB), “noradrenaline”(NA) ou “acetylcholine”(Ach) no título e/ou resumo1
- Figura 2 – Grandes marcos na história recente da pesquisa com derivados da Cannabis, canabinóides e endocanabinóides.6
- Figura 3 – Imunohistoquímica com microscopia eletrônica demonstrando a localização de receptores CB₁ em subtipos celulares da região CA1 do hipocampo.8
- Figura 4 – Hibridização in situ para o RNAm dos receptores canabinóides CB₁ e CB₂ no cérebro (painéis maiores) e baço (painéis menores) de camundongos.....10
- Figura 5 – Representação esquemática das estruturas moleculares dos endocanabinóides identificados e caracterizados até o momento.11
- Figura 6 – Vias enzimáticas de degradação da anandamida (AEA). ..17
- Figura 7 – Elementos básicos de uma sinapse endocanabinóide.22
- Figura 8 – O processo dinâmico de sinalização retrógrada endocanabinóide.24
- Figura 9 - Representação esquemática das vias sintéticas dos eicosanóides, incluindo seus receptores mais conhecidos.26
- Figura 10 – Árvore filogenética relacionando os receptores ALX com outros receptores metabotrópicos para lipídeos, incluindo os de eicosanóides.....30
- Figura 11 – Localização tecidual dos receptors ALX por técnica de Western blot.....31

Figura 12 - Representação da técnica utilizada para injeções i.c.v. freehand descrita por Haley e McCormick (1957) e adaptada por Laursen e Belknap (1986).	38
Figura 13 – Fotografias dos testes comportamentais constituintes do teste de atividade canabimimética, também chamado de teste da tétrede canabinóide, como realizado em nossas condições experimentais.....	40
Figura 14 – Efeito da LXA ₄ no teste da tétrede de efeitos canabinóides.	54
Figura 15 – Participação de receptores canabinóides CB ₁ nos efeitos centrais da LXA ₄	56
Figura 16 – Confirmação da ausência de participação de receptores ALX nos efeitos centrais da LXA ₄	57
Figura 17 – Confirmação da participação de receptores canabinóides CB ₁ nos efeitos centrais da LXA ₄	58
Figura 18 – LXA ₄ possui baixa afinidade para os receptores CB ₁ e baixa eficácia canabimimética <i>in vitro</i>	60
Figura 19 - Interação da LXA ₄ com os endocanabinóides AEA e 2-AG.	61
Figura 20 – LXA ₄ não altera o metabolismo dos endocanabinóides AEA e 2-AG.	63
Figura 21 – LXA ₄ não altera os níveis de endocanabinóides no cérebro.	64
Figura 22 – LXA ₄ aumenta a afinidade da AEA pelos receptores canabinóides CB ₁ , mas bloqueia seu efeito <i>in vitro</i>	67
Figura 23 – Quantificação dos níveis endógenos de LXA ₄ no cérebro.	68
Figura 24 - LXA ₄ endógena participa dos efeitos centrais do endocanabinóide AEA.	69

Figura 25 – Aspirina potencializa os efeitos centrais do endocanabinóide AEA.	70
Figura 26 – Derivado da 5-LOX gerado pela aspirina participa da potencialização dos efeitos centrais da AEA.	71
Figura 27 – A lipoxina gerada pela aspirina potencializa os efeitos centrais da AEA.	72
Figura 28 – Receptores canabinóides CB ₁ participam dos efeitos centrais da 15-epi-LXA ₄	73
Figura 29 – Ilustração do modelo teórico de múltiplos estados conformacionais de receptores farmacológicos.	83
Figura 30 – Ilustração do modelo teórico de alosterismo conforma a teoria de múltiplos estados conformacionais de receptores farmacológicos.	85
Figura 31 – Efeitos da modulação alostérica sobre a afinidade e eficácia de um agonista total.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Receptores-alvo para endocanabinóides.....	21
Tabela 2 – Efeitos da LXA ₄ e AEA no SNC.....	32
Tabela 3 – Mecanismo de ação das substâncias utilizadas no presente trabalho.....	36
Tabela 4 - Parâmetros do ensaio competitivo de ligação da lipoxina A ₄ contra [³ H]SR141716A em membranas de cérebro total de camundongos.....	59
Tabela 5 – Potência estimada dos ligantes no teste da catalepsia	62
Tabela 6 - Parâmetros do ensaio competitivo de ligação da AEA contra [³ H]SR141716A na ausência e na presença de LXA ₄ (100 nM) em membranas de cérebro total de camundongos.....	66

RESUMO

Lipoxinas e endocanabinóides são eicosanóides endógenos que são liberados sob demanda em resposta à estimulação neuronal ou injúria tecidual. A lipoxina A₄ (LXA₄) ativa receptores ALX e exerce importante papel na resolução de processos inflamatórios, mas informações a respeito dos seus efeitos no sistema nervoso central são escassas. As evidências disponíveis até o momento sugerem que a LXA₄ pode influenciar a atividade cerebral de uma maneira similar aos canabinóides. Endocanabinóides como a anandamida (AEA) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG) exercem diversos efeitos centrais por ativação dos receptores canabinóides CB₁. Apesar dos endocanabinóides e lipoxinas compartilharem similaridades estruturais e funcionais, ainda não há descrição de sua relação farmacológica. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi investigar a participação do sistema endocanabinóide nos efeitos centrais da LXA₄. Camundongos Swiss albinos foram injetados i.c.v. com LXA₄ (0,01-1 pmol / 5µl) ou controle e 5 min depois avaliados no teste da tétrede canabinóide (catalepsia, locomoção, analgesia e temperatura retal), considerado preditivo para atividade canabimimética. A investigação destas respostas prosseguiu com a injeção do antagonista canabinóide CB₁ SR141716A (1 mg/kg, i.p.) ou do antagonista de receptores ALX BOC-2 (10 µg/kg, i.p.) 50 min antes da injeção i.c.v. de LXA₄ (1 pmol / 5 µl). A participação dos receptores CB₁ nos efeitos da LXA₄ foi confirmada em camundongos knockout para receptores CB₁. A interação farmacológica entre LXA₄ e os endocanabinóides foi abordada pela co-injeção de doses sub-efetivas de AEA (10 pmol/ 2 µl) ou 2-AG (1 pmol/ 2 µl) e LXA₄ (0,01 pmol/ 2 µl). A ligação da LXA₄ (1 nM – 10 µM) nos receptores canabinóides CB₁ receptores foi avaliada no ensaio competitivo de ligação contra o [³H]SR141716A em membranas de cérebro de camundongos, na presença e ausência de AEA (1 nM – 10 µM). Possíveis efeitos da LXA₄ na degradação dos endocanabinóides foram testados em ensaios in vitro das respectivas enzimas de degradação para a AEA e o 2-AG. Além do mais, nós testamos se a 15-epi-LXA₄, uma lipoxina liberada por ação da aspirina, também exerce atividade canabimimética como a LXA₄ de ocorrência natural. LXA₄ (0,1 - 1 pmol) induziu catalepsia, hipolocomoção, analgesia e hipotermia nos camundongos. Estes efeitos foram antagonizados pelo antagonista dos receptores canabinóides CB₁ SR141716A, mas não pelo antagonista dos receptores ALX BOC-2, além de não ocorrerem em camundongos knockout para os receptores

CB₁. A LXA₄ potencializou a catalepsia induzida pela AEA, mas não pelo 2-AG. A LXA₄ praticamente não inibiu a ligação do [³H]SR141716A às membranas de cérebro de camundongos, mas aumentou a inibição causada pela AEA. Não houve efeito da LXA₄ sobre a atividade das enzimas de degradação de endocanabinóides FAAH e MAGL (até 10 μM). A aspirina potencializou os efeitos da AEA de uma maneira dependente da enzima 5-LOX e dos receptores CB₁, provavelmente porque a 15-epi-LXA₄ também influencia a afinidade da AEA pelos receptores CB₁. Os presentes resultados sugerem que a LXA₄ exerce efeitos centrais via receptores CB₁ interagindo positivamente com o endocanabinóide AEA. Apesar da LXA₄ não influenciar o metabolismo de endocanabinóides, este trabalho traz evidências de que a LXA₄ aumenta a afinidade da AEA pelos receptores CB₁ por um mecanismo de modulação alostérica positiva. Esta é certamente uma descoberta pioneira na farmacologia do sistema endocanabinóide.

ABSTRACT

Lipoxins and endocannabinoids are endogenous eicosanoids that are released on demand following neuronal stimulation or injury. Lipoxin A₄ (LXA₄) activates ALX receptors and has an important role in the resolution of inflammation, but information about its effects on the central nervous system is scarce. The available evidence suggests that LXA₄ may influence brain function in a cannabinoid-like fashion. Endocannabinoids, such as anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) exert widespread brain effects by activation of CB₁ cannabinoid receptors. Although endocannabinoids and lipoxins share structural and functional similarities, the pharmacological relationship between them has not yet been described. Hence, this study aimed to investigate the participation of the endocannabinoid system in the central effects of LXA₄ in mice. Swiss albino mice were injected i.c.v. with LXA₄ (0.01-1 pmol / 5 µl) or control and 5 min after evaluated in the cannabinoid tetrad test (catalepsy, locomotion, analgesia and rectal temperature), considered predictive for cannabimimetic activity. These responses were further investigated by injecting the CB₁ receptors antagonist SR141716A (1 mg/kg, i.p.) or the ALX receptor antagonist BOC-2 (10 µg/kg, i.p.) 50 min before i.c.v. injection of LXA₄ (1 pmol / 5 µl). The role of CB₁ receptors on LXA₄ effects was confirmed by the use of CB1 knockout mice. The pharmacological interaction between LXA₄ and the endocannabinoids was addressed by co-injecting sub-effective doses of AEA (10 pmol/ 2 µl) or 2-AG (1 pmol/ 2 µl) and LXA₄ (0.01 pmol/ 2 µl). Binding of LXA₄ (1 nM – 10 µM) to CB₁ receptors was tested in a competitive binding assay against [³H]SR141716A in mouse brain membranes in the presence and absence of AEA (1nM - 10µM). Possible effects of LXA₄ on degradation of endocannabinoids were assessed by in vitro assays of the metabolic enzymes of AEA e 2-AG. Additionally, we tested whether 15-epi-LXA₄, an aspirin-triggered lipoxin, shares the cannabimimetic activity of the naturally-occurring LXA₄. LXA₄ (0.1-1 pmol) induced catalepsy, hypolocomotion, analgesia and hypothermia in mice. These effects were antagonized by the CB₁ receptor antagonist SR141716A, but not by the ALX receptor antagonist BOC-2, and were absent in CB₁ knockout mice. LXA₄ potentiated the cataleptic effects of AEA, but not of 2-AG. LXA₄ virtually did not inhibit the binding of [³H]SR141716A, but enhanced the inhibition of [³H]SR141716A binding by AEA. There was no effect

of LXA₄ on the endocannabinoid-degrading enzymes FAAH and MAGL (up to 10 μM). Aspirin potentiated AEA effects via a mechanism dependent of 5-LOX and CB₁ receptors, presumably because 15-epi-LXA₄ also influences the affinity of AEA at CB₁ receptors. The present results suggest that LXA₄ exerts central effects via CB₁ cannabinoid receptors and interacts positively with the endocannabinoid AEA. While we did not find any effect of LXA₄ on endocannabinoid metabolism, this study brings evidence that LXA₄ enhances the affinity of AEA for CB₁ receptors through a mechanism of positive allosteric modulation. This is unmistakably a pioneer finding on pharmacology of the endocannabinoid system.

1 - INTRODUÇÃO

Os últimos anos testemunharam um avanço crescente na compreensão da importância dos endocanabinóides para o organismo. A complexidade do que se convencionou chamar “sistema endocanabinóide” de neuromodulação cresceu do reconhecimento inicial de que o principal composto psicoativo de plantas do gênero *Cannabis* se liga a sítios protéicos específicos no sistema nervoso central de mamíferos; até os dias de hoje, em que uma gama de enzimas, receptores e ligantes desse sistema já foram identificados. Este é sem dúvida um dos sistemas de neuromodulação cujas investigações científicas têm aumentado dramaticamente nos últimos anos (ver figura 1). Enquanto há uma tendência de estabilização e/ou queda no número de artigos publicados envolvendo neurotransmissores “clássicos” como a acetilcolina ou noradrenalina, o número de artigos investigando o sistema endocanabinóide aumentou consideravelmente.

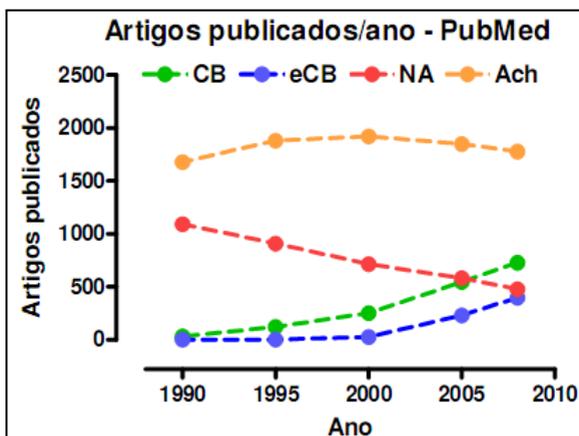


Figura 1 – Artigos publicados anualmente (1990-2008) em revistas científica indexadas com os termos “cannabinoid” (CB), “endocannabinoid” (eCB), “noradrenaline”(NA) ou “acetylcholine”(Ach) no título e/ou resumo, listados no PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Até aproximadamente 20 anos atrás, praticamente não havia referência ao sistema endocanabinóide na base de dados PubMed (o termo veio a ser “oficialmente” cunhado entre 1994 e 1995, em artigos liderados pelo pesquisador italiano Vincenzo di Marzo), quando o termo

canabinóide constava em apenas 32 artigos, dos milhares publicados no ano de 1990. Em 2008, o termo canabinóide estava presente em 729 artigos publicados, uma imponente marca de cerca de 2 artigos / dia, com crescimento de 2300% nas últimas 2 décadas. No mesmo ano, o termo endocanabinóide foi utilizado em 398 artigos.

1.1 - UMA BREVE HISTÓRIA DA DESCOBERTA DOS ENDOCANABINÓIDES

Derivados da planta *Cannabis sativa* são utilizados na forma de fibra para fabricação de cordas e têxteis, para extração de seu óleo com propriedades nutritivas ou para fins medicinais/religiosos há milênios, de forma que se especula que esta tenha sido uma das primeiras plantas cultivadas pelo homem (Li, 1973). Os registros arqueológicos e históricos conhecidos sugerem que a *Cannabis* era cultivada para utilização de suas fibras há cerca de 6 mil anos atrás (Li, 1973). Destes, há pelo menos 2700 anos as inflorescências desta planta vêm sendo utilizadas pelas suas propriedades psicofarmacológicas, inclusive constando na farmacopéia chinesa, a mais antiga de que se tem notícia (Russo et al., 2008). É nesta farmacopéia onde se encontram os primeiros registros dos efeitos psicofarmacológicos da *Cannabis*: “...*ela possibilita a comunicação com os espíritos e ilumina o corpo, mas se tomada em excesso produzirá visões diabólicas...*” (tradução livre da descrição em inglês de Li (1978)). O uso recreacional e medicinal da *Cannabis* também eram bastante difundidos na Índia, de maneira que os livros sagrados dos Vedas – o provável equivalente à bíblia para os cristãos – referem-se à *Cannabis* como uma das 5 plantas sagradas, conhecida como “*fonte de felicidade, doador de alegria e carregador da liberdade*”. As recomendações medicinais para a *Cannabis* eram as mais diversas, desde analgésico, anticonvulsivante, hipnótico, tranqüilizante a antibiótico, e antiparasitário, passando por digestivo, afrodisíaco e expectorante (Touwn, 1981). De fato, algumas destas utilizações foram comprovadas pela abordagem científica contemporânea, enquanto outras ainda são alvo de debates acalorados e opiniões controversas, muitas vezes de cunho mais político do que científico/médico.

No Brasil, o uso da *Cannabis* foi introduzido em torno do século 16, vindo juntamente com os escravos africanos. O termo maconha, gíria utilizada para a forma mais popular da planta em nosso país é de origem angolana, por exemplo. Apesar de conhecida na América do Sul, os registros sugerem que na Europa a *Cannabis* era cultivada somente

para a utilização de suas fibras na fabricação de têxteis. Seu uso era provavelmente mal visto pela sociedade aristocrática da época, pois era associada aos hábitos dos escravos negros. Foi somente no século 19 que a *Cannabis* se tornou popular na Europa, muito em decorrência dos trabalhos do médico irlandês William B. O'Shaughnessy e do psiquiatra francês Jacques-Joseph Moreau, que experimentaram (e trouxeram) derivados da *Cannabis* da Índia e Arábia, respectivamente (Fankhauser, 2002). O aval destes dois cidadãos europeus de grande notoriedade contribuiu para que o uso da *Cannabis* fumada se disseminasse pela Europa, virando tanto um hábito entre os intelectuais e artistas, quanto uma esperança para a cura de diversos males, constando em diversas farmacopéias, com extratos e tinturas produzidos em larga escala por laboratórios renomados da Alemanha, Estados Unidos e Inglaterra (Fankhauser, 2002).

Ao contrário do que se pensa, a restrição legal ao uso da *Cannabis* é extremamente recente. A rígida regulação imposta no final da década de 1930 pelo governo dos Estados Unidos gerou uma onda proibicionista ao longo do globo terrestre, que culminou com a classificação da *Cannabis* como substância controlada classe I na Convenção Internacional de Substâncias Psicotrópicas, equiparada erroneamente ao ópio e outras drogas com alto potencial de gerar dependência (Organização-Das-Nações-Unidas, 1971). Em alguns países da Europa, como Holanda, Inglaterra, França, Espanha, Suíça e Dinamarca o uso da *Cannabis* continuou socialmente aceito, apesar destes países participarem das convenções internacionais. Hoje em dia, há forte pressão social em alguns países, principalmente europeus, pela mudança do status legal da *Cannabis*, que já foi atenuada para classe II na convenção internacional de narcóticos. Esta mudança de perspectiva se deve, em grande parte, pela “redescoberta” do seu potencial terapêutico e em defesa do interesse de pacientes que relatam poucos efeitos colaterais e preferem o uso de maconha ao de medicamentos convencionais para alívio sintomático. Em decorrência disso, a legislação vem gradualmente mudando, de forma que atualmente permissões para uso medicinal de *Cannabis* podem ser obtidas em 14 dos 50 estados dos Estados Unidos, no Canadá e Alemanha. Dispensários públicos distribuem *Cannabis* cultivada pelo governo na Califórnia e Canadá, enquanto que nos outros países a *Cannabis* é oriunda da Holanda, onde a planta em formato padronizado para uso terapêutico pode ser encontrada em farmácias (International-Association-for-Cannabis-Based-Medicine, 2010).

Apesar desta longa relação entre a humanidade e a *Cannabis*, o conhecimento atual sobre a química e a farmacologia dos canabinóides é primariamente decorrente de pesquisas científicas conduzidas nas últimas cinco décadas. As primeiras buscas pelos ingredientes psicoativos da *Cannabis* ocorreram em torno do século 19, mas foi muito mais recentemente que o componente psicoativo majoritário Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) foi isolado, caracterizado e sintetizado no laboratório do pesquisador israelense Rafael Mechoulam (Gaoni e Mechoulam, 1964). Depois deste, mais de 60 outros canabinóides foram identificados nas inflorescências de plantas do gênero *Cannabis*, além de diversos outros componentes não canabinóides com efeitos farmacológicos centrais e periféricos (Mechoulam e Hanus, 2000). Embora a identificação do Δ^9 -THC não tenha explicado completamente os efeitos da *Cannabis* no organismo humano, essa descoberta impulsionou dramaticamente a pesquisa científica na área dos canabinóides. Foi nessa época que o teste comportamental da tétrede de canabinóides foi idealizado pelo pesquisador americano Billy Martin para triagem farmacológica de atividade canabimimética. Este teste foi inicialmente realizado em cachorros e consistia na observação simultânea de supressão de atividade locomotora, analgesia, hipotermia e catalepsia (Martin, 1985).

Os efeitos comportamentais do Δ^9 -THC foram seguidos de diversos testes com membranas de tecido cerebral *in vitro* que identificaram alguns efeitos biológicos desta molécula, assim como a dependência de ativação de proteínas G, mas não conseguiram identificar um sítio de ação específico utilizando o Δ^9 -THC marcado radioativamente (Howlett, 1987). O principal empecilho era a alta lipossolubilidade do Δ^9 -THC, que o fazia se ligar indiscriminadamente nas membranas celulares (Roth e Williams, 1979). Foi necessária a colaboração entre pesquisadores do grupo de Allyn Howlett e a companhia farmacêutica Pfizer para o desenvolvimento de um derivado estrutural do Δ^9 -THC (CP-55,940) marcado radioativamente e com maior hidrosolubilidade, para que finalmente se descobrissem os sítios específicos de ligação para o Δ^9 -THC no cérebro de ratos (Devane et al., 1988). Este primeiro receptor canabinóide foi identificado em uma lista prévia de receptores metabotrópicos órfãos e denominado “receptor canabinóide tipo 1”, ou simplesmente CB₁. A clonagem definitiva deste receptor e elucidação de sua estrutura molecular (Matsuda et al., 1990) foi prontamente seguida pela clonagem de outro tipo de receptor canabinóide, identificado por homologia estrutural. Estes receptores

foram denominados receptores CB₂ (Munro et al., 1993). Recentemente descobriu-se que outros receptores previamente considerados “receptores órfãos”, como o GPR55 (Ryberg et al., 2007), o GPR18 (Kohno et al., 2006) e o GPR119 (Overton et al., 2006) também parecem constituir novos tipos de receptores canabinóides. Este tópico merece uma discussão mais aprofundada nas próximas sessões deste trabalho, pois ainda não há consenso por parte dos pesquisadores da área quanto à classificação destes receptores.

A descoberta dos receptores CB₁ foi o marco inicial para o estudo do sistema endocanabinóide. No entanto, foi a identificação de um lipídeo extraído do cérebro de porcos que se ligava com boa afinidade aos receptores CB₁ que iria mudar a história da farmacologia nos anos seguintes, elevando o sistema endocanabinóide ao status de mais abundante modulador de atividade sináptica conhecido. Atualmente se sabe que os receptores CB₁ são os mais abundantes receptores acoplados à proteína G expressos no cérebro de mamíferos (Herkenham et al., 1990). Então, como parecia pouco lógico que estes receptores seriam expressos no cérebro somente para a ligação dos compostos da *Cannabis*, o próximo passo na investigação científica dos canabinóides foi a tentativa de identificar o seu ligante endógeno. Um canabinóide sintético (HU-243) marcado radioativamente foi utilizado em ensaios competitivos de ligação para a identificação do primeiro agonista endógeno dos receptores canabinóides, descoberto por um grupo liderado pelos mesmos pesquisadores que anteriormente haviam identificado os receptores CB₁ (Devane et al., 1992). O agonista endógeno em questão é a etanolamida do ácido araquidônico, anandamida (AEA), cujo nome foi gerado pela combinação de sua função química com o termo *ananda*, que significa algo como “satisfação plena, felicidade” em sânscrito. O 2-araquidonil glicerol (2-AG) foi descoberto poucos anos depois por dois grupos independentes de pesquisadores (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Sugere-se que outras moléculas endógenas derivadas do ácido araquidônico como a oleamida (Leggett et al., 2004), a O-araquidonil etanolamina (virodamina) (Porter et al., 2002), o 2-araquidonil glicerol éter (noladin) (Hanus et al., 2001) e a N-araquidonil dopamina (NADA) (O'Sullivan et al., 2004) também exerçam atividade canabinóide. Estes ligantes endógenos dos receptores canabinóides são coletivamente denominados de endocanabinóides. Conforme ilustrado na figura 2 abaixo, o pesquisador italiano Vincenzo DiMarzo classifica as “eras” científicas em: era da *Cannabis* (desde os tempos ancestrais até o início da

elucidação dos componentes químicos da planta), era dos canabinóides (após o descobrimento do Δ^9 -THC) e era dos endocanabinóides (após o descobrimento dos receptores canabinóides e seus ligantes endógenos). O marco da era atual (endocanabinóides) seria a aplicação do conhecimento sobre este sistema no desenvolvimento de novos fármacos terapêuticamente e comercialmente viáveis.

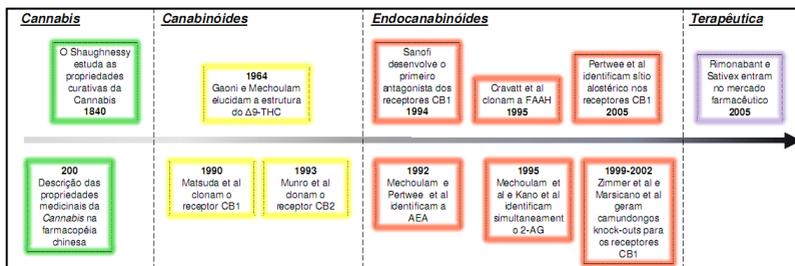


Figura 2 – Grandes marcos na história recente da pesquisa com derivados da Cannabis, canabinóides e endocanabinóides. Utilizada há milênios no oriente para fins recreacionais e medicinais/religiosos, a Cannabis só passou a receber atenção de cientistas ocidentais a partir do século 19. A partir de então, a pesquisa científica na área foi bastante impulsionada pela identificação dos constituintes químicos da Cannabis, destaque para o Δ^9 -THC, e a caracterização de um complexo sistema endocanabinóide de receptores, ligantes e suas enzimas metabólicas. Os últimos anos testemunharam o lançamento dos primeiros medicamentos oriundos das pesquisas em Cannabis no mercado farmacêutico. Δ^9 -THC: Δ^9 -tetrahydrocannabinol; AEA: anandamida (endocanabinóide); 2-AG: 2-araquidonilglicerol (endocanabinóide); FAAH: amido hidrolase de ácidos graxos, enzima de metabolismo da anandamida. (Figura baseada em Di Marzo (2006)).

1.2 - DISTRIBUIÇÃO NEURONAL E CEREBRAL DOS RECEPTORES CANABINÓIDES

Como mencionado na sessão anterior, a identificação dos receptores canabinóides só foi possível graças ao desenvolvimento de ligantes canabinóides menos hidrofóbicos. Da mesma maneira, estas ferramentas farmacológicas foram utilizadas na investigação histológica da localização dos receptores canabinóides no cérebro, e ainda mais especificamente, sua localização neuronal. Os estudos iniciais de autoradiografia com o ligante [3 H]CP-55,940 revelaram que a expressão dos receptores CB₁ no cérebro é extremamente alta, comparáveis aos

níveis de receptores ionotrópicos de neurotransmissores clássicos como GABA e glutamato (Herkenham et al., 1990). De fato, os receptores CB₁ são atualmente considerados os receptores metabotrópicos de maior expressão no cérebro de mamíferos. Além disso, descobriu-se que a distribuição dos receptores CB₁ no sistema nervoso central é consistente com o que se esperaria levando em consideração os efeitos psicoativos característicos do Δ^9 -THC em humanos e animais (Howlett et al., 2002). Por exemplo, altos níveis destes receptores são encontrados em áreas relacionadas ao controle do movimento, como os gânglios da base e cerebelo (possível substrato neural para os efeitos de hipolocomoção e catalepsia). Altos níveis de receptores CB₁ em áreas cortico-límbicas como o córtex cingulado, córtex frontal, amígdala e hipocampo refletem a importância dos endocanabinóides na modulação da emocionalidade e cognição. Além disso, expressão moderada destes receptores é observada no tronco dorsal da medula espinhal, substância cinzenta periaquedutal, áreas corticais relacionadas ao processamento nociceptivo (substratos para o efeito analgésico) e hipotálamo (substrato dos efeitos neuroendócrinos e termoreguladores). No entanto, baixos níveis de receptores CB₁ são encontrados no tálamo e centros não eméticos do tronco cerebral, como aqueles envolvidos no controle da respiração, de maneira consistente com a desprezível toxicidade dos canabinóides sobre as funções vegetativas essenciais (Herkenham et al., 1990).

Estudos mais detalhados de hibridização *in situ* demonstraram que ambas as sinapses excitatórias e inibitórias podem apresentar receptores CB₁, com padrões distintos de expressão (ver figura 3 acima). Enquanto interneurônios GABAérgicos inibitórios apresentam altos níveis de mRNA para os receptores CB₁ organizados em grupos bem definidos (Marsicano e Lutz, 1999; Bodor et al., 2005), neurônios glutamatérgicos excitatórios apresentam uma expressão mais baixa, com padrão pontuado, fracamente granulado (Marsicano e Lutz, 1999; Domenici et al., 2006; Kawamura et al., 2006; Monory et al., 2006). Mais especificamente, a alta expressão de receptores CB₁ foi associada a um subgrupo de interneurônios GABAérgicos que expressam colecistocinina (CCK), mas não aos interneurônios GABAérgicos que expressam parvalbumina no prosencéfalo basal (Katona et al., 1999; Hajos et al., 2000; Bodor et al., 2005). No estriado, no entanto, a expressão de receptores CB₁ também foi encontrada nos interneurônios positivos para parvalbumina, enquanto que em certos núcleos hipotalâmicos estes receptores estão expressos apenas em neurônios

glutamatérgicos principais (Marsicano e Lutz, 1999), o que ilustra a complexa variabilidade na expressão de receptores CB₁ dependendo da região cerebral e o tipo celular. Em nível subcelular, a imensa maioria dos receptores CB₁ está localizado nos axônios, especialmente em terminais pré-sinápticos; baixíssimos níveis de receptores CB₁ foram encontrados em partes proximais do axônio, dendritos ou no corpo celular (Nyiri et al., 2005; Leterrier et al., 2006).

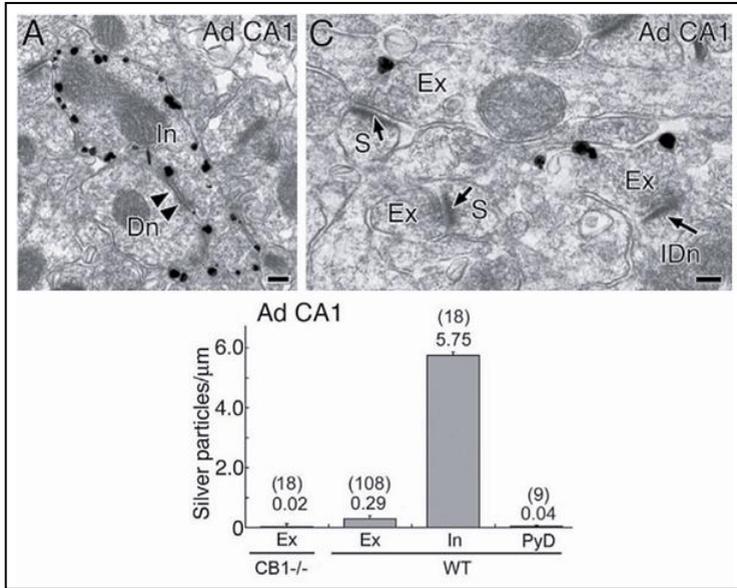


Figura 3 – Imunohistoquímica com microscopia eletrônica demonstrando a localização de receptores CB₁ em subtipos celulares da região CA1 do hipocampo. A presença de receptores canabinóides CB₁ em sinapses inibitórias (esquerda) e excitatórias está demonstrada nos painéis superiores. Cabeças de seta e setas inteiras indicam sinapses simétricas (inibitórias) e assimétricas (excitatórias), respectivamente. S: sinapse, In: inibitória, Ex: excitatória, PyD: células piramidais, CB1^{-/-}: camundongo knock-out CB₁, WT: camundongo selvagem (controle). A quantificação demonstra que há muito mais receptores canabinóides CB₁ em sinapses inibitórias do que em excitatórias na região CA1 do hipocampo. Camundongos knock-out para os receptores CB₁ apresentam a deleção gênica em ambos os tipos celulares. Escala de 100 nm. (Figura modificada de Kano et al., (2009)).

Por muito tempo, houve uma divisão bastante clara no conceito da distribuição dos receptores canabinóides: enquanto os receptores CB₁ eram tidos como expressos especialmente em tecidos neuronais (mas também em outros), aceitava-se que os receptores CB₂ eram expressos exclusivamente em tecidos periféricos e células do sistema imunológico (Howlett et al., 2002). Conseqüentemente, os receptores CB₁ foram chamados de “neuronais”, enquanto os CB₂ eram chamados de “periféricos” (ver figura 4 abaixo). No SNC, imaginava-se que os receptores CB₂ estavam restritos a células gliais (Galiegue et al., 1995; Buckley et al., 1998). Os estudos pioneiros de Van Sickle et al. (2005) e Onaivi et al. (2006) acabaram com esta dicotomia. O primeiro estudo demonstrou a presença de receptores CB₂ funcionais no tronco cerebral, córtex e cerebelo de ratos (Van Sickle et al., 2005). Importante, o nível de mRNA dos receptores CB₂ nestas regiões do cérebro foi de cerca de 1-2% dos níveis tradicionalmente encontrados no baço. Esta relativa baixa expressão provavelmente explica porque a expressão de receptores CB₂ no cérebro havia sido anteriormente negligenciada, e só foi observada anos depois com a utilização da técnica de PCR em tempo real. Contrariando as expectativas provocadas pelas evidências anteriores, os receptores CB₂ foram encontrados em células neuronais, mas não em células gliais do cérebro (Van Sickle et al., 2005). Onaivi et al. (2006) confirmaram a presença de receptores CB₂ no tronco cerebral, córtex e cerebelo de ratos utilizando diversas técnicas de biologia molecular, como PCR em tempo real, hibridização *in situ*, Western blot e imunohistoquímica com microscopia óptica e eletrônica. Além disso, o uso de um novo anticorpo permitiu identificar a expressão de receptores CB₂ em diversas áreas cerebrais de camundongos do tipo selvagem (estriado, substância nigra, hipotálamo, córtex, amígdala, hipocampo entre outros), que não foi observada no cérebro de camundongos *knock-out* para os receptores CB₂. Segundo estes autores, a expressão de receptores CB₂ no tronco cerebral é de cerca de 100 vezes menor do que a expressão de receptores CB₁ na mesma região. A imunohistoquímica com microscopia eletrônica permitiu elucidar a localização ultraestrutural dos receptores CB₂ no cérebro. Em contraste com os receptores CB₁, os CB₂ parecem ser expressos prioritariamente em processo dendríticos (densidades pós-sinápticas) e no corpo celular de neurônios (Onaivi et al., 2006).

Efeitos residuais do agonista sintético WIN55212-2, do agonista endógeno AEA e de antagonistas CB₁ em camundongos *knock-out* para receptores CB₁ sugerem a existência de pelo menos um terceiro tipo de

receptores canabinóides. Este receptor seria sensível ao antagonista SR141716A (rimonabant) e insensível ao antagonista AM251 (Begg et al., 2005; Brown, 2007). No entanto, o suposto “CB₃” ainda não foi conclusivamente caracterizado. Estas e outras evidências de novos receptores canabinóides serão discutidas posteriormente.

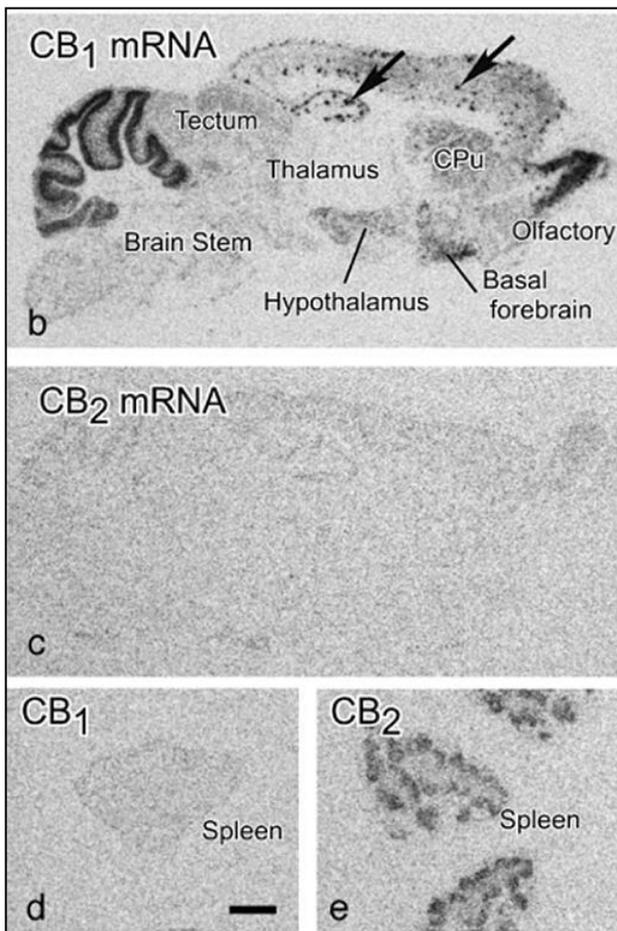


Figura 4 – Hibridização in situ para o RNAm dos receptores canabinóides CB₁ e CB₂ no cérebro (painéis maiores) e baço (painéis menores) de camundongos. Note a alta expressão de receptores canabinóides CB₁ no cerebelo, hipocampo, córtex, hipótlamo bulbo olfatório e prosencéfalo basal. Níveis baixíssimos de receptores canabinóides CB₂ são expressos no cérebro. De maneira inversa, os

receptores CB₂ são bastante expressos em tecidos linfóides periféricos. Escala de 1 mm. (Figura adaptada de Howlett et al., (2002).

1.3 - OS ENDOCANABINÓIDES, SÍNTESE E DEGRADAÇÃO

Os endocanabinóides AEA e 2-AG foram prontamente identificados, poucos anos após a clonagem dos receptores canabinóides CB₁ e CB₂. Ao longo dos anos subsequentes, diversos outros lipídeos foram “candidatos” a endocanabinóides, principalmente impulsionados pelo desconhecimento de que 2 receptores e 2 ligantes endógenos parecia um número um pouco limitado para explicar a complexidade e importância deste sistema de modulação neuronal. A figura 5 abaixo traz uma visão atualizada deste assunto, listando cinco moléculas que reconhecidamente interagem com receptores canabinóides, portanto considerados endocanabinóides.

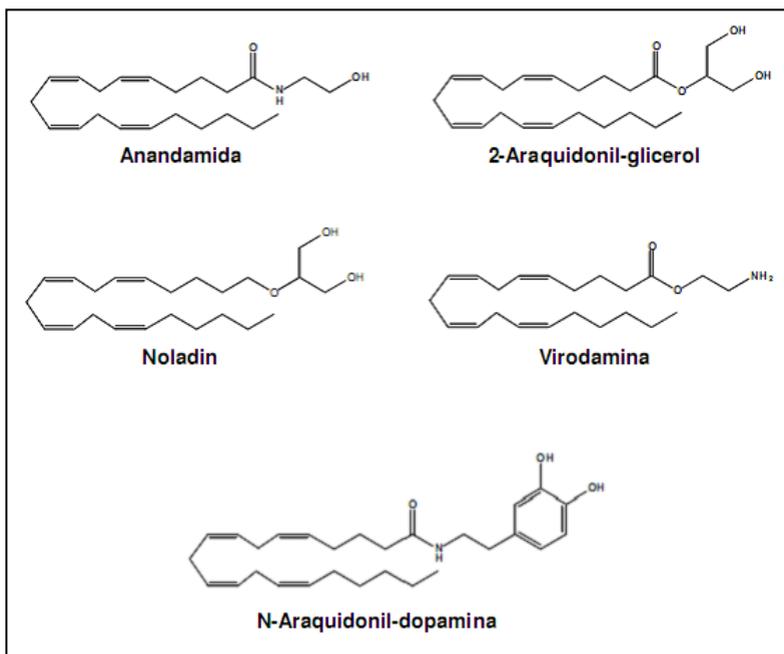


Figura 5 – Representação esquemática das estruturas moleculares dos endocanabinóides identificados e caracterizados até o momento. Outras moléculas têm sido estudadas, e o número de endocanabinóides pode chegar a mais de oito. (Figura modificada de Bisogno et al., 2005).

As vias de síntese de apenas dois endocanabinóides são conhecidas. O primeiro ponto importante a ser destacado é que os endocanabinóides não são sintetizados e armazenados em vesículas, como neurotransmissores clássicos, mas são sintetizados e liberados sob demanda após estimulação (Di Marzo e Deutsch, 1998). Uma similaridade estrutural entre os endocanabinóides é a sua natureza lipídica, sendo constituídos por uma cadeia de ácido graxo poliinsaturado derivado do ácido araquidônico e um grupamento polar, que pode ser etanolamina no caso da AEA ou glicerol no caso do 2-AG. Apesar de estruturalmente e algumas vezes funcionalmente similares, os dois endocanabinóides melhor caracterizados até hoje são produzidos por rotas biosintéticas distintas, ainda que não totalmente independentes. O metabolismo de endocanabinóides é um tema em constante investigação, mas nesta sessão estão descritos os modelos mais aceitos para a síntese e degradação da AEA e 2-AG.

Uma regra geral para a síntese dos endocanabinóides é que eles são sintetizados a partir de fosfolípídeos de membrana que são hidrolisados por fosfolipases às respectivas formas finais dos neurotransmissores. A AEA é formada em consequência da mobilização de fosfolípídeo de membrana (neste caso fosfatidil-araquidonato) que pela ação de uma N-acil-transferase é transformado em um N-araquidonil fosfatidil etanolamina (NAPE). Uma enzima fosfolipase D específica (NAPE-PLD) transforma a NAPE em AEA (Di Marzo et al., 1994). Uma via alternativa envolve a formação de N-araquidonil liso fosfatidil etanolamina por uma fosfolipase A_2 (PLA_2) e a formação de AEA por uma liso-PLD (Di Marzo et al., 1994; Sugiura et al., 1996). Os níveis de AMPc e de Ca^{+2} modulam a atividade da enzima N-acil-transferase, e por consequência, os níveis de substrato disponíveis para a síntese de AEA (Cadas et al., 1996). Além disso, a ativação de receptores dopaminérgicos D_2 , muscarínicos M_1/M_3 ou metabotrópicos de glutamato $mGluR_1$ podem deflagrar a síntese de AEA (Giuffrida et al., 1999; Varma et al., 2001; Kim et al., 2002; Ohno-Shosaku et al., 2003). A síntese de 2-AG pode ocorrer por duas vias independentes, provavelmente refletindo o fato de que esta molécula também participa de processos do metabolismo celular, além da neurotransmissão (Sugiura et al., 1995; Stella et al., 1997). Uma das vias sintéticas para o 2-AG envolve o segundo mensageiro diacilglicerol (DAG), que é produzido pela hidrólise de fosfolípídeos de membrana via fosfolipase C (PLC). O DAG é convertido a 2-AG por uma diacilglicerol lipase dependente de Ca^{+2} (DAG lipase) (Farooqui et al., 1989). Assim como

para a AEA, esta é uma via dependente de Ca^{+2} (Stella et al., 1997). Uma via alternativa envolve a formação de um liso-fosfolípido por uma fosfolipase A_1 (PLA_1), que é convertido a 2-AG por uma liso-PLC. Uma característica comum à síntese destes dois endocanabinóides é a dependência do aumento dos níveis intracelulares de Ca^{+2} e/ou da ativação de receptores metabotrópicos, o que concorda com a hipótese de síntese e liberação sob demanda em decorrência de estimulação neuronal.

Além das diversas possibilidades de rotas biosintéticas para os endocanabinóides, propõe-se que microdomínios membranares de constituição lipídica especializada, conhecidos como cavéolas e “jangadas” lipídicas, tenham participação na síntese de endocanabinóides (Placzek et al., 2008). As “jangadas” lipídicas (“lipid rafts”) são microdomínios enriquecidos em colesterol, esfingolípideos e ácido araquidônico (Brown e London, 2000; Pike et al., 2002); as cavéolas, além da constituição físico-química similar às “jangadas”, também expressam proteínas estruturais conhecidas como caveolinas que promovem invaginações localizadas na membrana plasmática (Pike et al., 2002; Razani et al., 2002). O papel das “jangadas” lipídicas e cavéolas na biosíntese dos endocanabinóides ainda não está claramente definido, mas há evidências de que a composição lipídica da membrana influencia a atividade das enzimas de síntese, o transporte celular (Mcfarland e Barker, 2004; Mcfarland et al., 2004), assim como a ligação dos endocanabinóides aos receptores canabinóides CB_1 (Bari et al., 2005). A existência de vias sintéticas diferentes para AEA e 2-AG sugere que estes endocanabinóides operam independentemente. Embora isso possa ser verdade em um grande número de casos, evidências recentes sugerem um refinado mecanismo de regulação orquestrada de biosíntese entre as vias sintéticas da AEA e 2-AG (Maccarrone et al., 2008). Considerando que os precursores moleculares dos endocanabinóides e suas enzimas sintéticas se encontram na superfície celular, combinado com a natureza lipídica destas moléculas, parece aceitável que estes neurotransmissores lipídicos sejam gerados na própria membrana celular e liberados dos neurônios para a fenda sináptica por difusão passiva ou facilitada por proteínas carreadoras de lipídeos (Piomelli, 2003).

Após a liberação e interação com os respectivos receptores, a ação dos endocanabinóides é terminada por captação neuronal e glial (Beltramo et al., 1997; Hillard et al., 1997). Supõe-se que a captação de endocanabinóides ocorra via um transportador protéico, cuja identidade

ainda não foi desvendada molecularmente. O que se sabe até o momento é que este processo é seletivo, saturável e dependente de temperatura, sensível à inibição farmacológica e compartilhado pela AEA, 2-AG e os outros endocanabinóides (Di Marzo et al., 1994; Beltramo et al., 1997; Hillard et al., 1997; Beltramo e Piomelli, 2000; Bisogno et al., 2001; Bisogno et al., 2005). Além disso, a captação de endocanabinóides é dependente de energia (ATP) e independente de Na^+ extracelular, de acordo com um modelo de difusão facilitada através da membrana celular (Di Marzo et al., 1994; Beltramo et al., 1997; Hillard et al., 1997). Diversas famílias de transportadores lipídicos rápidos e seletivos que seguem este modelo já foram caracterizadas, de maneira que a identificação do transportador endocanabinóide parece ser uma mera questão de tempo e paciência (Schaffer e Lodish, 1994; Hirsch et al., 1998; Abumrad et al., 1999). Após ser recaptada, a AEA é principalmente metabolizada a ácido araquidônico e etanolamina pela enzima amidohidrolase de ácidos graxos (FAAH) e o 2-AG é principalmente metabolizado a ácido araquidônico e glicerol pela lipase de monoacil glicerol (MAGL), e com baixa eficácia, também pela FAAH (Cravatt et al., 1996; Cravatt et al., 2001; Dinh et al., 2002). Ambas as enzimas de degradação são amplamente expressas em tecidos neuronais e em localização bastante próxima a dos receptores CB_1 . As semelhanças terminam por aí, enquanto a FAAH é encontrada em estruturas pós-sinápticas, a MAGL é encontrada nos terminais nervosos pré-sinápticos (Cravatt et al., 1996). Além disso, há evidências recentes de metabolismo oxidativo de endocanabinóides via enzimas ciclooxigenases, lipoxigenases e citocromos P450 (Kozak e Marnett, 2002; Van Der Stelt et al., 2002), sugerindo a existência de interação entre as vias metabólicas dos endocanabinóides, lipoxinas e prostaglandinas (Bisogno et al., 2005).

A ciclooxigenase (COX) 2 é responsável pela catálise da oxidação da AEA e 2-AG em vários derivados de prostaglandinas oxigenadas, nomeados de prostaglandina-etanolamidas (prostamidas) e ésteres de prostaglandina-glicerol (Woodward et al., 2008). Esta via oxidativa parece ser primariamente uma via de inativação, visto que a geração das prostamidas $\text{PGE}_2\text{-EA}$, $\text{PGA}_2\text{-EA}$ e $\text{PGB}_2\text{-EA}$ reduzem drasticamente a ligação da AEA aos receptores CB_1 (Pinto et al., 1994). A AEA é metabolizada pela COX-2 purificada ou expressa em cultura celular em altas concentrações de substrato (100 μM *in vitro*) e com baixa afinidade ($K_m=24\text{-}60 \mu\text{M}$ *in vitro*), e não é metabolizada pela COX-1 (Yu et al., 1997). O 2-AG também é metabolizado

exclusivamente pela COX-2 em uma reação que físico-quimicamente se assemelha muito à oxidação do próprio ácido araquidônico por esta enzima (Kozak et al., 2000; Kozak et al., 2001). A oxidação do 2-AG pela COX-2 geralmente leva à produção da PGH₂-G e do HETE-G, ambos lipídeos sem atividade biológica conhecida (Kozak et al., 2000; Kozak et al., 2001). As evidências listadas acima sugerem que a oxidação pode representar uma via metabólica de inativação para os endocanabinóides. Contudo, a relevância biológica da oxidação dos endocanabinóides pela COX-2 necessita ser confirmada, em especial para a AEA, cujos níveis endógenos são na faixa de nM e afinidade por esta enzima é particularmente baixa (Yu et al., 1997; Di Marzo, 1999). Há maior expectativa de que esta via de inativação oxidativa seja fisiologicamente relevante para o 2-AG, já que os níveis endógenos deste endocanabinóide são muito mais altos do que os da AEA e a COX-2 possui uma alta eficiência catalítica para esta molécula (Kozak et al., 2000). Na verdade o 2-AG é o substrato preferencial para a COX-2 dentre uma grande lista de ésteres de araquidonato (Kozak e Marnett, 2002). Mesmo se a conclusão final for que esta via oxidativa não possui grande importância em condição de equilíbrio fisiológico, é tentador pensar no seu possível papel em condições particulares onde ocorre uma super-expressão da COX-2 como nos processos inflamatórios. Além do mais, abre-se a possibilidade de que os famosos anti-inflamatórios não-esteroidais inibidores da COX-2 exerçam seus efeitos de analgesia e antipirese indiretamente pelo aumento do tônus endógeno de endocanabinóides, já que se sabe que os endocanabinóides controlam a temperatura corporal e modulam a nocicepção (Martin, 1985).

Ao contrário da proposta de que a oxidação promovida pela COX-2 seria uma via de inativação, o metabolismo dos endocanabinóides pela via das LOX gera derivados estruturais que mantêm atividade biológica considerável (Edgemond et al., 1998; Craib et al., 2001; Kozak e Marnett, 2002). As enzimas LOX apresentam uma afinidade razoável para os endocanabinóides, sendo que a 15-LOX possui maior atividade oxigenase, a 12-LOX uma atividade intermediária e a 5-LOX é praticamente inativa (Ueda et al., 1995). A AEA metabolizada pela 12-LOX mantém afinidade pelos receptores CB1, enquanto o derivado resultante da metabolização pela 15-LOX não se liga a receptores canabinóides, mas inibe a FAAH (Edgemond et al., 1998; Van Der Stelt et al., 2002). Outros derivados hidroxilados da AEA ainda não completamente identificados agem via receptores TRPV₁ (Craib et al., 2001). Por outro lado, o metabolismo do 2-AG pela

15-LOX gera um derivado hidroxilado que ativa receptores PPAR α (Kozak e Marnett, 2002). Interessante notar que estudos estruturais recentes demonstram que a 12-LOX é expressa em neurônios nas proximidades de receptores TRPV₁ (Cristino et al., 2008) e possivelmente também de CB₁, dada a alta co-localização de receptores vanilóides e canabinóides (Cristino et al., 2006). O 2-AG é um substrato preferencial da 12-LOX de leucócitos (Kozak e Marnett, 2002). A via lipoxidativa de metabolismo dos endocanabinóides possui maior ou menor relevância dependendo do tipo celular. Em plaquetas, por exemplo, onde a expressão de FAAH e COX-2 é praticamente desprezível, há evidência de que o metabolismo dos endocanabinóides ocorra prioritariamente sob responsabilidade das enzimas LOX (Kozak e Marnett, 2002). É razoável imaginar que um fenômeno similar possa ocorrer em outros tipos celulares.

O metabolismo dos endocanabinóides por citocromos P450 foi raramente estudado, mas há evidências sugerindo a geração de derivados não oxigenados da AEA por esta via, ainda sem função biológica definida (Bornheim et al., 1995). A exemplo do que já se sabia para o ácido araquidônico, foi identificado que os citocromos P450 microsossomais podem transformar os endocanabinóides em diversos outros derivados lipídicos, por reações enzimáticas complexas envolvendo epoxidação, ω -hidroxilação, lipoxigenação ou oxidação (Capdevila e Falck, 2001). Para a AEA, esta gama de possibilidades metabólicas pode resultar em até 20 diferentes lipídeos polarizados (Bornheim et al., 1993; 1995). A figura 6 abaixo resume as vias metabólicas para a AEA.

Apesar da imensa maioria dos estudos abordarem a metabolização dos endocanabinóides por vias que envolvam a modificação estrutural da porção araquidonil destes lipídeos, tanto a AEA quanto o 2-AG possuem grupamentos polares hidrofílicos que teoricamente poderiam ser alvo de metabolismo oxidativo. A investigação desta possibilidade resultou na descoberta de um derivado polar da AEA chamado de N-araquidonil glicina, que inaugurou a classe dos lipoaminoácidos (Burstein et al., 2000). Os autores do estudo sugeriram que a N-araquidonil glicina seja formada por uma oxidação seqüencial envolvendo enzimas álcool e aldeído desidrogenases. A investigação deste derivado estrutural é bastante promissora pois a N-araquidonil glicina exerce atividade antinociceptiva (Burstein et al., 2000; Huang et al., 2001), apesar de praticamente não se ligar aos receptores canabinóides CB₁ (Sheskin et al., 1997). Desta maneira,

outros efeitos comportamentais normalmente associados aos canabinóides não ocorrem após a administração de N-araquidonil glicina (Burstein et al., 2000). Já se sabe também que ela não se liga a receptores vanilóides TRPV₁ (Huang et al., 2001). O real mecanismo de ação deste e outros possíveis lipoaminoácidos permanece obscuro.

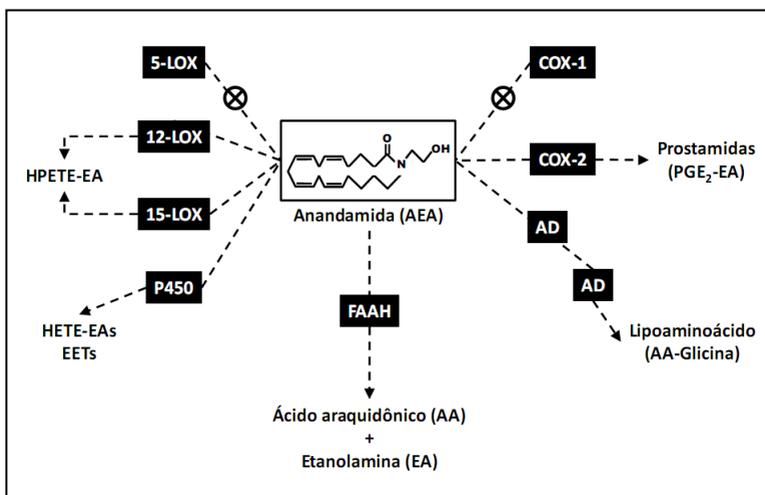


Figura 6 – Vias enzimáticas de degradação da anandamida (AEA). A principal via de degradação da AEA é a via da enzima amido hidrolase de ácidos graxos (FAAH), com geração de ácido araquidônico (AA) e etanolamina (EA). Alternativas incluem a via da 12 e 15 lipoxigenase (LOX), com geração de hidropoxi-eicosatetraenoil-etanolamidas (HPETE-EA); a via da cicloxigenase (COX) 2 com geração de prostamidas como a etanolamida da prostaglandina E2 (PGE₂-EA); a via dos citocromos P450 com geração de hidróxi-eicosatrienoatos de etanolamidas (HPETE-EAs) e ácidos epóxi-eicosatrienóicos (EETs) e a via seqüencial da álcool desidrogenase (AD) e aldeído desidrogenase (AD) gerando lipoaminoácidos como a araquidonil glicina. (Figura modificada de (Kozak e Marnett, 2002)).

Muito pouco se sabe sobre vias enzimáticas de síntese e/ou degradação dos outros endocanabinóides listados. Da mesma forma, a investigação das interações farmacológicas existentes entre as diversas classes de eicosanóides está apenas começando. Uma perspectiva interessante que se abre com a consideração das vias oxidativas, é que talvez existam vias que além de contribuir para a inativação dos endocanabinóides, possam catalisar a formação de derivados estruturais

com atividade intrínseca, seja em receptores canabinóides ou outros. Desta maneira, considera-se a via de biotransformação de canabinóides em uma esfera qualitativa, além da quantitativa, admitindo-se que determinados tecidos ou tipos celulares possam representar um ambiente bioquímico onde os efeitos canabinóides sejam “personalizados”. Inclusive, pode-se pensar em biotransformações que gerem derivados endocanabinóides ainda mais potentes do que os originais, ou que ajam em alvos mais interessantes do ponto de vista de potencial terapêutico. O estudo do metabolismo dos endocanabinóides certamente contribuirá para uma compreensão mais global de como as vias lipídicas interagem entre si para a regulação fina da neurotransmissão no SNC.

1.4 - FARMACOLOGIA DOS ENDOCANABINÓIDES

De uma maneira geral, os receptores CB₁ e CB₂ apresentam um sistema primário de transdução de sinal bastante semelhante. Ambos os receptores são acoplados a proteínas G_{i/o}, e atuam inibindo a adenilato ciclase (com a conseqüente diminuição dos níveis de AMPc), inibindo canais de Ca⁺² dependentes de voltagem dos tipos L, N, P, Q e ativando canais de K⁺ do tipo A. Receptores canabinóides também ativam a via de quinases ativadas por mitógeno (MAP) e da inositol-3-fosfato (PI₃) quinase entre outras vias intracelulares (revisado em Howlett et al., 2004; Pacher et al., 2006). A conseqüência funcional da ativação de receptores canabinóides é a supressão da excitabilidade neuronal e inibição da liberação de neurotransmissores induzida por despolarização, incluindo monoaminas, aminoácidos excitatórios e inibitórios, além de neuropeptídeos (Howlett et al., 2002). Apesar deste resumo geral dos efeitos da ativação de receptores canabinóides, já se tem notícia de que seus efeitos podem variar enormemente dependendo do tecido e tipo celular onde são expressos. Um experimento *in vitro* inclusive demonstrou que receptores CB₁ podem mediar efeitos excitatórios na célula. Neste experimento, onde o acoplamento a proteínas G inibitórias foi bloqueado farmacologicamente, a ativação de receptores CB₁ induziu uma estimulação da adenilato ciclase e aumento dos níveis do segundo mensageiro AMP através do acoplamento a proteínas G_s excitatórias, contrariando em muito a visão tradicional sobre estes receptores (Glass e Felder, 1997; Rhee et al., 1998).

É interessante notar que a eficácia de agonistas canabinóides depende da interação com as proteínas G_i ou G_o, de modo que há uma certa seletividade de sinalização metabotrópica dependendo do

endocanabinóide e do tecido observado (Glass e Northup, 1999). A eficácia de ativação dos receptores CB₁ varia dependendo do endocanabinóide em questão. A AEA age como um agonista parcial, induzindo níveis sub-máximos de acoplamento de proteína G e transdução do sinal, enquanto o 2-AG age como um agonista pleno nestes receptores, induzindo a maior resposta possível destes receptores em um dado tecido ou preparação (Sugiura et al., 1995; Hillard et al., 1999; Gonsiorek et al., 2000; Savinainen et al., 2001). Este fator pode ter importantes conseqüências para a modulação endógena da excitabilidade neuronal, dependendo se uma ou outra molécula é liberada. Esta “sensibilidade” dos receptores CB₁ mediando ação diferenciada para um ou outro ligante foi chamada de “seletividade funcional” e pode ser explicada pela indução de diferentes mudanças conformacionais no receptor e acoplamento a efetores intracelulares particulares, dependendo do ligante (Howlett, 2005; Mackie, 2008). Pelo menos parte desta seletividade de agonistas pode estar relacionada com a existência de diversos pontos de ligação nos receptores canabinóides, como sugerido por estudos de modelagem molecular (Reggio, 2003). Por exemplo, um sítio alostérico de modulação nos receptores CB₁ foi recentemente descrito, mas ainda não se tem informações sobre a ligação de prováveis ligantes endógenos neste sítio, sejam eles endocanabinóides ou de outra origem (Price et al., 2005).

Recentemente foi relatado que os receptores GPR55, anteriormente considerados órfãos, possuem sítios de ligação com alta afinidade para canabinóides endógenos, sintéticos e para antagonistas CB₁, apesar de apresentarem homologia estrutural de apenas 10-15% com os receptores CB₁ e CB₂. É importante deixar claro que o agonista canabinóide WIN55,212-2 não se liga aos receptores GPR55, de modo que estes receptores não representam o suposto CB₃, mas possivelmente uma quarta entidade no sistema endocanabinóide (Brown, 2007). Sugere-se que os receptores GPR55 sejam os receptores em que o canabidiol e derivados estruturais se ligam, e que antes eram descritos simplesmente como sítios não-CB₁, não-CB₂, por falta de evidência estrutural da existência de um novo tipo de receptor canabinóide. Em ratos, os receptores GPR55 são expressos em diversas regiões, destacando-se baço (à semelhança dos receptores CB₂) e cérebro (hipocampo, tálamo, córtex frontal, cerebelo, estriado, hipotálamo, tronco cerebral). Uma curiosidade é que estes receptores metabotrópicos são acoplados à proteína G₁₃, agindo indiretamente via proteínas G da família das Ras e não são acoplados às proteínas G_i como os outros

receptores canabinóides, nem a proteínas G “estimulantes” como a G_s ou G_q (Ryberg et al., 2007).

Além dos receptores membranares já mencionados, há evidências de que os endocanabinóides possam agir em receptores nucleares para lipídeos (O'Sullivan, 2007). Receptores PPAR pertencem a uma família de receptores nucleares, com três isoformas: α , δ e γ . Estes receptores se heterodimerizam com receptores retinóide X e se ligam a elementos responsivos a PPAR no DNA, levando à transcrição gênica. Entre as diversas classes de transmissores que atuam nos PPAR estão os ácidos graxos e seus derivados, de maneira que não surpreende que estes receptores possam participar da sinalização endocanabinóide.

A última classe de receptores que merecem ser mencionados são os receptores vanilóides TRPV₁, que embora não sejam parte do sistema endocanabinóide propriamente dito, são um dos alvos moleculares da molécula considerada o endocanabinóide protótipo, a AEA. Por este motivo, a descrição da farmacologia dos receptores TRPV₁ se faz necessária para a interpretação de alguns dos efeitos deste lipídeo. Os receptores TRPV₁ são canais iônicos não-seletivos permeáveis a Ca^{+2} e foram primariamente identificados no terminal pós-sináptico de neurônios sensoriais primários oriundos do gânglio da raiz dorsal. Mais recentemente estes receptores foram identificados também em regiões do cérebro, como o hipocampo e substância cinzenta periaquedutal, e estima-se que algumas das moléculas consideradas endocanabinóides tenham maior afinidade para estes receptores do que para os próprios receptores canabinóides. Por este motivo, alguns endocanabinóides, inclusive a própria AEA, foram recentemente chamados de endovanilóides (alguns autores brasileiros preferem o termo endobaunilhóide) (revisado em Starowicz et al., 2007). Uma interpretação alternativa poderia ser de que existe uma interação intensa entre os sistemas endocanabinóide e endovanilóide. Ligantes endógenos exclusivos (ou preferenciais) para os receptores TRPV₁ ainda não foram satisfatoriamente caracterizados. Os candidatos atuais para o posto de endovanilóides são eicosanóides derivados da lipoxigenase como o 12-HPETE (Shin et al., 2002). Veja resumo na tabela 1 abaixo.

Tabela 1 – Receptores-alvo para endocanabinóides

Endocanabinóide	CB ₁	CB ₂	GPR55	TRPV ₁	PPAR α	PPAR δ
AEA	++	++	++	++	++	++
2-AG	+++	+++	++	O	O	O
Noladin	++	+	++	O	++	O
Virodamina	-	++	+++	O	++	O
NADA	++	O	O	+++	O	O

Atividade dos ligantes endocanabinóides em receptores metabotrópicos (CB₁, CB₂ e GPR55), canal iônico ativado por ligante (TRPV₁) e receptores nucleares (PPAR α e δ). Legenda: O sem atividade, - antagonista, + agonista parcial fraco, ++ agonista parcial intermediário, +++ agonista total. AEA: anandamida, 2-AG: 2-araquidônol glicerol, NADA: n-araquidônol dopamina. (Adaptado de Alexander e Kendall, 2007).

Importante ressaltar que a funcionalidade seletiva e a existência de múltiplos receptores fazem com que os níveis dos receptores não sejam o único fator determinante da eficácia da transmissão endocanabinóide, uma vez que além da densidade relativa de receptores, as conseqüências da ativação destes receptores dependem intrinsecamente da eficiência de acoplamento aos sistemas de efetores moleculares (Breivogel et al., 1997). Contudo, o maior desafio neste campo da farmacologia molecular é diferenciar as interações molécula-receptor que são fisiologicamente relevantes daquelas que ocorrem unicamente devido a interações moleculares no ambiente artificial dos ensaios *in vitro* e, portanto, praticamente não existem em condições fisiológicas de liberação de endocanabinóides.

1.5 - A DINÂMICA DA SINAPSE ENDOCANABINÓIDE

Até pouco tempo atrás, a imagem de uma típica sinapse endocanabinóide era bastante simplificada. A Figura 7 abaixo ilustra os elementos básicos de uma sinapse deste tipo, segundo evidências das primeiras descobertas. Este conceito inicial da sinapse endocanabinóide foi bastante ampliado e aprofundado, de modo que hoje se cogita existirem cerca de 8 moléculas endocanabinóides, além de pelo menos 3 receptores onde elas se ligam.

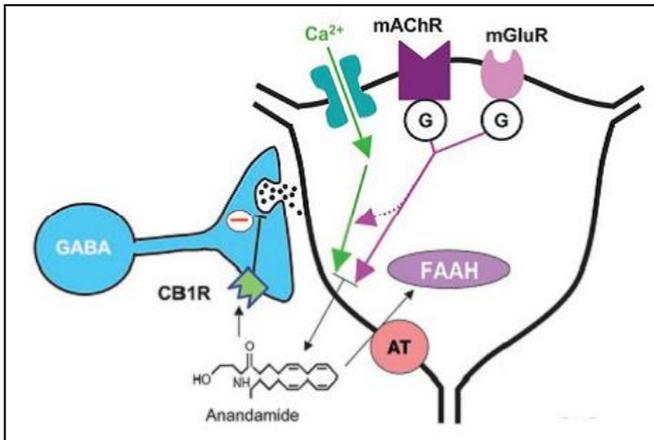


Figura 7 – Elementos básicos de uma sinapse endocanabinóide. Os receptores canabinóides CB1, presentes em terminais neuronais pré-sinápticos são ativados pela anandamida e inibem a liberação de neurotransmissor. Interessante notar que a anandamida é liberada da pós-sinapse para a pré-sinapse, um fenômeno conhecido como transmissão retrógrada e que possui um papel fundamental na plasticidade sináptica. A anandamida pode ser liberada em resposta ao influxo de Ca^{2+} (por exemplo, pela ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA) ou pela ativação de receptores metabotrópicos de acetilcolina (M1/M3), de glutamato (MAGLuR5) ou dopamina (D3), este último não demonstrado na figura. Uma vez terminada sua ação, a anandamida é recaptada por um sistema transportador ainda não identificado e metabolizada pela enzima FAAH a ácido araquidônico e etanolamina. (Figura adaptada de Alger, 2004).

O ciclo de vida de um endocanabinóide começa com sua síntese sob demanda após ativação neuronal e aumento dos níveis intracelulares de Ca^{+2} na pós-sinapse. A mobilização de precursores fosfolipídeos da membrana celular dá origem à AEA ou 2-AG, dependendo da rota sintética estimulada. O 2-AG, além de ser um endocanabinóide, é também um intermediário do metabolismo de fosfoglicerídeos, e por esta razão ele está presente em níveis consideráveis mesmo nas células em repouso. Este processo dinâmico de síntese e liberação sob demanda favorece que a ação dos endocanabinóides seja bastante pontual e restrita no plano espaço-temporal. Eles são moléculas sinalizadoras

desenhadas para atuar somente onde e quando forem necessárias, viajando da pós-sinapse para a pré-sinapse, como que sinalizando a “resposta” do neurônio pós-sináptico ao pré-sináptico, nesta verdadeira comunicação eletroquímica que são as sinapses neuronais. Por conta desta ação pouco usual no mundo da farmacologia, os endocanabinóides são chamados de neurotransmissores retrógrados (Wilson e Nicoll, 2002). Um típico exemplo de uma “rodada” de ação endocanabinóide está representado na figura 8 abaixo, levando em conta os endocanabinóides e receptores para os quais já se tem uma boa quantidade de detalhes sobre seu modo de ação. A ativação da célula pós-sináptica induz a produção de endocanabinóides, que atravessam a membrana celular e alcançam a fenda sináptica agindo de maneira retrógrada. Sítios proteicos de alta afinidade (receptores CB₁) são facilmente encontrados nos terminais pré-sinápticos de células inibitórias ou excitatórias, e quando ativados promovem diversos eventos celulares que culminam com a inibição da liberação do neurotransmissor característico da célula pré-sináptica e alteração de plasticidade sináptica pela ativação de vias de proteínas quinases e fatores de transcrição nuclear. Simplificando, a consequência funcional da ativação de receptores canabinóides é a supressão da excitabilidade neuronal e inibição da liberação de neurotransmissores induzida por despolarização, incluindo monoaminas, aminoácidos excitatórios e inibitórios, além de neuropeptídeos. Assim que a missão dos endocanabinóides é cumprida, eles são captados por um sistema seletivo, saturável e dependente de temperatura, muito provavelmente guiado por um transportador proteico compartilhado pela AEA e 2-AG. Assim que os endocanabinóides são captados pelos neurônios ou células gliais circundantes, as enzimas de degradação (FAAH para AEA e MAGL para o 2-AG) promovem a rápida metabolização destas moléculas em araquidonato e etanolamina (AEA) ou glicerol (2-AG). No entanto, também existem evidências de que os endocanabinóides possam gerar respostas celulares na própria célula que os sintetizou, após serem recaptadas. Um exemplo de sítio de ação neste caso são os receptores vanilóides TRPV₁, que possuem sítios intracelulares de interação com a AEA.

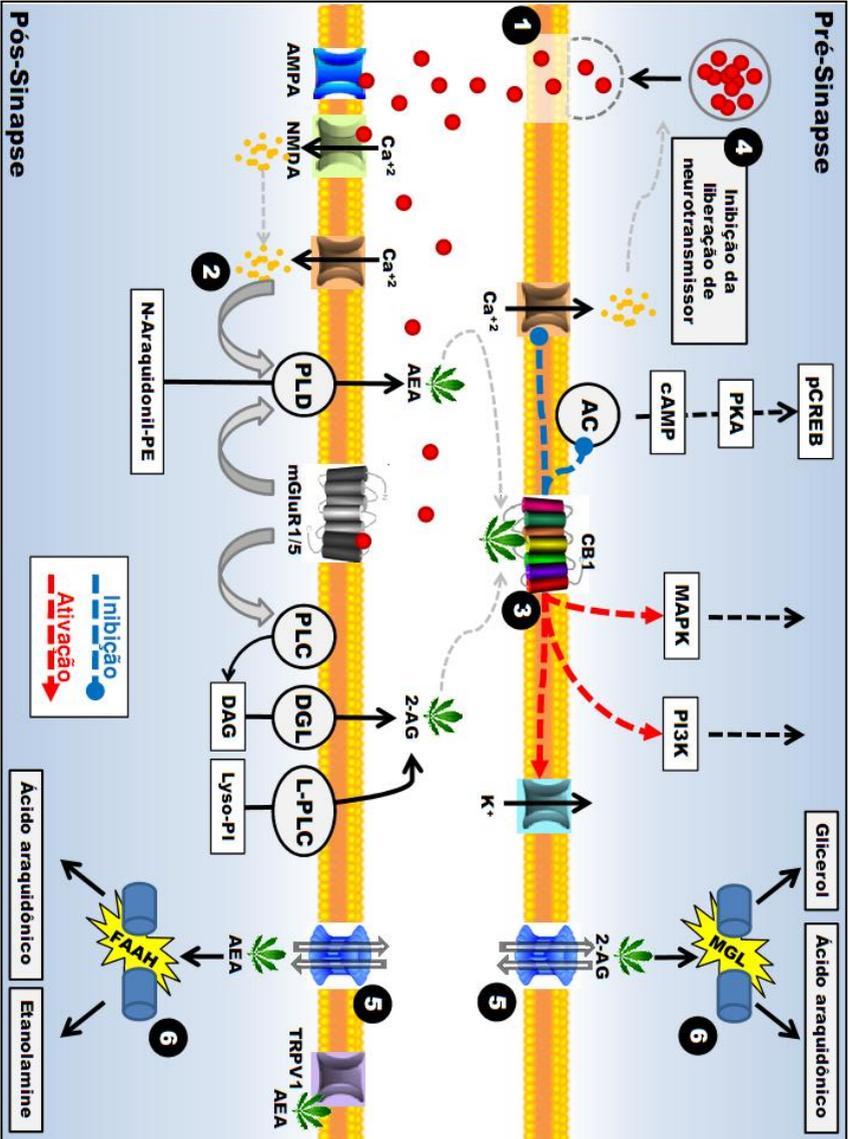


Figura 8 – O processo dinâmico de sinalização retrógrada endocanabinóide. Para uma explicação detalhada, leia a sessão “A dinâmica da sinapse endocanabinóide” acima. Abreviaturas utilizadas neste esquema – AEA: anandamida, 2-AG: 2-araquidonil glicerol, PLD: fosfolipase D, PLC: fosfolipase C, DAG: diacilglicerol, DGL: diacilglicerol lipase, L-PLC: liso fosfolipase C, L-PI: liso fosfatidil inositol, AC: adenilato ciclase, PKA: proteína quinase A, pCREB: fator de transcrição CREB fosforilado, MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno, PI₃K: proteína quinase do fosfatidilinositol, FAAH: amido hidrolase de ácido graxo, MAGL: monoacil glicerol lipase. Setas inteiras pretas indicam movimento, setas pontilhadas cinzas indicam sítio de ação, setas pontilhadas vermelhas indicam ativação, setas pontilhadas azuis indicam inibição. Os círculos vermelhos simbolizam neurotransmissores excitatórios ou inibitórios, dependendo do tipo celular da pré-sinapse. (Figura baseada em Chevalyre et al., 2006).

1.6 - INTERAÇÕES ENTRE OS ENDOCANABINÓIDE E OUTROS EICOSANÓIDES

Os endocanabinóides são neurotransmissores lipídicos que fazem parte de uma família de moléculas derivadas do ácido araquidônico, os eicosanóides. Os eicosanóides clássicos são constituídos dos prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos) e leucotrienos; enquanto uma definição mais moderna e abrangente do termo inclui também os derivados da lipoxigenase e endocanabinóides, entre outros (Fride, 2002).

Os prostanóides são derivados do ácido araquidônico obtidos como produto das enzimas cicloxigenases, os leucotrienos e lipoxinas são derivados das lipoxigenases, enquanto os endocanabinóides possuem enzimas distintas para sua síntese, ainda não completamente caracterizadas. Atualmente, sabe-se que muitas destas moléculas interferem direta ou indiretamente com o sistema endocanabinóide. A figura 9 acima traz uma visão global esquemática das vias dos eicosanóides, nomeando as 4 principais classes de ocorrência natural (leucotrieno, lipoxinas, prostanóides e endocanabinóides). A via de síntese da 15-epi-LXA₄, uma lipoxina gerada artificialmente como efeito da aspirina também é demonstrada na figura.

Figura 9 - Representação esquemática das vias sintéticas dos eicosanóides, incluindo seus receptores mais conhecidos. O ácido araquidônico é o precursor comum de prostaglandinas e outros prostanóides, endocanabinóides, leucotrienos e lipoxinas. Da esquerda para a direita: os leucotrienos e lipoxinas compartilham uma mesma via metabólica usando lipoxigenases (LOX) para geração do precursor 15-HPETE. Então, a leucotrieno hidrolase gera os leucotrienos, que agem nos receptores de leucotrienos (CysLT, BLT). Lipoxinas são geradas primariamente por uma via serial de LOXs e agem nos receptores ALX (especialmente a lipoxina A₄, LXA₄), antes chamados de FPRL-1. Uma via alternativa para a síntese de da 15-epi-lipoxina A₄ (15-epi-LXA₄) ocorre via acetilação da ciclooxigenase (COX) 2 pela aspirina. (Por este motivo a 15-epi-LXA₄ é denominada lipoxina liberada por ação da aspirina). Prostaglandinas são sintetizadas pelas enzimas COX_{1/2} e agem nos receptores de prostaglandinas (PGD, PGE, PGI, PGF). Endocanabinóides são sintetizados pela via da fosfolipase D (PLD) para anandamida (AEA) ou via diacilglicerol lipase (DAGL) para o 2-araquidonil glicerol (2-AG, não representado) e ativam os receptores CB₁/CB₂. Aspirina inibe as enzimas COX e acetila a COX-2. Linhas pontilhadas representam vias sintéticas. Linhas cheia representam sítios de ação. (Figura modificada de Pamplona et al., 2010).

1.7 - LIPOXINAS: DA PERIFERIA AO CÉREBRO

As lipoxinas são compostos endógenos que constituem uma família de eicosanóides amplamente envolvidos em eventos celulares relacionados ao sistema imunológico. Os representantes mais comuns desta família são o ácido 5S,6R,15S-tri-hidroxi-7,9,13-trans-11-cis-eicosatetranoico (lipoxina A₄; LXA₄) e o seu isômero estrutural, o ácido 5S,14R,15S-tri-hidroxi-6,10,12-trans-8-cis-eicosatetranoico (lipoxina B₄), além da 15-epi-lipoxina A₄ e da 15-epi-lipoxina B₄, formadas pela inibição da ciclooxigenase 2 provocada pela aspirina (Claria e Serhan, 1995; McMahan et al., 2001). A LXA₄ foi descoberta na década de 80 pelo pesquisador americano Carlos Serhan, durante seu período como pesquisador visitante no Instituto Karolinska, Suécia (Serhan et al., 1984). Este mesmo pesquisador prestou um grande serviço a este campo científico tendo descoberto também os receptores e várias importantes funções fisiológicas das lipoxinas. A lipoxina gerada pela aspirina também foi descoberta 10 anos depois da endógena pelo mesmo grupo. Não seria exagero considerar Serhan o “pai” da lipoxina A₄...

O primeiro experimento funcional, após a caracterização química da LXA₄, investigou seus efeitos no ensaio farmacológico do órgão isolado. A preparação utilizada foi tiras de pulmão de porco, onde os

estudos de estrutura-atividade demonstraram que entre os diversos isômeros possíveis, a orientação 5S, 6R dos grupamentos hidroxilas próximos à terminação carboxílica caracterizavam a LXA₄ biologicamente ativa. Além disso, a LXA₄ estimula o rápido remodelamento lipídico e liberação de ácido araquidônico em polimorfonucleares humanos *in vitro* de maneira sensível ao tratamento com toxina pertussis, indicando necessidade de acoplamento à proteína G_{i/o} (Grandordy et al., 1990; Nigam et al., 1990). A estereoespecificidade, juntamente com a evidência de participação de segundos mensageiros nos efeitos da LXA₄ sugeria a existência de um sítio de reconhecimento específico, que de fato foi descoberto anos depois pelo grupo de Serhan, nesta época com laboratório próprio estabelecido nos Estados Unidos (Brink et al., 2003). Na mesma levada, descobriu-se que a 15-epi-LXA₄ era produzida no fígado e nos rins em resposta à administração de aspirina, onde suas ações eram muito semelhantes às ações da LXA₄ de ocorrência natural (Munger et al., 1999).

Desde o seu descobrimento, há cerca de 20 anos atrás, as lipoxinas têm sido intensamente estudadas como agentes anti-inflamatórios naturalmente sintetizados pelos organismos, cuja produção e liberação está relacionada à resolução “programada” de processos inflamatórios (McMahon et al., 2001). Lipoxinas exercem seus efeitos anti-inflamatórios por regulação de eventos pró-inflamatórios como a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Hachicha et al., 1999), a rolagem e aderência de leucócitos na microcirculação (Scalia et al., 1997), liberação de interleucina 8 (IL-8) induzida por TNF α ou patógenos externos (Gewirtz et al., 1998; Gronert et al., 1998). O efeito geral é a regulação do excesso de ativação leucocitária, inibição da infiltração de polimorfonucleares e diminuição da permeabilidade vascular (Takano et al., 1998). Evidências mais recentes sugerem que a inibição da via do fator de transcrição NF κ B seja um dos elementos mecanísticos centrais para os efeitos anti-inflamatórios da LXA₄ (Gewirtz et al., 2002). Apesar do notório sucesso dos grupos envolvidos nas investigações do papel da LXA₄ na regulação dos fenômenos inflamatórios enumerados acima, acredita-se que a importância destes mediadores na fisiologia animal seja ainda maior, como destaca Andrew Rowley, pesquisador do grupo de Carlos Serhan: *“apesar das lipoxinas serem estruturas moleculares bastante conservadas ao longo da evolução das espécies, sendo produzida por mamíferos, peixes e até anfíbios, as suas potenciais funções fisiológicas ainda não foram amplamente testadas fora do contexto da inflamação e do sistema*

imune” (Rowley et al., 1994). Hoje, cerca de 15 anos depois da publicação, esta afirmação continua sendo verdadeira.

As enzimas responsáveis pela síntese de lipoxinas são as lipoxigenases (5-, 12- ou 15-LOX), que catalisam a formação de lipoxina a partir do ácido araquidônico, passando por um intermediário conhecido como 15-HPETE (Serhan et al., 1984) (ver figura 10 abaixo). As lipoxinas são rapidamente metabolizadas por rotas de desidrogenação e oxidação (Boarder e Hourani, 1998). Por isso, considerando o potencial terapêutico das lipoxinas em certas áreas da medicina, há o investimento na obtenção de análogos estáveis que sofrem menor metabolização, especialmente nos carbonos 15-16 e 20, sítios de maior ação dos mecanismos acima mencionados. Os análogos estáveis disponíveis possuem atividade biológica similar a das lipoxinas de ocorrência natural, mas com muito maior biodisponibilidade. A estabilidade aumentada destes análogos sintéticos nos modelos inflamatórios testados sugerem que eles podem ser de interesse médico-farmacêutico (Lustig et al., 1993; Barnard et al., 1997).

As lipoxinas possuem receptores próprios, conhecidos como receptores ALX, nos quais a LXA₄ e seus derivados estruturais (como a 15-epi-LXA₄) se ligam com alta afinidade e potência, com efeitos biológicos na faixa de nanomolar (Chiang et al., 2003). Os receptores ALX foram inicialmente identificados em cultura de células HL-60 (Fiore et al., 1994) e poucos anos depois clonados a partir de material murino (Takano et al., 1997). A homologia estrutural entre os receptores de roedores e humanos é em torno de 75-80% (Chiang et al., 2003). Além do sítio de lipídeos, onde se liga a LXA₄ e derivados, os receptores ALX também possuem um sítio para interação de peptídeos, onde se liga o peptídeo derivado da anexina 1 (Perretti et al., 2002). Os efeitos da lipoxina B₄, no entanto, estão relacionados à ativação de outro tipo de receptores ainda não completamente identificados (Brink et al., 2003). O sistema de transdução de sinal dos receptores ALX ainda é pouco conhecido e aparentemente varia dependendo do tipo celular. Em neutrófilos polimorfonucleares, por exemplo, os receptores ALX são receptores acoplados à proteína G_i, inibindo a produção do segundo mensageiro inositol-tri-fosfato (IP₃) e conseqüentemente a mobilização de Ca⁺² intracelular (Lee et al., 1989; Grandordy et al., 1990). Já em monócitos e células THP-1 transfectadas, a ativação dos receptores ALX pela LXA₄ provoca o acúmulo de Ca⁺², sugerindo sinalização intracelular distinta, apesar dos mesmos receptores membranares (Romano et al., 1996).

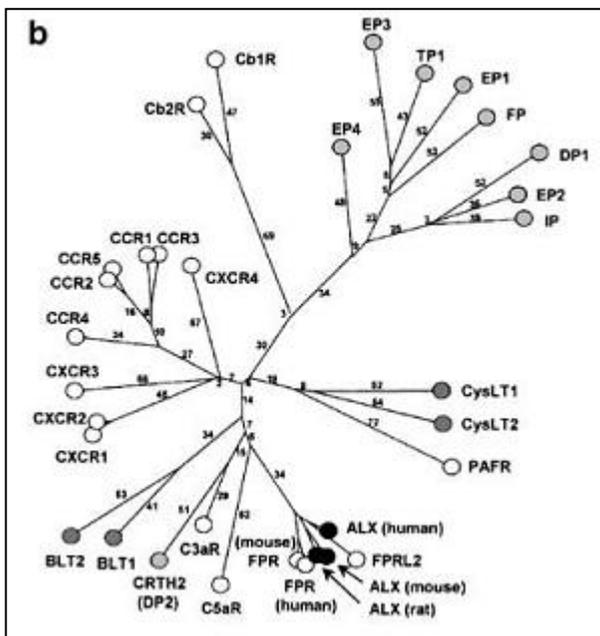


Figura 10 – Árvore filogenética relacionando os receptores ALX com outros receptores metabotrópicos para lipídeos, incluindo os de eicosanóides. Destaca-se a alta homologia entre os receptores ALX e os receptores de formil peptídeos (os receptores ALX já foram chamados de “receptores tipo receptores de formil peptídeo”) e a baixa homologia com receptores canabinóides CB₁ e CB₂. Esta árvore foi construída com o programa “All All Program” do servidor de bioquímica computacional, disponível em (<http://crbg.inf.ethz.ch/Server/AllAll.html>). (Figura modificada de Chiang et al., 2003).

A expressão dos receptores ALX foi demonstrada em diversos tecidos onde a LXA₄ exerce importante função na regulação do processo inflamatório como o endotélio (Serhan, 1997), epitélio (Godson e Brady, 2000), tecido pulmonar (Brink et al., 2003), coração (Chiang et al., 2003), fígado (Chiang et al., 2003), baço (Chiang et al., 2003), além de tipos celulares como os monócitos (Serhan, 1997), neutrófilos (Serhan, 1997) e fibroblastos (Mcmahon et al., 2001). Ainda não há evidências conclusivas sobre a expressão dos receptores ALX no SNC, embora se saiba que a LXA₄ pode ser sintetizada em tecidos cerebrais durante eventos isquêmicos (Kim, 1988). Atualmente, sabe-se que além

das lipoxinas, outros mediadores celulares ativam os receptores ALX, muitas vezes com efeitos biológicos inversos (Su et al., 1999). Deste fato surge a curiosidade de saber se a própria LXA₄ também poderia se ligar a outros alvos celulares.

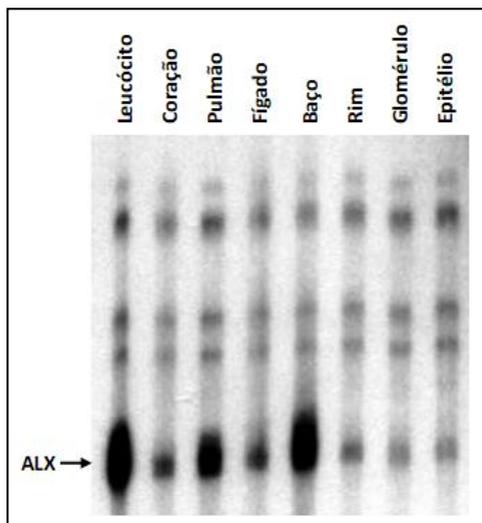


Figura 11 – Localização tecidual dos receptores ALX demonstrada por técnica de Western blot. (Figura modificada de Chiang et al., 2003).

Raros estudos têm sido realizados sobre os efeitos dos derivados da LOX no SNC, embora sua presença no cérebro tenha sido relatada anteriormente (Kim, 1988; Simmet e Peskar, 1990). Os relatos de efeitos centrais da LXA₄ se limitam a uns poucos estudos publicados entre o final da década de 80 e início da década de 90. Sri Kantha et al. (1994) foram pioneiros em demonstrar efeitos *in vivo* da LXA₄ no SNC. Naquele estudo, os autores demonstraram que a LXA₄ infundida no terceiro ventrículo cerebral (100 μ mol/min) provoca um aumento de cerca de 20% na duração do sono de ondas lentas, sem promover qualquer alteração na duração do sono REM (Sri Kantha et al., 1994). Além disso, Shearman et al. (1989) também trouxeram contribuições importantes para o entendimento das ações da LXA₄ no SNC, demonstrando que esta molécula é capaz de promover a ativação seletiva do sub-tipo γ da proteína quinase C (γ -PKC), cuja expressão ocorre majoritariamente no cérebro (Shearman et al., 1988; Shearman et

al., 1989), com ativação inexpressiva dos subtipos α e β , que são expressos amplamente em outros tecidos não-neuronais (Huang et al., 1986; Shearman et al., 1988). Esta ação da LXA₄ no sub-tipo neuronal de PKC pode estar relacionada aos seus efeitos eletrofisiológicos envolvidos na plasticidade sináptica e frequentemente relacionados a processos de aprendizado e memória (Shearman et al., 1989; Mcgaugh, 2000). Neste contexto, a indução de potenciação de longo-prazo (LTP) em fatias de hipocampo foi drasticamente reduzida por um inibidor da 5-LOX (Williams e Bliss, 1988). Estes achados sugerem a participação de derivados da LOX, na indução de LTP em fatias de hipocampo. Contudo, apesar destas evidências de efeitos da LXA₄ no cérebro, ainda não se tem relatos de que estes efeitos estejam relacionados à ativação de seus receptores ALX ou de quaisquer outros receptores. Tendo em mente que pouco se sabe a respeito da farmacologia das lipoxinas no SNC, torna-se importante que sejam identificados os mecanismos responsáveis pelos efeitos biológicos observados para estas moléculas. Interessante notar que estes efeitos centrais produzidos pela lipoxina A₄ (ativação de γ -PKC, indução de sono de ondas lentas, participação na indução de LTP e liberação durante eventos isquêmicos) são todos também produzidos pela ativação de receptores canabinóides CB₁ (De Petrocellis et al., 1995; Murillo-Rodriguez et al., 1998; Berger et al., 2004; De Oliveira Alvares et al., 2006); de modo que, além da similaridade estrutural decorrente da coincidência de precursor lipídico (ácido araquidônico), há uma semelhança funcional entre os efeitos centrais da LXA₄ e do endocanabinóide protótipo AEA (vide tabela 2 abaixo).

Tabela 2 – Efeitos da LXA₄ e AEA no SNC

Efeito no SNC	Derivados da LOX	Endocanabinóides
Ativação de PKC γ	<i>LXA₄ ativa a PKCγ (neuronal) in vitro</i>	<i>AEA ativa a PKCγ (neuronal) in vitro</i>
Sono de ondas lentas	<i>LXA₄ i.c.v. aumenta a duração do sono de ondas lentas, sem alterar o sono REM</i>	<i>AEA aumenta a duração do sono de ondas lentas</i>
Liberação no cérebro	<i>LXA₄ é liberada no cérebro durante eventos isquêmicos</i>	<i>AEA é liberada no cérebro durante eventos isquêmicos</i>
Indução de LTP	<i>Inibidor da 5-LOX prejudica a indução de LTP no hipocampo</i>	<i>Bloqueio dos receptores CB₁ prejudica a indução de LTP no hipocampo</i>

PKC: proteína quinase C, LTP: potenciação de longo prazo, 5-LOX: 5-lipoxigenase, LXA₄: lipoxina A₄, AEA: anandamida

2 - JUSTIFICATIVA

Relatadas algumas similaridades entre as ações da LXA₄ e de endocanabinóides em funções do SNC e tendo em mente a coincidência de precursor biosintético (ácido araquidônico), assim como a elevada similaridade estrutural entre a LXA₄ e a AEA, especula-se que possa haver uma inter-relação entre as ações destes sistemas de neurotransmissão. Especificamente, alguns resultados envolvendo os ligantes principais destes sistemas apresentam evidências contundentes que justificariam a investigação de uma possível inter-relação entre eles:

- 1) AEA e LXA₄ possuem atividades no SNC que estão relacionadas à ativação de proteína G (Pertwee, 1997; Brink et al., 2003) e dependem da ativação de proteína quinase C (Shearman et al., 1989; De Petrocellis et al., 1995).
- 2) AEA e LXA₄ aumentam a duração do sono, com particular potencialização do sono de ondas lentas (Sri Kantha et al., 1994; Murillo-Rodriguez et al., 1998).
- 3) AEA e LXA₄ são liberadas no cérebro em eventos isquêmicos (Kim, 1988; Berger et al., 2004).
- 4) O bloqueio de receptores CB₁ ou a inibição da 5-lipoxigenase prejudicam a indução de LTP em fatias de hipocampo (Williams e Bliss, 1988; De Oliveira Alvares et al., 2006).

Portanto, considerando que as funções da LXA₄ no cérebro ainda não foram relacionadas à ativação de receptores farmacológicos específicos, mas se assemelham à ação dos endocanabinóides; somado ao fato de que sabidamente a LXA₄ atua em receptores farmacológicos distintos, além dos dela própria, o presente trabalho se propõe a investigar uma possível participação do sistema endocanabinóide nas ações centrais da lipoxina A₄.

3 - OBJETIVO

3.1 - GERAL

Investigar a participação do sistema endocanabinóide nos efeitos centrais da LXA₄ em camundongos.

3.2 - ESPECÍFICOS

- 1) Investigar os efeitos da administração i.c.v. da LXA₄ nos parâmetros de locomoção, temperatura corporal, catalepsia e sensibilidade à dor; todos eles considerados preditivos para ação canabinóide.
- 2) Verificar os efeitos de antagonistas de receptores canabinóides CB₁ e do receptor da lipoxina ALX sobre os efeitos da LXA₄ nos parâmetros acima mencionados.
- 3) Caracterização dos efeitos da LXA₄ em ensaios bioquímicos, descrevendo a participação de elementos do sistema endocanabinóide de modo a investigar um possível mecanismo de ação para os efeitos centrais da LXA₄.
- 4) Investigar se os níveis fisiológicos de LXA₄ contribuem para a atividade endocanabinóide.
- 5) Investigar se a 15-epi-LXA₄, gerada por efeito da aspirina, compartilha dos mesmos efeitos observados para a LXA₄ de ocorrência natural.

4 – MÉTODOS

4.1 – ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss albino e ratos Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil). Camundongos C57Bl/6NCrl foram comprados dos Laboratórios Charles River (Sulzfeld, Alemanha ou Janvier, França) e utilizados no país de origem. Camundongos knock-outs para os receptores CB_1 ($CB_1^{-/-}$) e seus respectivos controles ($CB_1^{+/+}$) foram gerados no Instituto Max Planck de Psiquiatria (Munique, Alemanha) e utilizados em experimentos nesta instituição. Todos os animais utilizados eram machos adultos, com cerca de 3 meses na data de experimentação. Os camundongos foram mantidos em caixas coletivas (42 x 34 x 17 cm), contendo 15-20 indivíduos (exceto $CB_1^{+/+}$ e $CB_1^{-/-}$, mantidos em gaiolas individuais), com condição controlada de temperatura (23 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h, fase clara das 7:00 às 19:00). Água e ração especial para roedores foram providas ad libitum. Todos os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram realizados em grupos independentes de animais e conduzidos cuidadosamente de acordo com as normas do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC), que segue normas internacionais de utilização de animais para pesquisa científica.

4.2 – SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Para administração por via intracerebroventricular (i.c.v.), lipoxina A_4 (LXA_4), 15-epi-lipoxina A_4 (15-epi- LXA_4) e anandamida (AEA) foram dissolvidas em solução de etanol 0,5% e o 2-Araquidonil glicerol (2-AG) foi dissolvido em solução de acetonitrila 0,5%, ambos em salina tamponada com fosfato (PBS 0,1 M). BOC-2 foi dissolvido somente em PBS. Para administração por via intraperitoneal (i.p.), SR141716A (Rimonabant), MK-886 e BOC-2 foram dissolvidos em solução fisiológica (NaCl 0,9%) contendo dimetilsulfóxido 10% (DMSO) e Tween 80 0,1%. Para administração por via oral (p.o.), a aspirina foi suspensa em solução fisiológica contendo carboximetilcelulose 0,5% (CMC). Para os ensaios in vitro, SR141716A, WIN-55212,2, URB597, MAFP, LXA_4 e AEA foram dissolvidos em 0,5% etanol em tampão de ensaio, enquanto o 2-AG for dissolvido em acetonitrila 0,5%. Os

veículos utilizados para dissolução/suspensão das drogas foram utilizados como soluções controle. O volume de injeção foi de 2 ou 5 µl por animal para via i.c.v e 0,1 ml / 100 g de peso corporal para via i.p. e p.o. As doses de LXA₄, 15-epi-LXA₄, AEA e 2-AG utilizadas foram definidas em experimentos piloto. As doses das outras drogas foram selecionadas com base na literatura (Raffa et al., 1999; Da Silva e Takahashi, 2002; Souza et al., 2003; Von Der Weid et al., 2004; Takahashi et al., 2005; Bisogno et al., 2006; Menezes-De-Lima et al., 2006; Pamplona e Takahashi, 2006). A tabela 3 abaixo traz uma lista das substâncias utilizadas.

Tabela 3 – Mecanismo de ação das substâncias utilizadas no presente trabalho.

Substância	Abreviação	Mecanismo de ação conhecido
Lipoxina A ₄	LXA ₄	Agonista dos receptores ALX
15-epi-lipoxina A ₄	15-epi-LXA ₄	Agonista dos receptores ALX
Boc-2	-	Antagonista dos receptores ALX
Anandamida	AEA	Agonista dos receptores CB ₁ /CB ₂
2-Araquidônol glicerol	2-AG	Agonista dos receptores CB ₁ /CB ₂
WIN55212-2	-	Agonista dos receptores CB ₁ /CB ₂
SR141716A	-	Antagonista dos receptores CB ₁
MK-886	-	Inibidor da enzima 5-LOX
URB597	-	Inibidor da enzima FAAH
MAFP	-	Inibidor da enzima MAGL
Aspirina	-	Inibidor das enzimas COX

4.3 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 – Administração intracerebroventricular

A administração das drogas por via i.c.v. foi realizada segundo metodologia de administração freehand descrita por Haley e McCormick (1957) e adaptada por Laursen e Belknap (1986). Os camundongos foram levemente anestesiados com isoflurano em câmara apropriada para a realização do procedimento. A injeção foi realizada com uma agulha (13 x 0,4 mm; 26 Gauge), acoplada por meio de um tubo de polietileno 10 a uma microseringa (Hamilton) com capacidade de 10 μ L. O comprimento da agulha foi ajustado com um anteparo de tubo de polietileno para se obter uma incisão de aproximadamente 2,5 mm de profundidade. A cabeça do animal foi mantida em posição horizontal fixa pelo experimentador e o sítio de injeção foi definido guiando-se por duas linhas imaginárias traçadas a partir da base das orelhas e da linha medial do crânio, dividindo a cabeça do animal em quatro quadrantes (figura 12). A injeção foi realizada com a agulha posicionada perpendicularmente ao osso do crânio a cerca de 2-3 mm (rostral) da linha base das orelhas, próximo ao limite da pele circundando a cavidade ocular e aproximadamente na metade da distância entre a base das orelhas e os olhos. A injeção foi realizada unilateralmente a 1-2 mm (lateral) da intersecção destas linhas imaginárias e os hemisférios direito e esquerdo foram intercalados no mesmo grupo experimental. Na figura 12, a intersecção entre as linhas pontilhadas finas demonstram os sítios aproximados de injeção. O volume total de injeção foi de 2 ou 5 μ L, conforme indicação no experimento, e os animais foram avaliados comportamentalmente 5 min após a administração i.c.v. A solução foi injetada gradualmente e os animais apresentaram comportamento aparentemente normal cerca de 1-2 min após a injeção.

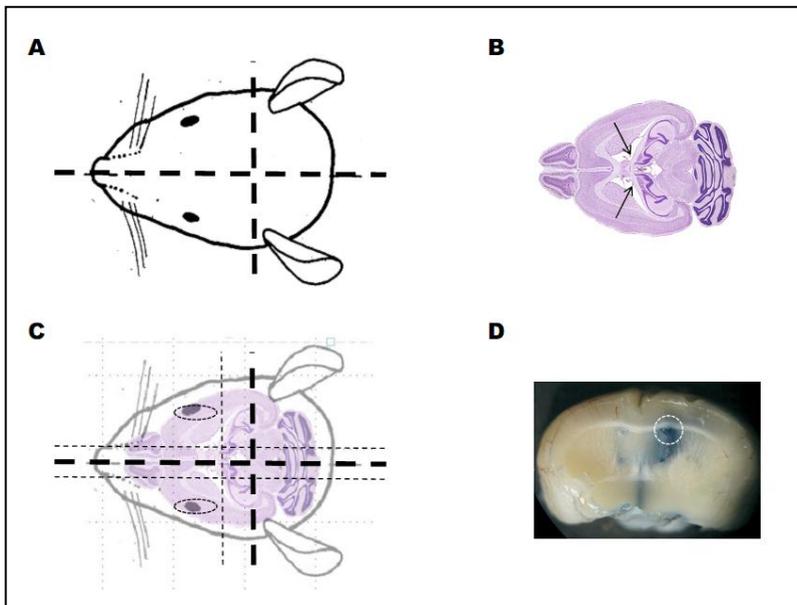


Figura 12 - Representação da técnica utilizada para injeções i.c.v. freehand descrita por Haley e McCormick (1957) e adaptada por Laursen e Belknap (1986). (A) Orientação baseada em pontos específicos da cabeça do camundongo. Uma linha imaginária coronal na base das orelhas e uma linha imaginária sobrepondo a linha medial do crânio do animal são traçadas (linhas pontilhadas grossas). (B) Corte transversal de cérebro de camundongo indicando as regiões ventriculares onde se deseja realizar a injeção de substâncias pelo método descrito. (C) Justaposição das orientações anatômicas externas e do corte transversal de cérebro. As linhas pontilhadas finas são linhas imaginárias secundárias, a coronal cerca de 2-3 mm rostral da linha base das orelhas, na altura de uma linha que se aproxima da pele delineando a cavidade ocular quando a cabeça do animal é mantida em posição horizontal entre o dedo indicador e polegar do experimentador, e as duas cerca de 1-2 mm laterais à linha medial. A intersecção das linhas pontilhadas finas demonstra os sítios aproximados de injeção em cada hemisfério. (D) Fotografia de corte coronal de cérebro de camundongo injetado por este método com corante Azul de Evans. O círculo pontilhado demonstra o local de injeção e a cor azul o extravasamento da solução de corante por todo o sistema ventricular. Figuras adaptadas do artigo original de descrição da técnica (Haley e McCormick, 1957), do atlas neuroanatômico de camundongos (Paxinos e Franklin, 2001) e de um artigo de nosso grupo (Prediger et al., 2008).

A porcentagem de injeções realizadas corretamente na região ventricular foi de cerca de 90%, verificadas a olho nu pelo traço da agulha injetora, e descontados animais com quaisquer sinais de hemorragia cerebral, de acordo com descrição prévia de taxa de acerto dos experimentos realizados em nosso laboratório (Prediger et al., 2008).

4.3.2 – Procedimentos comportamentais *in vivo*

Todos os experimentos comportamentais foram idealizados de modo a minimizar o número de animais utilizados e realizados seguindo estritamente normas internacionais de cuidado e manuseio de animais para experimentação científica. Cada bloco de experimentos foi realizado no mesmo período do dia, durante a fase clara, de modo a minimizar a influência de flutuações do ritmo circadiano dos animais. As salas de experimentação foram mantidas com temperatura (23 ± 2 °C) e luminosidade (aproximadamente 100 lux) controladas no período de habituação (pelo menos 1 hora antes dos experimentos) e durante o experimento.

4.3.2.1 – Testes preditivos para atividade canabimimética

Os testes preditivos para atividade canabimimética em camundongos foram realizados conforme descrição em revisão recente (Fride et al., 2006), em grupos independentes de animais. Uma ilustração dos testes pode ser vista na figura 13.

Campo aberto: a locomoção foi avaliada em um campo aberto (30 x 30 x 15 cm) construído em acrílico transparente, com o assoalho pintado de preto e dividido em 9 quadrantes de 10 x 10 cm. Os animais foram avaliados por 5 min (movimentação livre) e o número de cruzamentos nas linhas que demarcam os quadrantes foi utilizado como parâmetro de atividade locomotora.

Catalepsia: a catalepsia foi avaliada utilizando uma barra de vidro posicionada horizontalmente a 5 cm do chão. Os animais foram posicionados individualmente com as patas dianteiras apoiadas na barra horizontal, de modo a permanecerem numa posição vertical ereta, porém apoiados com a porção distal do corpo e as patas sobre a bancada. Foram realizadas três reconduções a esta posição por um período total máximo de 300 s. O somatório do tempo de imobilidade das três reconduções foi utilizado como parâmetro de catalepsia.

Temperatura retal: a temperatura corporal foi avaliada por um termômetro digital (Cole-Parmer, modelo 8402-00, Estados Unidos da América) acoplado a uma sonda retal apropriada para uso em camundongos. A sonda foi lubrificada com vaselina e introduzida cerca de 30 mm no reto dos animais. A temperatura foi registrada quando se manteve estável por pelo menos 10 s. O registro da temperatura foi realizado 1 h antes e 5 min após a administração i.c.v.

Placa quente: a nocicepção foi avaliada em uma placa quente (Insight, Brasil), ajustada para uma temperatura de $55 \pm 0,5$ °C pelo menos 1 h antes dos experimentos. Após a estabilização da temperatura, os animais foram colocados individualmente na placa quente e a latência (s) para lambida da pata traseira foi utilizada como parâmetro nociceptivo.

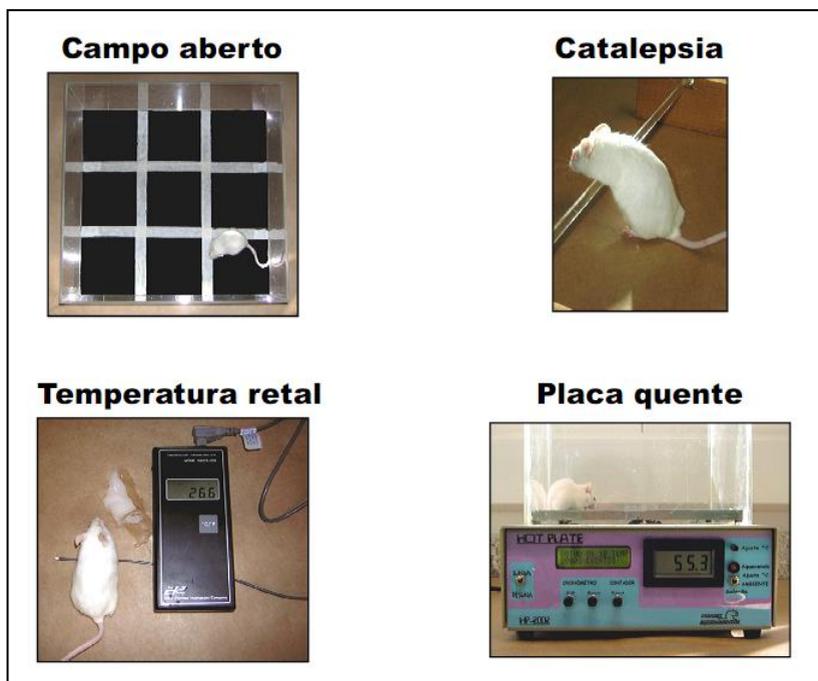


Figura 13 – Fotografias dos testes comportamentais constituintes do teste de atividade canabimimética, também chamado de teste da tétrede canabinóide, como realizado em nossas condições experimentais.

4.3.3 – Procedimentos funcionais *in vitro*

4.3.3.1 – Contração de ducto deferente de rato induzida eletricamente

A montagem do sistema de ducto deferente isolado foi realizada conforme procedimento descrito na literatura (Pertwee et al., 1995; Christopoulos et al., 2001). Os vasos deferentes foram dissecados e montados com tensão inicial de 1 g em uma cuba de 5 ml contendo solução de Krebs livre de Mg^{+2} mantida a 37°C e borbulhada continuamente com carbogênio (95% O₂, 5% CO₂). A composição da solução de Krebs foi (em mM): 118,2 NaCl; 4,75 KCl; 1,19 KH₂PO₄; 25 NaHCO₃; 11 Glicose; 2,54 CaCl₂. Contrações isométricas foram induzidas na preparação por estimulação elétrica de campo, com trens de pulsos de 500 ms e 0,1 Hz de frequência e duração de pulso de 0,5 ms, aplicados através de eletrodos de platina conectados acima (gancho conectado por fio de 0,6 mm) e abaixo (anel de 3 mm de diâmetro) da preparação. Os estímulos foram gerados por 3 estimuladores (HSE, Alemanha) cujos sinais foram amplificados por um amplificador (HSE, Alemanha). As contrações foram monitoradas por meio de transdutores de força, pré-amplificados (1000 Hz) acoplados a um sistema de registro em papel termosensível utilizando polígrafo (Letica Instrumentos, Espanha). Cada preparação foi equilibrada por pelo menos 30 min antes do início da estimulação elétrica e estimulados por curtos períodos alternados com repouso de 5 min até obtenção de uma linha de base constante. A partir de então, as preparações foram deixadas em repouso por cerca de 10 min adicionais antes do início dos experimentos. Uma série de 6 contrações sequenciais foi utilizada como parâmetro para cada ponto experimental, com intervalo de 15 min entre cada série. As drogas a serem testadas foram adicionadas ao banho 10 min antes de reiniciar cada série de estimulação para realização de curvas cumulativas de concentração-efeito das substâncias testadas individualmente ou em combinação. Cada ponto experimental constituiu na média da amplitude das contrações de uma série, representadas como porcentagem de inibição máxima. A média das contrações da série imediatamente anterior à adição das primeiras substâncias testadas no banho foi considerada como a contração máxima para quantificação da inibição de contração. As preparações que não apresentaram contrações estáveis foram descartadas.

4.3.4 – Procedimentos bioquímicos *in vitro*

4.3.4.1 – Preparação das frações celulares

Os extratos citosólicos contendo frações ricas em membranas ou conteúdo citosólico para os ensaios de ligação e enzimáticos, respectivamente, foram preparados a partir de cérebro total de camundongos. Os camundongos foram sacrificados rapidamente por decapitação, seguido por remoção do cérebro total e homogeneização em 5 ml do tampão de preparação (320 mM de sacarose, 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 5 mM de MgCl₂, pH=7,4) em gelo. O homogenato de cérebro total foi centrifugado a 1.600 g por 10 min e o precipitado foi descartado. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 16.000 x g por 1 hora. O pellet foi ressuspensão em tampão e utilizado como fração membranar no ensaio da FAAH e no ensaio de ligação, o sobrenadante constitui a fração citosólica e foi utilizado no ensaio de determinação da atividade da MAGL. Os extratos citosólicos contendo fração citosólica e membranar para o ensaio de Western Blot para receptores ALX de lipoxina foram preparados a partir de cérebro (hipocampo, cerebelo e córtex) e baço (controle positivo) de camundongos. Os tecidos foram dissecados a fresco, congelados em nitrogênio líquido e então homogeneizados em tampão contendo HEPES 10 mM (pH 7,4), MgCl₂ 2 mM, KCl 10 mM, fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF) 1 mM, leupeptina 1 mg/ml, pepstatina A 1 mg/ml, aprotinina 1 mg/ml, ortovanodato de sódio 1 mM, b-glicerofosfato 10 mM, fluoreto de sódio 50 mM, Triton-X 1% e ditiotreitól 0,5 mM. Após a centrifugação a 14.000 x g por 1 hora, o sobrenadante contendo a fração citosólica e membranar foi coletado e acondicionado em freezer -70 °C para posterior análise. As concentrações de proteínas totais nas frações membranar e citosólica dos extratos foram determinadas por colorimetria (595 nM) indiretamente por comparação com solução padrão de albumina de soro bovino (BSA), seguindo o método de Bradford (1976).

4.3.4.2 – Ensaio de ligação em receptores canabinóides CB₁

O ensaio de ligação foi realizado utilizando fração membranar de cérebro total de camundongo, conforme metodologia previamente descrita (Hirst et al., 1996; Abood et al., 1997). As membranas foram

homogeneizadas e diluídas em tampão de amostra (50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 3 mM de MgCl₂, pH=7,4) resultando em uma concentração final de 1 mg/ml de proteínas totais. O ensaio de ligação constituiu na incubação de 50 µg de proteínas a um tubo contendo 0,5 nM do antagonista dos receptores CB₁ radioativo [³H]SR141716A (43 Ci/mmol) em quantidade suficiente de tampão de ensaio (50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 3 mM de MgCl₂, 1 mg/ml de BSA, 100 µM de PMSF, pH=7,4), totalizando um volume final de 500 µl. A ligação inespecífica foi estimada pela adição de 10 µM do agonista canabinoide WIN-55212,2 sem marcação radioativa. Após incubação por 1 h a 37 °C, o ensaio de ligação foi terminado pela adição de 1 ml do tampão de ensaio resfriado em gelo e filtração a vácuo por filtros de feltro previamente tratados com polietilenamina (0,1 %) por pelo menos 2 h, seguidos de 3 lavagens com 3 ml de tampão gelado. Os filtros foram mergulhados individualmente em 1 ml de líquido de cintilação e agitados por 1 h antes da determinação da radioatividade. Por questões práticas, o método de interrupção do ensaio de ligação foi modificado durante o decorrer deste estudo, sendo substituído pela centrifugação a 10.000 g por 10 min (4 °C), seguido de 2 lavagens de 1 ml com tampão e centrifugações, sem prejuízo da qualidade dos ensaios. Neste caso, o líquido de cintilação foi adicionado diretamente ao recipiente do ensaio logo após o final das lavagens e centrifugações.

4.3.4.3 – Atividade enzimática da FAAH, enzima de degradação da AEA

O ensaio de atividade enzimática da FAAH, enzima de degradação da AEA foi realizado conforme descrição prévia (Bisogno et al., 2006) utilizando a fração membranar do homogenato de cérebro total de camundongos. A preparação das membranas foi realizada conforma descrito acima. As membranas (100 µg de proteína total) foram incubadas com 1,8 µM do endocanabinoide radioativo [¹⁴C]AEA (5 mCi/mmol) em tampão de ensaio (50 mM de Tris-HCl, pH=9) por 30 min a 37 °C. O ensaio foi finalizado por centrifugação a 10.000 g por 10 min (4 °C) e o sobrenadante retirado para extração da fase aquosa com 2 volumes de clorofórmio/metanol (1:1). A quantidade de [¹⁴C]Etanolamina produzido em decorrência da degradação de [¹⁴C]AEA foi quantificada por cintilação líquida, normalizada pela massa (em mg) de tecido fresco e utilizada para cálculo da atividade enzimática.

4.3.4.4 – Atividade enzimática da MAGL, enzima de degradação do 2-AG

O ensaio de atividade enzimática da MAGL, enzima de degradação do 2-AG, foi realizado conforme descrição prévia (Bisogno et al., 2006) utilizando a fração citosólica do homogenato de cérebro total de camundongos. A preparação da fração citosólica foi realizada conforme descrito acima. A fração citosólica (100 µg de proteína total) foi incubada com 25 µM do substrato radioativo [³H]2-AG (1 mCi/mmol) em tampão de ensaio (50 mM de Tris-HCl, pH=7) por 20 min a 37 °C. O sobrenadante do ensaio foi retirado para extração da fase aquosa com 2 volumes de clorofórmio/metanol (1:1) e os extratos foram liofilizados a vácuo. A quantidade de [³H]Glicerol produzido em decorrência da degradação de [³H]2-AG foi quantificada por cintilação líquida, normalizada pela massa (em mg) de tecido fresco e utilizada para cálculo da atividade enzimática.

4.3.4.5 – Determinação da expressão de receptores ALX

As amostras de proteínas (40 µg) foram adicionadas ao tampão (Tris 200 mM, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 2,75 mM e azul de bromofenol 0,04%) e, em seguida, foram fervidas durante 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram separadas por eletroforese (SDS-PAGE) em gel de acrilamida 10% e eletrotransferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Após a transferência, a fim de evitar ligação inespecífica do anticorpo, as membranas foram incubadas primeiramente com leite desnatado diluído em tampão Tris (TBS) overnight a 4 °C e então foram lavadas com TBS e Tween-20 a 5% (TBST), por três vezes durante 5 min cada. Em seguida, a membrana foi incubada com um dos seguintes anticorpos para as proteínas de interesse: ALX (1:500) ou β-actina (1:1.000). Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas com TBST por três vezes por 5 min cada e incubadas com anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina 1:80.000 por 1 h. As membranas foram novamente lavadas com TBST. A visualização das proteínas foi realizada utilizando solução reveladora para fosfatase alcalina, segundo recomendações do fabricante.

4.3.5. – Procedimentos bioquímicos *ex vivo*

4.3.5.1 – Dosagem de endocanabinóides no cérebro

A quantificação dos níveis de endocanabinóides AEA e 2-AG em homogenatos de cérebro de camundongo foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) conforme modificação de técnica previamente descrita (Di Marzo et al., 2000; Marsicano et al., 2002). Os tecidos foram homogeneizados em tampão de amostra contendo 50 mM de Tris-HCl (pH=7,5) e os lipídeos foram extraídos usando 2 volumes de clorofórmio/metanol (2:1) contendo 5 pmol de d₄-AEA e d₅-2-AG como padrões internos. O extrato lipídico foi pré-purificado em mini-colunas de sílica gel utilizando concentrações crescentes de metanol em clorofórmio. As frações contendo AEA e 2-AG foram obtidas por eluição das amostras com clorofórmio/metanol (1:9), seguida por evaporação sob atmosfera de gás nitrogênio (N₂).

As amostras foram então analisadas por cromatografia líquida de alta performance (Shimadzu, LC-10ADVP) utilizando coluna de fase reversa Phenomenex (5 µm, 150 x 4,5 mm), acoplada a um espectômetro de massa (Shimadzu, LCMS-2010). A eluição de AEA e 2-AG foi realizada com fase móvel de metanol/água/ácido acético (85:15:0,2) e velocidade de fluxo de 1 ml/min, com temperatura das colunas e das amostras mantida a 25 °C. A análise foi realizada em modo de monitoramento de íon específico (identificado pelo valor de m/z) à temperatura de ionização de 400 °C, sob pressão atmosférica. Os tempos de retenção utilizados foram 14,5 min para AEA e 17 min para 2-AG e a quantidade dos endocanabinóides (em pmol) quantificada por método de diluição do isótopo e normalizada pela massa (em mg) dos extratos lipídicos.

4.3.5.2 – Dosagem de LXA₄ no cérebro

A quantificação dos níveis de LXA₄ no cérebro de camundongo foi realizada por meio de kit ELISA (Oxford Biomedical Research, EUA). Os tecidos foram homogeneizados em etanol (5µl/mg de tecido) e centrifugados por 5 min a 10.000 g. O sobrenadante foi coletado, diluído em água deionizada (acidificada a pH 3,5) e purificado em uma coluna reversa Sep-Pak C18 pré-ativada, com fases móveis água, hexano e formiato de etila, nesta seqüência, com velocidade de eluição

de 1 ml/min. A fração formiato de etila contendo a LXA₄ extraída foi evaporada sob atmosfera de gás nitrogênio (N₂) e ressuspensa em tampão de ensaio. As amostras foram incubadas com conjugado HRP-LXA₄ (peroxidase) por 1 hora à temperatura ambiente (25 °C) em placa de 96 poços tratada com anticorpos anti-LXA₄. Após sucessivas lavagens, a reação foi revelada com uso de substrato TMB, cuja coloração azul é inversamente proporcional à quantidade de LXA₄ na amostra (leitura a 650 nm). A quantidade de LXA₄ nas amostras foi normalizada pela massa (em mg) de tecido fresco.

4.3.6 – Sequência experimental

Os experimentos listados abaixo foram realizados ao longo dos 4 anos de desenvolvimento deste estudo, idealizados para responder perguntas de diferentes complexidades e utilizando as metodologias disponíveis. Neste documento, os experimentos estão organizados em 4 grupos. Primeiramente, dada a raridade de evidências sobre o assunto, foi preciso investigar se a LXA₄ induziria algum efeito no SNC, em especial aqueles associados à ativação de receptores canabinóides. Depois, iniciamos as investigações de um possível mecanismo de ação para os efeitos da LXA₄ no SNC, seguida pela investigação de possível relevância fisiológica da interação entre o sistema de derivados da lipoxigenase e endocanabinóides. Finalmente, investigamos se a 15-epi-LXA₄, o isômero da LXA₄ gerada como efeito da aspirina, compartilha dos efeitos canabimiméticos da LXA₄ de ocorrência natural.

4.3.6.1 – Grupo 1: A LXA₄ induz efeitos similares aos de canabinóides no sistema nervoso central?

Experimento 1: Investigação de atividade canabimimética da LXA₄ em camundongos. O teste da tetrade de efeitos canabinóides foi utilizado a fim de se investigar se a LXA₄ poderia exercer efeitos similares aos dos canabinóides no SNC. Os animais foram injetados com LXA₄ (0,01 – 1 pmol/ 5 µl, i.c.v.) ou controle (etanol 0,5% em PBS) e 5 min depois avaliados nos testes do campo aberto (locomoção), catalepsia, temperatura retal ou placa quente (nocicepção).

Experimento 2: Investigação da participação de receptores canabinóides CB₁ ou de receptores de lipoxina ALX nos efeitos centrais da LXA₄ em camundongos. Este experimento de antagonismo farmacológico foi realizado para investigar a participação de receptores

canabinóides CB₁ ou de receptores de lipoxina ALX nos efeitos centrais da LXA₄ observados. Os animais foram injetados com o antagonista dos receptores canabinóides CB₁ SR141716A (1 mg/kg, i.p.), o antagonista dos receptores ALX BOC-2 (10 µg/kg, i.p.) ou solução controle (10% DMSO e 0,1% Tween80 em salina), seguido 55 min depois pela injeção de uma dose selecionada de LXA₄ (1 pmol/ 5 µl) ou controle (etanol 0,5% em PBS) e 5 min depois avaliados no teste do campo aberto (locomotoão), catalepsia, temperatura retal ou placa quente (nocicepção).

Experimento 3: Confirmação da ausência de participação dos receptores ALX na catalepsia induzida pela LXA₄ em camundongos. A partir dos experimentos iniciais descritos nos itens acima, a catalepsia foi escolhida como parâmetro comportamental preditivo de atividade canabimimética para a realização de experimentos adicionais de farmacologia. Esta abordagem teve o intuito de evitar o uso desnecessário de animais na geração de dados que seriam, em grande parte, redundantes. Para confirmar a ausência de participação dos receptores ALX nos efeitos centrais da LXA₄ investigados, o experimento com o antagonista BOC-2 foi repetido, desta vez com injeção central conjunta deste antagonista e LXA₄. Os animais foram injetados com uma dose selecionada de LXA₄ (1 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou controle (etanol 0,5% em PBS), co-injetado com BOC-2 (1000 pmol/2 µl, i.c.v.) ou controle (PBS) e 5 min depois avaliados no teste da catalepsia.

Experimento 4: Confirmação da participação dos receptores CB₁ na catalepsia induzida pela LXA₄ em camundongos. Para confirmar a participação dos receptores CB₁ nos efeitos centrais da LXA₄ investigados, utilizamos animais com deleção gênica para os receptores CB₁ (CB₁^{-/-}) e seus respectivos controles (CB₁^{+/+}) como uma abordagem complementar à farmacológica. Inicialmente, realizamos uma curva-dose resposta de LXA₄ (0,01 pmol – 1 pmol/ 5 µl, i.c.v.) em camundongos C57Bl/6NCrl, repetindo o experimento 1 nesta linhagem, que foi utilizada como background para a geração dos camundongos CB₁^{-/-}. No experimento propriamente dito, os camundongos CB₁^{+/+} e CB₁^{-/-} foram injetados com uma dose selecionada de LXA₄ (1 pmol/2 µl, i.c.v.) ou controle (etanol 0,5% em PBS) e 5 min depois avaliados no teste da catalepsia.

4.3.6.2 – Grupo 2: Em busca de um mecanismo de ação para os efeitos centrais da LXA₄

Experimento 5: Ensaio competitivo de ligação contra [³H]SR141716A em membranas de cérebro total de camundongo. Como a LXA₄ induziu efeitos centrais canabimiméticos, recorremos à técnica de ensaio competitivo de ligação utilizando um antagonista canabinóide marcado radioativamente para investigar se a ligação a receptores CB₁ poderia constituir um mecanismo de ação da LXA₄ no sistema nervoso central. Concentrações crescentes de LXA₄ (1 nM – 10 µM) foram incubadas com as membranas de cérebro de camundongo a 37 °C por 1 h na presença de 0,5 nM do antagonista canabinóide CB₁ marcado radioativamente [³H]SR141716A. Curvas controle foram realizadas com adição cumulativa das concentrações de etanol comparáveis às presentes nas soluções de LXA₄ (máximo de 1%).

Experimento 6: Ensaio de inibição de contrações induzidas eletricamente em ducto deferente isolado de rato. Este experimento teve como objetivo investigar se a LXA₄ poderia exercer efeito canabimimético em uma preparação *in vitro* funcional e sensível à ação de canabinóides. Concentrações cumulativas crescentes de LXA₄ (1 nM – 1 µM) foram adicionadas ao banho do ducto deferente isolado de rato. As contrações induzidas eletricamente após a adição de cada concentração de LXA₄ foram comparadas à contração máxima, induzida na ausência de droga. Curvas controle foram realizadas com adição cumulativa das concentrações de etanol comparáveis às presentes nas soluções de LXA₄ (máximo de 1%).

Experimento 7: Interação da LXA₄ com os endocanabinóides AEA e 2-AG no teste da catalepsia em camundongos. Como a LXA₄ aparentemente não age diretamente como um agonista dos receptores canabinóides CB₁, procedemos à caracterização de seu mecanismo de ação investigando se há interação entre seus efeitos e o de doses sub-efetivas dos endocanabinóides mais estudados, a AEA e o 2-AG. Inicialmente realizamos curvas dose-resposta de ambos os endocanabinóides no teste da catalepsia. Os animais foram injetados com AEA (10 – 200 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou controle (etanol 0,5% em PBS), com 2-AG (1 – 100 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou controle (acetonitrila 0,5% em PBS) e 5 min depois avaliados no teste da catalepsia. Definidas as curvas dose-resposta para cada um dos endocanabinóides, os animais foram co-injetados com uma dose sub-efetiva de LXA₄ (0,01 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou controle (etanol 0,5% em PBS) e uma dose sub-

efetiva de AEA (10 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou 2-AG (10 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou o respectivo controle e 5 min depois avaliados no teste da catalepsia.

Experimento 8: Ensaio de atividade das enzimas de degradação de endocanabinóides. Com o objetivo de determinar se os efeitos canabimiméticos da LXA₄ poderiam ocorrer por interferência no metabolismo de endocanabinóides, investigamos os efeitos da LXA₄ na atividade das enzimas de degradação de endocanabinóides mais conhecidas. A FAAH é considerada a principal enzima de degradação da AEA e a MAGL a principal enzima de degradação do 2-AG. A LXA₄ (até 10 µM) foi incubada com amostras de fração citosólica ou membranar de cérebro total de camundongos para avaliação da capacidade de degradação de AEA ou 2-AG marcados radioativamente. A atividade enzimática da FAAH e da MAGL foi determinada respectivamente pela geração de metabólitos radioativos da AEA e do 2-AG no sobrenadante.

Experimento 9: Quantificação dos níveis de endocanabinóides no cérebro de camundongos após administração de LXA₄. A fim de determinar se os efeitos canabimiméticos da LXA₄ poderiam ocorrer por interferência nos sistemas de regulação dos níveis de endocanabinóides, investigamos os efeitos da LXA₄ nos níveis dos endocanabinóides AEA e 2-AG no cérebro de camundongos. Os animais foram injetados com uma dose efetiva de LXA₄ (1 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou controle (etanol 0,5% em PBS) e 5 min depois sacrificados para coleta do cérebro e dissecação a fresco do hipocampo, córtex e cerebelo para quantificação dos endocanabinóides nestas estruturas cerebrais por HPLC.

Experimento 10: Investigação dos efeitos combinados de LXA₄ e AEA no ensaio competitivo de ligação contra [³H]SR141716A em membranas de cérebro total de camundongo. Apesar dos evidentes efeitos comportamentais da LXA₄ nos animais, quando administradas isoladamente ou em combinação com a AEA, não conseguimos identificar seu mecanismo de ação utilizando o ensaio de ligação competitivo, avaliando a atividade das enzimas de degradação ou os níveis de endocanabinóides no cérebro após a injeção i.c.v. de LXA₄ nos camundongos. Então decidimos investigar se a LXA₄ poderia cooperar com a AEA de modo a facilitar a sua ligação nos receptores canabinóides CB₁. O ensaio de ligação competitivo foi então realizado novamente, testando a capacidade da LXA₄ em alterar a curva concentração-resposta da inibição da ligação do [³H]SR141716A pela AEA. A AEA (1 nM – 10 µM) foi incubada com 0,5 nM de

[³H]SR141716A em membranas de cérebro de camundongos na presença e na ausência de LXA₄ (100 nM).

Experimento 11: Investigação dos efeitos combinados de LXA₄ e AEA no ensaio de inibição de contrações induzidas eletricamente em ducto deferente isolado de rato. Para confirmar *in vitro* se a LXA₄ poderia cooperar funcionalmente com a AEA em um ensaio sensível à ativação de receptores canabinóides CB₁, o ensaio de inibição de contrações neurogênicas do ducto deferente foi então realizado novamente, testando a capacidade da LXA₄ em alterar a curva concentração-resposta da inibição de contração induzida pela AEA. Concentrações cumulativas crescentes de AEA (1 nM – 10 µM) na presença e na ausência de LXA₄ (100 nM) foram adicionadas ao banho do ducto deferente isolado de rato. Uma curva similar foi realizada com o agonista canabinóide WIN55212-2 (10 nM – 1 µM) na presença e na ausência de LXA₄ (100 nM). As contrações induzidas eletricamente após a adição de cada concentração das drogas foram comparadas à contração máxima, induzida na ausência de droga. Curvas controle foram realizadas com adição cumulativa das concentrações de etanol comparáveis às presentes nas soluções testadas (máximo de 1%).

4.3.6.3 – Grupo 3: Possível relevância fisiológica da interação entre derivados da lipoxigenase e endocanabinóides no sistema nervoso central.

Experimento 12: Quantificação dos níveis de LXA₄ no cérebro de camundongos. Em função das limitadas informações a respeito da LXA₄ no SNC o primeiro passo para definirmos se os efeitos centrais da LXA₄ têm alguma relevância fisiológica foi determinar se a mesma é encontrada no cérebro em condições basais. Cérebros de camundongos foram coletados a fresco para dissecação do hipocampo, córtex e cerebelo e determinação dos níveis de LXA₄ nestas estruturas cerebrais por meio de ensaio de ELISA.

Experimento 13: Quantificação dos níveis de receptores ALX no cérebro de camundongos. Com o objetivo de identificar se os receptores ALX são expressos no cérebro, realizamos a imunodeteção de proteínas por Western blot em três regiões cerebrais onde quantificamos os endocanabinóides e a LXA₄. Cérebros de camundongos foram coletados a fresco para dissecação do hipocampo, córtex e cerebelo e determinação dos níveis de receptores ALX. O baço dos mesmos camundongos também foi dissecado a fresco e submetido aos mesmos

procedimentos e considerado como grupo controle, já que a expressão de receptores ALX neste órgão é amplamente descrita.

Experimento 14: Investigação dos efeitos da inibição da enzima de síntese de LXA₄ na transmissão endocanabinóide. Com o objetivo de investigar se a presença de LXA₄ no cérebro é importante para a transmissão endocanabinóide, realizamos um experimento de inibição da enzima de síntese da LXA₄, a 5-LOX. Os animais foram injetados com o inibidor da 5-LOX MK-886 (0,3 – 3 mg/kg, i.p.) e 55 min depois injetados com uma dose efetiva de AEA (200 pmol/ 2 µl, i.c.v.) e 5 min depois testados no teste da catalepsia. Para investigar se a suplementação de LXA₄ exógena poderia reverter os efeitos da inibição endógena de sua síntese, o experimento de inibição da 5-LOX foi repetido utilizando-se uma dose selecionada de MK-886 (3 mg/kg, i.p.), seguido 50 min depois pela co-injeção de AEA (200 pmol/ 2 µl, i.c.v.) e LXA₄ (0,01 – 1 pmol / 2 µl, i.c.v.).

4.3.6.4 – Grupo 4: A 15-epi-LXA₄ gerada pela aspirina compartilha dos efeitos canabimiméticos observados para a LXA₄ de ocorrência natural?

Experimento 15: Interação da aspirina com o endocanabinóide AEA no teste da catalepsia em camundongos. Para verificar se a aspirina potencializa os efeitos do endocanabinóide AEA, os animais receberam aspirina (30-300 mg/kg, p.o.) ou controle 25 min antes de receberem a injeção de uma dose sub-efetiva de AEA (10 pmol/ 2 µl, i.c.v.) e serem avaliados no teste da catalepsia 5 min após. Em um experimento similar subsequente, a aspirina (300 mg/kg, p.o.) foi administrada 15, 30, 60 ou 90 minutos antes do teste da catalepsia para se determinar o decurso temporal de seus efeitos.

Experimento 16: Investigação da participação da enzima 5-LOX na potencialização dos efeitos da AEA induzida pela aspirina no teste da catalepsia em camundongos. Para investigar se possíveis derivados da 5-LOX estavam envolvidos na potencialização dos efeitos da AEA induzida pela aspirina no teste da catalepsia, os animais foram injetados com o inibidor da 5-LOX MK-886 (1 mg/kg, i.p.) 10 min antes da administração de aspirina (300 mg/kg, p.o.). AEA (10 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou controle (etanol 0,5% em PBS) foram injetados 25 min depois da administração de aspirina e o teste da catalepsia foi realizado 5 min depois da injeção de AEA.

Experimento 17: Interação da 15-epi-LXA₄ com o endocanabinóide AEA no teste da catalepsia em camundongos. Como

derivados da 5-LOX parecem estar envolvidos na potencialização dos efeitos da AEA induzida pela aspirina no teste da catalepsia, decidimos investigar se a 15-epi-LXA₄, um isômero óptico da LXA₄ que é produzido como consequência da acetilação da COX-2 pela aspirina, também poderia interagir com a AEA, exercendo efeitos centrais similares aos da LXA₄, que ocorre naturalmente no cérebro. Os animais foram co-injetados com uma dose sub-efetiva de 15-epi-LXA₄ (0,01 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou controle (etanol 0,5% em PBS) e uma dose sub-efetiva de AEA (10 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou controle (etanol 0,5% em PBS) e 5 min depois avaliados no teste da catalepsia.

Experimento 18: Investigação da participação de receptores canabinóides CB₁ ou de receptores de lipoxina ALX na potencialização dos efeitos da AEA induzida pela 15-epi-LXA₄ no teste da catalepsia em camundongos. O experimento de antagonismo farmacológico foi realizado para investigar a participação de receptores canabinóides CB₁ ou de receptores de lipoxina ALX nos efeitos centrais da 15-epi-LXA₄ observados. Os animais foram injetados com o antagonista dos receptores canabinóides CB₁ SR141716A (1 mg/kg, i.p.), o antagonista dos receptores ALX BOC-2 (10 µg/kg, i.p.) ou solução controle (10% DMSO e 0,1% Tween80 em salina), seguido 55 min depois pela co-injeção de uma dose selecionada de 15-epi-LXA₄ (0,01 pmol/ 2 µl) ou controle (etanol 0,5% em PBS) e uma dose sub-efetiva de AEA (10 pmol/ 2 µl, i.c.v.). O teste da catalepsia foi realizado 5 min depois.

4.4 – Análise Estatística

Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m.), com o número amostral (n) expresso na legenda de cada figura. Os experimentos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de 1 via (tratamento) ou 2 vias (pré-tratamento, tratamento, linhagem, tempo) dependendo do desenho experimental. O teste post hoc de Duncan foi utilizado para comparações ponto a ponto após análise global por ANOVA. O teste t bicaudal para amostras independentes foi utilizado para análise de experimentos com somente 2 grupos experimentais ou para validação de metodologia por controles positivos. Os ensaios competitivos de ligação foram analisados por ajuste de curva com equação não linear modelo para 1 ou 2 sítios de interação. Estas mesmas equações foram utilizadas para definição da concentração inibitória 50 (CI₅₀). Os experimentos de órgão isolado foram analisados por equação não linear modelo de log concentração-resposta. Doses

efetivas 50 (DE_{50}) nos experimentos comportamentais e concentrações efetivas 50 (CE_{50}) nos experimentos in vitro foram estimadas por equação não linear. O nível mínimo de significância considerado para todos os testes foi $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistica 7 (StatSoft Inc, E.U.A.) e GraphPad 5 (GraphPad Soft Inc, E.U.A.).

5 – RESULTADOS

5.1 - GRUPO 1: A LXA₄ INDUZ EFEITOS SIMILARES AOS DE CANABINÓIDES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL?

Experimento 1: Investigação de atividade canabimimética da LXA₄ em camundongos. A figura 14 abaixo ilustra os efeitos da injeção de LXA₄ (0,01 pmol – 1 pmol/ 5 µl, i.c.v.) no teste da tétrede de efeitos canabinóides.

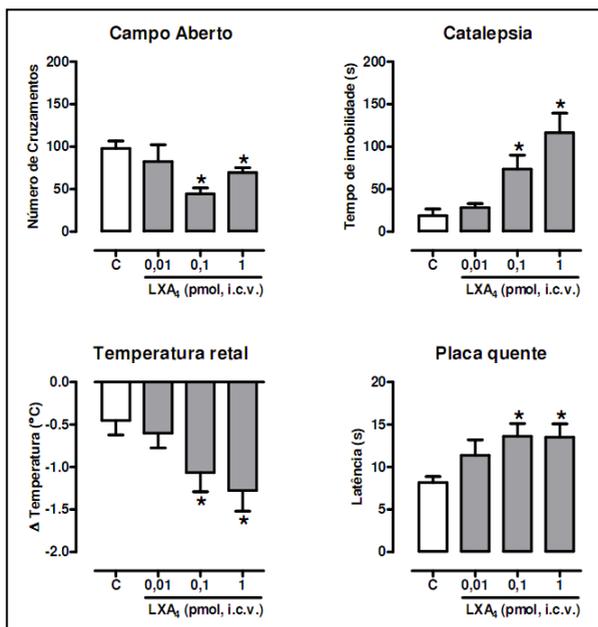


Figura 14 – Efeito da LXA₄ no teste da tétrede de efeitos canabinóides. A LXA₄ (0,01 pmol – 1 pmol/ 5 µl, i.c.v.) ou controle (C) foram injetados nos camundongos 5 min antes do teste do campo aberto, catalepsia, temperatura corporal e placa quente. * $p < 0,05$ vs. Controle (post-hoc de Duncan). ($n=9-14$ no campo aberto, $n=7$ na catalepsia, $n=11-12$ na temperatura retal, $n=11-12$ na placa quente).

Os resultados foram analisados por ANOVA de 1 via (tratamento). A injeção de LXA₄ reduziu o número de cruzamentos no teste do campo aberto [$F(3,43)=4,56$; $p < 0,01$], aumentou o tempo de

imobilidade no teste de catalepsia [$F(3,24)=9,07$; $p<0,001$], reduziu a temperatura corporal [$F(3,43)=3,49$; $p<0,05$] e aumentou a latência para resposta nociceptiva no teste da placa quente [$F(3,43)=3,18$; $p<0,05$]. Todos os efeitos citados acima ocorreram nas doses de 0,1 e 1 pmol de LXA₄ ($p<0,05$).

Experimento 2: Investigação da participação de receptores canabinóides CB₁ ou de receptores ALX de lipoxina nos efeitos centrais da LXA₄ em camundongos. A figura 15 abaixo ilustra os efeitos do pré-tratamento com antagonistas CB₁ e ALX na atividade canabimimética induzida pela LXA₄ (0,01 pmol – 1 pmol/ 5 µl, i.c.v.) no teste da tétrede de efeitos canabinóides. Os resultados foram analisados por ANOVA de 1 via (tratamento). Houve diferenças entre os grupos no número de cruzamentos no teste do campo aberto [$F(5,84)=1,60$; $p<0,05$], no tempo de imobilidade no teste de catalepsia [$F(5,42)=9,82$; $p<0,0001$], na temperatura corporal [$F(5,53)=3,10$; $p<0,05$] e na latência nociceptiva no teste da placa quente [$F(5,77)=5,85$; $p<0,0001$]. Adicionalmente, uma observação mais criteriosa dos resultados obtidos nos testes de catalepsia e temperatura retal identificou interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento, quando analisados por ANOVA de 2 vias ([$F(2,42)=10,07$; $p<0,001$] e [$F(2,53)=4,79$; $p<0,01$], respectivamente). Replicando os resultados anteriores, a injeção de LXA₄ induziu hipolocomoção ($p<0,05$), catalepsia ($p<0,05$), hipotermia ($p<0,05$) e analgesia ($p<0,05$). O bloqueio dos receptores CB₁ reduziu o efeito da LXA₄ em todos os testes ($p<0,05$), só não foi significativo na nocicepção. O bloqueio dos receptores ALX não reduziu o efeito da LXA₄ em nenhum dos testes utilizados, confirmando farmacologicamente seu perfil de atividade canabimimética central. Como a quase totalidade dos testes comportamentais utilizados nos experimentos 1 e 2 indicaram resultados na mesma direção, e com o objetivo de simplificar a execução dos experimentos, priorizando o aprofundamento da investigação do mecanismo farmacológico, decidimos eleger somente um teste comportamental para a continuação dos experimentos. Dos quatro testes da tétrede canabinóide, a catalepsia e a temperatura retal geraram resultados bastante claros e contundentes. Contudo, considerando a praticidade de execução do teste da catalepsia e a necessidade de um número relativamente reduzido de animais para obtenção de resultados altamente significantes ($p<0,0001$) comparados aos outros testes, elegemos o teste da catalepsia para a realização dos experimentos subsequentes.

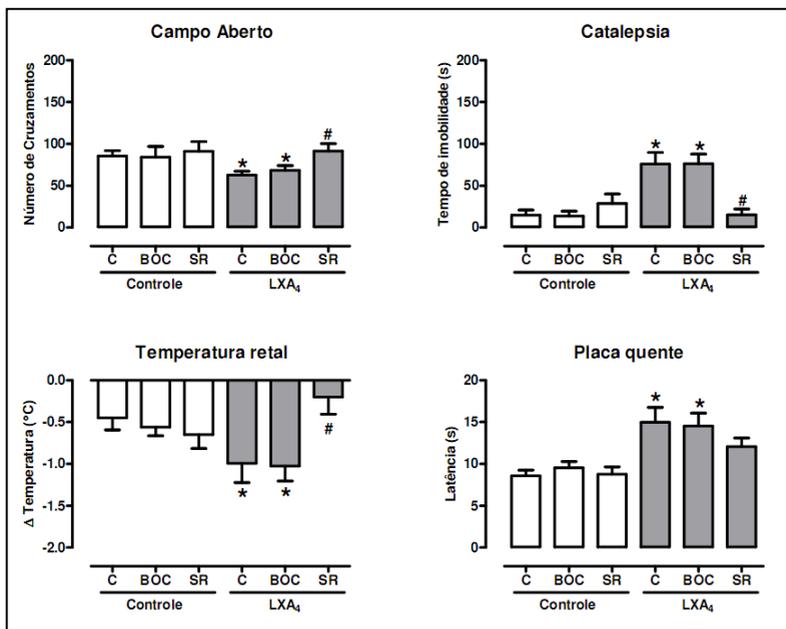


Figura 15 – Participação de receptores canabinóides CB1 nos efeitos centrais da LXA₄. O antagonista de receptores CB1 SR141716A (SR; 1 mg/kg, i.p.), o antagonista dos receptores ALX BOC-2 (BOC; 10 µg/kg, i.p.) ou controle (C) foram injetados 50 min antes da LXA₄ (1 pmol/ 5 µl, i.c.v.) ou controle. Os animais foram testados 5 min após no teste do campo aberto, catalepsia, temperatura corporal e placa quente. * $p < 0,05$ vs Controle; # $p < 0,05$ vs LXA₄ (post-hoc de Duncan). (n=10-20 no campo aberto, n=8 na catalepsia, n=8-11 na temperatura retal, n=12-15 na placa quente).

Experimento 3: Confirmação da ausência de participação dos receptores ALX na catalepsia induzida pela LXA₄ em camundongos. Como o antagonista BOC-2 utilizado é de origem peptídica, poder-se-ia especular que a ausência de prevenção dos efeitos da LXA₄ fosse devido ao fato deste antagonista apresentar pouca distribuição no sistema nervoso central após administração sistêmica. Desta maneira, repetimos o experimento de bloqueio farmacológico dos receptores ALX, administrando o BOC-2 (1000 pmol/ 2 µl) por via i.c.v. Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de 2 vias (pré-tratamento, tratamento) e estão representados na figura 16 abaixo. A análise dos resultados identificou efeito geral do tratamento com LXA₄

[F(1,20)=24,06; $p < 0,0001$], sem efeito do pré-tratamento com antagonista [F(1,20)=0,25; $p = 0,62$] ou interação entre os fatores [F(1,20)=0,14; $p = 0,71$], confirmando a ausência de participação dos receptores ALX na catalepsia induzida pela LXA₄.

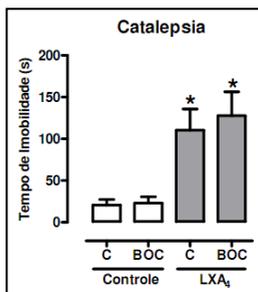


Figura 16 – Confirmação da ausência de participação de receptores ALX nos efeitos centrais da LXA₄. O antagonista de receptores ALX BOC-2 (BOC; 1000 pmol/2 µl, i.c.v.) ou controle (C) foram co-injetados com LXA₄ (1 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou controle 5 min antes do teste de catalepsia. * $p < 0,05$ vs Controle (post-hoc de Duncan). (n=6).

Experimento 4: Confirmação da participação dos receptores CB₁ na catalepsia induzida pela LXA₄ em camundongos. Inicialmente repetimos a curva dose-resposta de LXA₄ (0,01 pmol – 1 pmol/ 5 µl, i.c.v.) na linhagem de camundongos C57Bl/6NCr1, utilizada como background para a geração dos camundongos CB₁^{-/-}, a fim de confirmar se há correspondência de dose entre esta linhagem e a de camundongos Swiss albino utilizada para os experimentos anteriores. Os resultados foram analisados por ANOVA de 1 via (tratamento) e estão representados na figura 17 abaixo. A LXA₄ induziu catalepsia nos camundongos da linhagem C57Bl/6NCr1 [F(3,29)=3,55; $p < 0,05$], na mesma faixa de doses (0,1 – 1 pmol) que induziu catalepsia nos camundongos Swiss albino ($p < 0,05$). Portanto, a dose de 1 pmol de LXA₄ foi selecionada para os experimentos utilizando os camundongos modificados geneticamente.

Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de 2 vias (linhagem, tratamento) e estão representados na figura 17 abaixo. A análise revelou efeito da linhagem [F(1,21)=8,59; $p < 0,01$], do tratamento [F(1,21)=10,78; $p < 0,01$] e da interação entre estes fatores [F(1,21)=4,75; $p < 0,05$]. A LXA₄ induziu catalepsia nos camundongos CB₁^{+/+} ($p < 0,05$), mas não nos camundongos CB₁^{-/-}, confirmando a

participação dos receptores canabinóides CB₁ na catalepsia induzida pela injeção central de LXA₄.

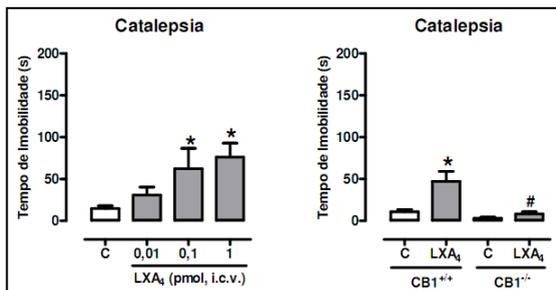


Figura 17 – Confirmação da participação de receptores canabinóides CB₁ nos efeitos centrais da LXA₄. LXA₄ (0,01 - 1 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou controle (C) foram injetados 5 min antes do teste de catalepsia em camundongos C57Bl/6NCrl (painel da esquerda) e em camundongos com deleção gênica dos receptores CB₁ (CB₁^{-/-}) e seus controles (CB₁^{+/+}). * p<0,05 vs Controle; # p<0,05 vs LXA₄ nos camundongos CB₁^{+/+} (post-hoc de Duncan). (n=8-9 e n=6-7).

5.2 - GRUPO 2: EM BUSCA DE UM MECANISMO DE AÇÃO PARA OS EFEITOS CENTRAIS DA LXA₄.

Experimento 5: Ensaio competitivo de ligação contra [³H]SR141716A em membranas de cérebro total de camundongo. Já que os experimentos comportamentais sugeriram a participação de receptores canabinóides CB₁ nos efeitos centrais da LXA₄, a primeira tentativa de elucidar o possível mecanismo de ação consistiu em investigar se a LXA₄ se liga nestes receptores. Primeiramente realizamos um ensaio cinético para determinar a constante de dissociação (Kd) do ligante radioativo [³H]SR141716A. A condição de equilíbrio foi alcançada em torno de 10 min de incubação, período no qual definimos o Kd=0,54 nM. Por esta razão, selecionamos a concentração de 0,5 nM de [³H]SR141716A para os ensaios competitivos subsequentes. A figura 18 abaixo ilustra os resultados do ensaio competitivo da LXA₄ (1 nM - 10 µM) contra o [³H]SR141716A em membranas de cérebro total de camundongos. A ligação do [³H]SR141716A foi somente deslocada parcialmente pela LXA₄, com inibição de aproximadamente 50% a 10 µM. A equação não linear modelo para dois sítios de interação foi a que melhor se ajustou aos dados experimentais (r²=0,97), indicando um sítio de alta afinidade e um

de baixa afinidade para a LXA₄ nos receptores CB₁, com CI₅₀ estimados de 3,0 ± 0,26 nM e 100 ± 1,0 nM, respectivamente. Se o ajuste da curva for forçado para simular o efeito de uma substância que deslocasse totalmente a ligação do [³H]SR141716A, o CI₅₀ estimado para o sítio de baixa afinidade seria de cerca de 26 μM. O veículo (etanol) não interferiu na ligação do [³H]SR141716A até a concentração máxima utilizada de 1%.

Tabela 4 - Parâmetros do ensaio competitivo de ligação da lipoxina A₄ contra [³H]SR141716A (0,5 nM) em membranas de cérebro total de camundongos.

Análise	r ²	Sítio (Fração)	CI50 (nM) (IC _{95%})
Competitivo 1 sítio	0,83	Único (100%)	5,3 (0,08 - 340)
Competitivo 2 sítios	0,97	Alta afinidade (35%)	3,0 (0,78 - 12)
		Baixa afinidade (65%)	26370 (4000 - 195000)

Curva de ensaio competitivo de ligação da LXA₄ (1 nM - 10μM) contra [³H]SR141716A (0,5 nM) em membranas de cérebro total de camundongos. (n=4) LXA₄: lipoxina A₄

Experimento 6: Ensaio de inibição de contrações induzidas eletricamente em ducto deferente isolado de rato. O segundo passo na caracterização *in vitro* da LXA₄ foi a investigação de seus efeitos em uma preparação funcional sensível a agonistas de receptores canabinóides CB₁.

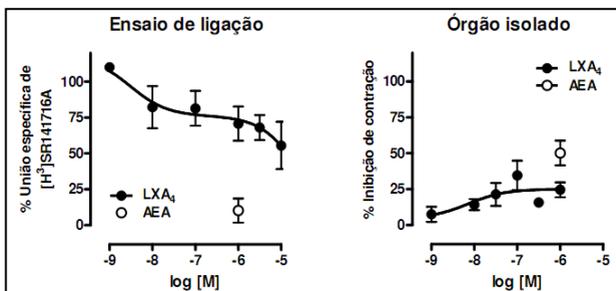


Figura 18 – LXA₄ possui baixa afinidade para os receptores CB₁ e baixa eficácia canabimimética *in vitro*. No ensaio competitivo de ligação, a LXA₄ (1 nM – 10 μM) foi incubada com as membranas de cérebro total de camundongos na presença de [³H]SR141716A (0,5 nM) por 60 min a 37°C (painel da esquerda). No ensaio de órgão isolado, investigamos os efeitos da LXA₄ (1 nM – 1 μM) nas contrações induzidas eletricamente em vasos deferentes isolados de ratos (painel da direita). AEA (1 μM) foi utilizada como controle positivo em ambos os ensaios. (n=4 e n=3-6).

Como demonstrado na figura 18 acima, a LXA₄ inibiu fracamente as contrações induzidas eletricamente em ducto deferente isolado de ratos. A porcentagem de inibição máxima foi de aproximadamente 25% a 1 μM com CE₅₀ estimada de 7,2 ± 1,0 nM. O veículo (etanol) não interferiu na ligação do [³H]SR141716A até a concentração máxima utilizada de 1%.

Experimento 7: Interação da LXA₄ com os endocanabinóides AEA e 2-AG no teste da catalepsia em camundongos. Como os experimentos *in vitro* descritos acima não forneceram evidências suficientes para definirmos um mecanismo farmacológico que explicasse os efeitos canabimiméticos da LXA₄ no sistema nervoso central, passamos a uma segunda etapa de caracterização dos efeitos *in vivo* da LXA₄, a fim de obter informações adicionais que pudessem nos sugerir uma nova perspectiva experimental. Até o momento, apesar da LXA₄ exercer efeitos centrais dependentes da ativação de receptores CB₁, as evidências levantadas não nos permitem afirmar que ela seja um agonista destes receptores. Então decidimos investigar se além de exercer efeito canabimimético quando administrada sozinha, a LXA₄ poderia interferir no efeito de ligantes endógenos dos receptores CB₁, os endocanabinóides. A abordagem experimental escolhida foi investigar se a co-administração de uma dose sub-efetiva de LXA₄ com uma dose sub-efetiva de cada um dos dois endocanabinóides protótipos, a AEA e

o 2-AG, poderia resultar em efeitos cumulativos no teste da catalepsia. Inicialmente foi preciso realizar curvas dose-resposta para AEA (10-200 pmol/ 2 µl, i.c.v.) e 2-AG (1-100 pmol/ 2 µl, i.c.v.) em nossas condições experimentais. A figura 19 abaixo representa os resultados deste experimento, analisado por ANOVA 1 via (tratamento). A análise dos resultados revelou efeito para a AEA [F(3,21)=8,89; p<0,001] e 2-AG [F(3,23)=12,23; p<0,0001] com doses de 200 e 100 pmol apresentando diferença significativa comparado ao grupo controle, respectivamente. Os experimentos subsequentes de co-injeção da AEA (10 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou do 2-AG (1 pmol/ 2 µl, i.c.v.) com a LXA₄ (0,01 pmol/ 2 µl, i.c.v.) no teste da catalepsia estão representados na figura 19 abaixo e foram analisados por ANOVA de 1 via (tratamento).

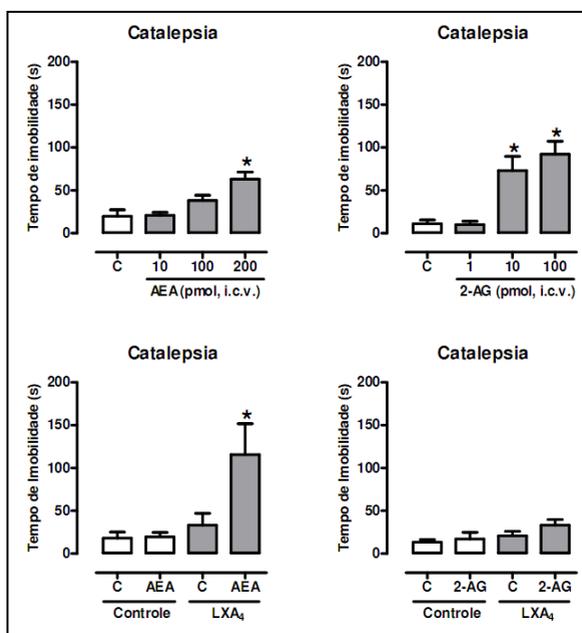


Figura 19 - Interação da LXA₄ com os endocanabinóides AEA e 2-AG. Subdoses destes endocanabinóides foram definidas em experimentos de dose-resposta, onde AEA (10 – 200 pmol/ 2 µl, i.c.v.) e 2-AG (1 – 100 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou controle (C) foram injetados 5 min antes do teste de catalepsia. LXA₄ (0,01 pmol/ 2 µl, i.c.v.) foi co-injetada com AEA (10 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou 2-AG (1 pmol/ 2 µl, i.c.v.) 5 min antes do teste de catalepsia. * p<0,05 vs Controle

(*post-hoc de Duncan*). ($n=5-7$, $n=6-7$, $n=8-9$ e $n=7-9$ da esquerda para direita em sentido horário).

A análise dos resultados do experimento com AEA revelou diferença entre os grupos [$F(3,29)=4,98$; $p<0,01$], confirmando que as doses de AEA e LXA₄ não foram efetivas *per se*, mas que a co-administração destas duas substâncias induziu catalepsia, com diferença significativa do grupo controle ($p<0,05$). A análise dos resultados do experimento com 2-AG não revelou diferença significativa entre os grupos [$F(3,27)=2,37$; $p=0,09$]. A dose efetiva 50% (DE₅₀) para os ligantes acima, foi estimada por relação log concentração x resposta, considerando o tempo máximo de teste (300 s) como resposta máxima possível (E_{máx}) para cada um dos ligantes. O resultado das estimativas pode ser observado na tabela 5 abaixo. A LXA₄ possui uma eficácia aparente de cerca de 500x a da AEA. Deve-se, no entanto, interpretar estes resultados com cautela e reconhecer a limitação da estimativa realizada somente com 4 pontos da curva dose-resposta dos referidos ligantes.

Tabela 5 – Potência estimada dos ligantes no teste da catalepsia

Ligante	DE50 (IC _{95%}) ¹	Potência relativa ²
AEA	1174 (862 - 1597)	1x
2-AG	219 (126 - 381)	5x
LXA ₄	2 (1 - 5)	500x

¹ Em pmol / 2µl, i.c.v. conforme descrito nos experimentos. ² Estimativa aproximada da potência relativa, calculado pela razão da DE₅₀ comparada à da anandamida. AEA: anandamida, 2-AG: 2-araquidonil glicerol, LXA₄: lipoxina A₄.

Experimento 8: Ensaio de atividade das enzimas de degradação de endocanabinóides. Seguindo a evidência funcional de que a LXA₄ potencializa os efeitos da AEA, o próximo passo foi investigar a

possibilidade de interação metabólica entre a LXA_4 e os endocanabinóides. Desta maneira, realizamos experimentos *in vitro* com o objetivo de investigar se a LXA_4 altera a atividade das duas enzimas mais importantes para a degradação da AEA e do 2-AG, respectivamente a FAAH e a MAGL. Os resultados estão representados na figura 20 abaixo e foram analisados por ANOVA de 1 via ou teste t para amostras independentes, dependendo do número de grupos. A comparação entre o grupo controle e os respectivos controles positivos para cada ensaio foi realizada por teste t para amostras independentes.

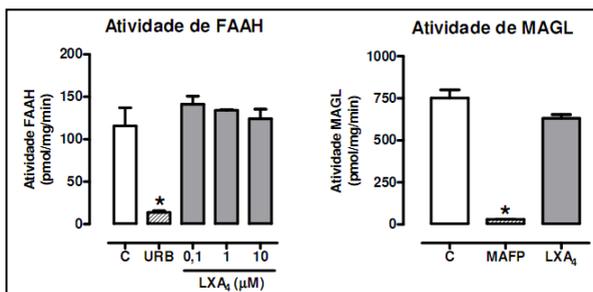


Figura 20 – LXA_4 não altera o metabolismo dos endocanabinóides AEA e 2-AG. LXA_4 (0,1-10 μ M) foi incubada com membranas ou conteúdo citoplasmático, respectivamente para investigação de sua influência na atividade das enzimas de degradação de endocanabinóide FAAH e MAGL. O inibidor seletivo URB597 (50 nM) foi utilizado como controle positivo no ensaio da FAAH e o inibidor MAFP (0,5 μ M) foi utilizado como controle positivo no ensaio da MAGL. * $p < 0,05$ vs Controle (teste T). ($n=3$ e $n=2$).

A LXA_4 não interferiu na atividade da FAAH, enzima de degradação da AEA [$F(3,7)=0,73$; $p=0,58$], enquanto o controle positivo URB597 (50 nM) inibiu cerca de 90% da atividade da FAAH ($t=4,70$; $p < 0,05$). Da mesma forma, a LXA_4 não interferiu na atividade da MAGL, enzima de degradação do 2-AG ($t=2,26$; $p=0,15$), com inibição de aproximadamente 96% da atividade pelo controle positivo MAFP ($t=14,96$; $p < 0,01$).

Experimento 9: Quantificação dos níveis de endocanabinóides no cérebro de camundongos após administração de LXA_4 . Seguindo a mesma linha de raciocínio, decidimos investigar se a LXA_4 poderia influenciar os níveis de endocanabinóides *in vivo*, em decorrência de alteração na síntese, captação e/ou degradação destas moléculas. Portanto, a LXA_4 foi injetada *i.c.v.* em uma dose que induz efeito

comportamental per se (1 pmol) e 5 min depois o cérebro dos camundongos foi dissecado para avaliação dos níveis de AEA e 2-AG no córtex, hipocampo e cerebelo. A figura 21 abaixo ilustra estes resultados, analisados por teste t para amostras independentes. Não houve diferença entre os grupos LXA₄ e controle para as áreas cerebrais avaliadas.

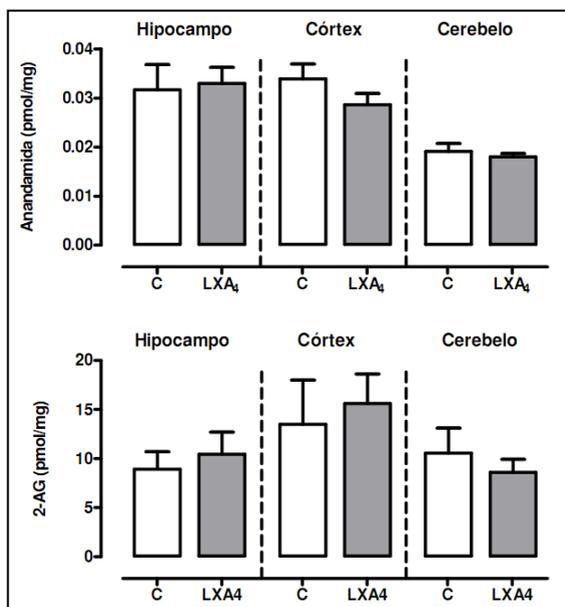


Figura 21 – LXA₄ não altera os níveis de endocanabinóides no cérebro. LXA₄ (1 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou controle (C) foram injetados e 5 min depois o cérebro dos camundongos foi dissecado para avaliação dos níveis de endocanabinóide no hipocampo, córtex e cerebelo. (n=6)

Experimento 10: Investigação dos efeitos combinados de LXA₄ e AEA no ensaio competitivo de ligação contra [³H]SR141716A em membranas de cérebro total de camundongo. Com as evidências reunidas nos experimentos anteriores, conseguimos eliminar algumas hipóteses de possíveis mecanismos de ação para a atividade canabinimética da LXA₄, mas ainda não foi possível evidenciar um mecanismo de ação plausível, principalmente se considerarmos que os efeitos in vivo ocorrem em uma faixa de dose baixíssima (pmol), sendo provavelmente decorrente da interação com um alvo farmacológico em

sítio de alta afinidade. Até este ponto, sabemos que a LXA₄ interage fracamente com receptores canabinóides CB₁ e não altera o metabolismo dos endocanabinóides, nem seus níveis endógenos cerebrais. A próxima hipótese explorada foi a de que a LXA₄ poderia facilitar a ligação da AEA nos receptores canabinóides CB₁. Esta é uma hipótese intrigante, visto que sítios alostéricos de interação foram descobertos nos receptores CB₁ (Price et al., 2005). Embora se conheçam substâncias sintéticas que interagem com este alvo farmacológico, facilitando os efeitos de endocanabinóides, a existência de uma substância endógena que se ligue a estes sítios é ainda um assunto incerto e controverso. A nossa abordagem experimental foi selecionar uma concentração de LXA₄ que praticamente não desloca a ligação do [³H]SR141716A dos receptores CB₁ para investigar se a LXA₄ influencia a ligação da AEA nestes receptores. A figura 22 abaixo ilustra os resultados do ensaio combinado da LXA₄ (100 nM) e AEA (1 nM – 10 μM) contra o [³H]SR141716A em membranas de cérebro total de camundongos. A ligação do [³H]SR141716A foi totalmente deslocada pela AEA, confirmando seu papel de agonista dos receptores CB₁. A equação não linear modelo para dois sítios de interação foi a que melhor se ajustou aos dados experimentais da curva de AEA ($r^2=0,97$) indicando um sítio de alta afinidade e um de baixa afinidade, com CI₅₀ estimados de 22 ± 3 nM e 1.338 ± 2 nM, respectivamente. Na presença de LXA₄ numa concentração que *per se* não interfere na ligação do [³H]SR141716A, a curva de AEA sofreu um deslocamento considerável, com CI₅₀ estimados de 2 ± 2 nM e 685 ± 2 nM para os sítios de alta e baixa afinidade, respectivamente, e mantendo um ajuste de curva similar para 2 sítios de interação ($r^2=0,96$). A comparação entre os CI₅₀ das curvas de AEA na presença e na ausência de LXA₄ identificou diferença para ambos os sítios de interação ($t=5,0$; $p<0,001$ para alta afinidade e $t=249,0$; $p<0,0001$ para o de baixa afinidade).

Tabela 6 - Parâmetros do ensaio competitivo de ligação da AEA contra [³H]SR141716A (0,5 nM) na ausência e na presença de LXA₄ (100 nM) em membranas de cérebro total de camundongos.

Análise	Curva ¹	r ²	Sítio (Fração)	CI ₅₀ (nM) (IC95%)
Competitivo 1 sítio	AEA	0.89	Único (100%)	454 (231 - 892)
	AEA + LXA ₄	0.68	Único (100%)	92 (23 - 361)
Competitivo 2 sítios	AEA	0.97	Alta afinidade (33%)	17 (0,9 - 294)
			Baixa afinidade (67%)	1409 (347 - 1938)
	AEA + LXA ₄	0.96	Alta afinidade (49%)	2 (0,2 - 25)
			Baixa afinidade (51%)	692 (136 - 2314)

¹ Curva de ensaio competitivo de ligação da anandamida (1nM a 10µM) contra [³H]SR141716A (0,5 nM) na ausência ou presença de lipoxina A₄ (100nM) em membranas de cérebro total de camundongos.

² Estimativa aproximada da potência relativa, calculado pela razão da CI₅₀ comparada à da anandamida sozinha. CI₅₀ (nM) ± e.p.m. obtidas em condição de equilíbrio cinético, com ajuste de curva não linear. AEA: anandamida, LXA₄: lipoxina A₄

Experimento 11: Investigação dos efeitos combinados de LXA₄ e AEA no ensaio de inibição de contrações induzidas eletricamente em ducto deferente isolado de rato. Ao contrário do esperado considerando os dados do ensaio de ligação, a LXA₄ bloqueou o efeito inibitório da AEA sobre as contrações neurogênicas do ducto deferente isolado de ratos. A porcentagem de inibição máxima para a AEA foi de

aproximadamente 50% a 1 μM com CE_{50} estimada de $123 \pm 2,9$ nM. A adição de LXA_4 inverteu a curva da AEA, gerando um aumento da contração em cerca de 20%. Como o experimento de interação entre AEA e LXA_4 gerou um resultado inesperado, levando em consideração as evidências anteriores do ensaio de ligação, decidimos investigar se a LXA_4 poderia interagir com outro agonista canabinóide, o WIN55212-2. Desta vez, ao contrário do observado para a AEA, a LXA_4 potencializou o efeito do agonista canabinóide WIN55212-2 de inibir de contrações induzidas eletricamente. Na presença da LXA_4 , a inibição máxima gerada praticamente dobrou, chegando a 60%, e a CE_{50} diminuiu em 4 vezes (aproximadamente 400 nM e 100 nM respectivamente na ausência e presença de LXA_4).

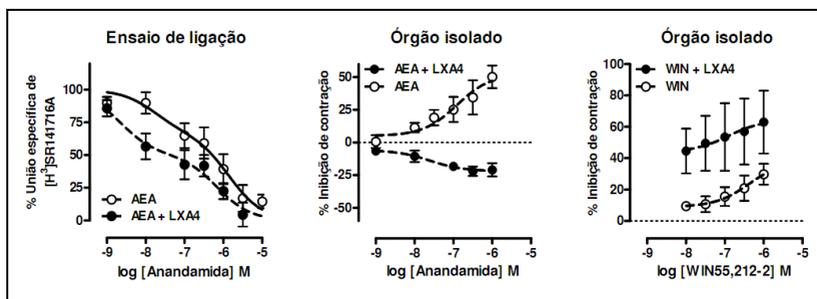


Figura 22 – LXA_4 aumenta a afinidade da AEA pelos receptores canabinóides CB_1 , mas bloqueia seu efeito *in vitro*. Ensaio competitivo de ligação combinado entre AEA (1 nM – 10 μM) e LXA_4 (100 nM) contra $[^3\text{H}]\text{SR141716A}$ (0,5 nM) em membranas de cérebro total de camundongos (painel da esquerda). Efeito combinado da AEA (1 nM – 10 μM) ou do WIN5521-2 (10 nM – 1 μM) e LXA_4 (100 nM) no ensaio de contração eletricamente induzida em ducto deferente de rato ($n=9-10$, $n=3-4$, $n=2$).

5.3 - GRUPO 3: POSSÍVEL RELEVÂNCIA FISIOLÓGICA DA INTERAÇÃO ENTRE DERIVADOS DA LIPOXIGENASE E ENDOCANABINÓIDES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.

Experimento 12: Quantificação dos níveis de LXA_4 no cérebro de camundongos. Uma vez definido que o provável mecanismo de ação da LXA_4 no cérebro constitui modulação alostérica dos receptores canabinóides CB_1 , realizamos experimentos visando investigar se a LXA_4 possui alguma relevância fisiológica para o sistema endocanabinóide. A primeira abordagem foi quantificar seus níveis em

algumas regiões cerebrais onde os endocanabinóides desempenham um papel fisiológico importante. Nos experimentos efetuados, quantificamos os níveis dos endocanabinóides AEA e 2-AG no hipocampo, córtex e cerebelo. Portanto, estas foram as mesmas regiões escolhidas para quantificação dos níveis de LXA₄. Como ilustrado na figura 23 abaixo, todas as regiões analisadas expressam níveis basais de LXA₄ em menor ou maior grau. Curioso notar que de certa forma os níveis endógenos de LXA₄ seguem os níveis de AEA (maior presença no hipocampo), mas não os de 2-AG (maior presença no córtex), pelo menos entre as áreas analisadas.

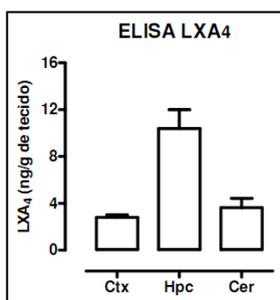


Figura 23 – Quantificação dos níveis endógenos de LXA₄ no cérebro. LXA₄ foi quantificada por ELISA no córtex (Ctx), hipocampo (Hpc) e cerebelo (Cer) de camundongos. (n=5)

Experimento 13: Quantificação dos níveis de receptores ALX no cérebro de camundongos. O experimento de avaliação dos possíveis níveis de receptores ALX no cérebro de camundongos foi parcialmente bem sucedido. Dificuldades técnicas relacionadas à revelação das bandas com anticorpo secundário ligado à fosfatase alcalina nos impediram de realizar uma quantificação precisa dos níveis destes receptores, até o presente momento. Uma avaliação qualitativa preliminar utilizando corante sensível a proteínas revelou a existência maciça de receptores ALX no baço, utilizado como controle positivo, de acordo com descrição presente na literatura (Chiang et al., 2003). A mesma análise preliminar sugere a ausência ou presença em baixíssimas concentrações de receptores ALX no cérebro (hipocampo, cerebelo e córtex), pelo menos comparado aos níveis encontrados no baço.

Experimento 14: Investigação dos efeitos da inibição da enzima de síntese de LXA₄ na transmissão endocanabinóide. Com a

confirmação de que a LXA_4 se encontra no cérebro, a segunda abordagem utilizada para investigar seu papel fisiológico foi investigar se a inibição da síntese de LXA_4 pelo MK-886 (0,3 – 3 mg/kg, i.p.) influencia a ação farmacológica da AEA (200 pmol/ 2 μ l, i.c.v.). A figura 24 abaixo ilustra estes resultados, analisados por ANOVA de 1 via (tratamento). A inibição da enzima 5-LOX pelo MK-886 reduziu a catalepsia induzida pela AEA [F(3,24)=3,38; $p < 0,05$]. A dose de 3 mg/kg de MK-886 reduziu em cerca de 60% o efeito da AEA ($p < 0,05$). Para confirmar se foi mesmo a redução dos níveis de LXA_4 o responsável pelos efeitos comportamentais do MK-886, decidimos repetir o experimento tentando reverter os efeitos do MK-886 (3 mg/kg, i.p.) injetando LXA_4 exógena (0,01 – 1 pmol/ 2 μ l, i.c.v.). Replicando o experimento anterior, a injeção de MK-886 reduziu a catalepsia induzida pela AEA ($t = -4,76$; $p < 0,01$). A injeção de LXA_4 exógena re-estabeleceu os efeitos da AEA, mesmo com a inibição da 5-LOX [F(3,19)=3,27; $p < 0,05$]. A dose de 1 pmol de LXA_4 foi diferente do grupo controle (MK-886 + AEA), re-estabeleceu completamente o efeito da AEA ($p < 0,05$).

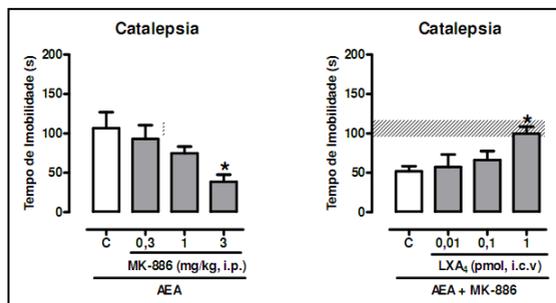


Figura 24 - LXA_4 endógena participa dos efeitos centrais do endocanabinóide AEA. O inibidor da enzima de síntese da LXA_4 MK-886 (0,3 – 3 mg/kg, i.p.) ou controle (C) foram injetados 55 min antes da injeção de uma dose efetiva de AEA (200 pmol/ 2 μ l, i.c.v.). LXA_4 (0,01 – 1 pmol / 2 μ l, i.c.v.) foi co-injetada com AEA (200 pmol/ 2 μ l, i.c.v.) na tentativa de reverter o efeito de inibição da 5-LOX pelo MK-886 (3 mg/kg, i.p.) na catalepsia induzida pela AEA. Em ambos os casos, os animais foram submetidos ao teste da catalepsia 5 min depois da injeção de AEA. * $p < 0,05$ vs Controle (post-hoc de Duncan). A barra hachurada no painel da direita representa o intervalo \pm e.p.m. de um grupo tratado com AEA 200 pmol. (n=6-8 e n=5-6).

5.4 - GRUPO 4: A 15-EPI-LXA₄ GERADA PELA ASPIRINA COMPARTILHA DOS EFEITOS CANABIMIMÉTICOS OBSERVADOS PARA A LXA₄ DE OCORRÊNCIA NATURAL?

Experimento 15: Interação da aspirina com o endocanabinóide AEA no teste da catalepsia em camundongos. Inicialmente realizamos um experimento de dose-resposta para definir se a aspirina (30 – 300 mg/kg, p.o.) poderia potencializar o efeito de uma dose sub-efetiva de AEA (10 pmol/ 2 µl, i.c.v.). A figura 25 abaixo ilustra estes resultados. A análise dos resultados por ANOVA de 1 via (tratamento) revelou que a aspirina potencializa a catalepsia induzida por uma sub-dose de AEA [F(3,24)=11,83; p<0,0001], com efeito maior na dose de 300 mg/kg comparado ao grupo controle e às outras doses (p<0,05). Além do mais, analisando o decurso temporal por ANOVA de 2 vias (tratamento, tempo), identificamos que houve interação entre tratamento e tempo de administração [F(3,21)=8,89; p<0,0001]. A potencialização dos efeitos da AEA pela aspirina foi máxima quando o inibidor da COX foi administrado 30 min antes (p<0,05).

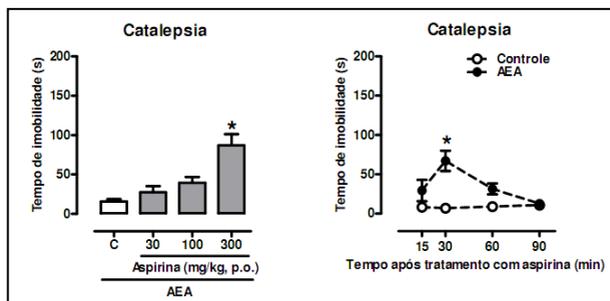


Figura 25 – Aspirina potencializa os efeitos centrais do endocanabinóide AEA. Aspirina (30 - 300 mg/kg, p.o.) ou controle (C) foram administrados antes de uma dose sub-efetiva de AEA (10 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou controle (C) e os animais foram submetidos ao teste da catalepsia 5 min depois. * p<0,05 vs Controle (post-hoc de Duncan). (n=7 e n=6).

Experimento 16: Investigação da participação da enzima 5-LOX na potencialização dos efeitos da AEA induzida pela aspirina no teste da catalepsia em camundongos. Com o objetivo de investigar a participação de derivados da 5-LOX na potencialização dos efeitos da AEA pela aspirina, os animais foram tratados com o inibidor MK-886 (1

mg/kg, i.p.) antes da administração de aspirina (300 mg/kg, p.o.) e AEA (10 pmol/ 2 µl, i.c.v.). A figura 26 abaixo ilustra os resultados deste experimento. A análise dos resultados por ANOVA de 2 vias (pré-tratamento, tratamento) identificou interação entre os fatores [F(1,26)=21,74; p<0,0001)]. A aspirina potencializou o efeito da AEA comparado ao grupo controle (p<0,05), confirmando o experimento anterior. A inibição da 5-LOX aboliu a catalepsia induzida pela associação entre aspirina e AEA (p<0,05).

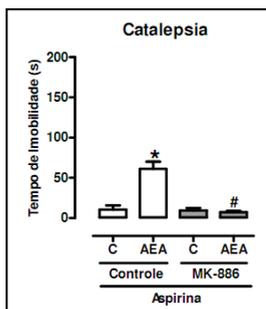


Figura 26 – Derivado da 5-LOX gerado pela aspirina participa da potencialização dos efeitos centrais da AEA. Aspirina (300 mg/kg, p.o.) foi administrada antes de uma dose sub-efetiva de AEA (10 pmol/ 2 µl, i.c.v.) na presença do inibidor da 5-LOX MK-886 (1 mg/kg, i.p.) ou controle. Os animais foram submetidos ao teste da catalepsia 5 min depois da injeção de AEA. *p<0,05 vs C-Controlle #p<0,05 vs AEA-Controlle (post-hoc de Duncan)(n=7-8).

Experimento 17: Interação da 15-epi-LXA₄ com o endocanabinóide AEA no teste da catalepsia em camundongos. Como o experimento anterior sugeriu a participação de um derivado da 5-LOX na potencialização dos efeitos da AEA pela aspirina, o próximo passo foi testar diretamente se a co-injeção de 15-epi-LXA₄ potencializa os efeitos da AEA. Os resultados deste experimento estão ilustrados na figura 27 abaixo.

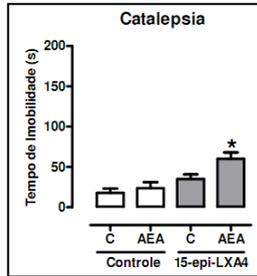


Figura 27 – A lipoxina gerada pela aspirina potencializa os efeitos centrais da AEA. 15-epi-LXA₄ 0,01 pmol/ 2 µl, i.c.v.) foi administrada antes de uma sub-dose de AEA (10 pmol/ 2 µl, i.c.v.) ou controle (C). Os animais foram submetidos ao teste da catalepsia 5 min depois da injeção de AEA. * $p < 0,05$ vs Controle (post-hoc de Duncan)($n=8-10$).

A análise dos dados por ANOVA de 1 via (tratamento) identificou diferença entre os grupos [F(3, 32)=7,69; $p < 0,001$]. Enquanto ambas as doses de AEA e 15-epi-LXA₄ foram sub-efetivas per se, a combinação de ambas induziu catalepsia comparada ao grupo controle ($p < 0,05$).

Experimento 18: Investigação da participação de receptores canabinóides CB₁ ou de receptores de lipoxina ALX na potencialização dos efeitos da AEA induzida pela 15-epi-LXA₄ no teste da catalepsia em camundongos. Por último, com o objetivo de investigar se a lipoxina derivada da aspirina 15-epi-LXA₄ compartilha o mecanismo de ação da LXA₄ de ocorrência natural, injetamos os animais com o antagonista de receptores canabinóides CB₁ SR141716A (1 mg/kg, i.p.) ou o antagonista dos receptores ALX BOC-2 (10 µg/kg, i.p.) antes da repetição do experimento de interação da 15-epi-LXA₄ com a AEA. Os resultados deste experimento estão ilustrados na figura 28 abaixo. A análise do experimento com SR141716A por ANOVA de 2 vias (pré-tratamento, tratamento) identificou interação entre pré-tratamento e tratamento [F(1,20)=7,08; $p < 0,01$]. A combinação de doses sub-efetivas de 15-epi-LXA₄ e AEA induziu catalepsia comparada ao grupo controle ($p < 0,05$), que foi prevenida pelo tratamento com o antagonista SR141716A ($p < 0,05$). Pelo contrário, a mesma análise aplicada ao experimento com BOC-2 identificou apenas efeito do tratamento [F(1,25)=16,95; $p < 0,001$], sem efeito do antagonista [F(1,25)=0,08; $p = 0,77$] ou da interação entre os fatores [F(1,25)=0,00; $p = 0,97$].

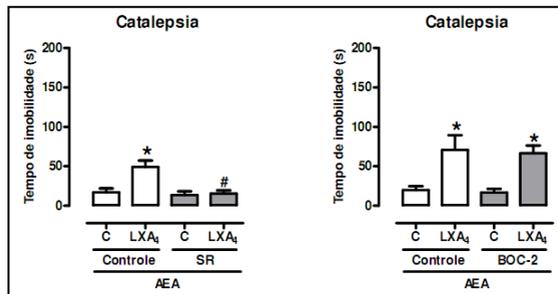


Figura 28 – Receptores canabinóides CB_1 participam dos efeitos centrais da 15-*epi*-LXA₄. O tratamento com SR141716A (1 mg/kg, i.p.) preveniu a potencialização de uma sub-dose de AEA (10 pmol/ 2 μ l, i.c.v.) pela 15-*epi*-LXA₄ (0,01 pmol/ 2 μ l, i.c.v.). Não houve efeito de tratamento semelhante realizado com o antagonista dos receptores ALX BOC-2. * $p < 0,05$ vs AEA-Controle # $p < 0,05$ vs AEA-LXA₄ (post-hoc de Duncan)($n=6$ e $n=6-8$).

6 – DISCUSSÃO

A imensa maioria dos estudos científicos sobre a LXA₄ disponíveis abordam a sua atividade modulatória sobre o excesso de tráfego leucocitário, que parece ser a base celular do seu amplamente estudado efeito de promover a resolução da inflamação (McMahon et al., 2001). As lipoxinas são reconhecidos agentes anti-inflamatórios endógenos que efetuam a resolução programada de processos inflamatórios por regulação de eventos pró-inflamatórios, como a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Hachicha et al., 1999), a rolagem e aderência de leucócitos na microcirculação (Scalia et al., 1997), liberação de IL-8 induzida por TNF α ou patógenos externos (Gewirtz et al., 1998; Gronert et al., 1998) e inibição da via do fator de transcrição NF κ B (Gewirtz et al., 2002). O efeito geral seria a regulação do excesso de ativação leucocitária, inibição da infiltração de polimorfonucleares e diminuição da permeabilidade vascular (Takano et al., 1998). Desta maneira, o potencial terapêutico das lipoxinas como substâncias anti-inflamatórias vêm sendo atualmente explorado, inclusive com o desenvolvimento de análogos sintéticos da LXA₄ e 15-epi-LXA₄ que são metabolicamente estáveis e comercialmente viáveis. Estes análogos causam efeitos muito similares aos da LXA₄ e 15-epi-LXA₄ originais promovendo a regulação de diversos mediadores pró-inflamatórios com propriedades terapêuticas potenciais em doenças inflamatórias e auto-imunes (Schottelius et al., 2002).

Como diversos anos de pesquisa científica já estabeleceram a LXA₄ como um anti-inflamatório natural, a proposta de nosso estudo foi justamente investigar outras possíveis atividades da LXA₄, tendo como foco o SNC. Até a realização da investigação farmacológica apresentada nesta tese de doutorado, pouquíssimos estudos haviam investigado a atividade central da LXA₄. No nosso conhecimento, apenas 4 artigos estão atualmente disponíveis em língua inglesa nas bases de dados acessadas (PubMed, ScienceDirect, Google Scholar), cujos resultados essenciais foram apresentados na tabela 2 da Introdução. Nenhum destes estudos realizados no final da década de 80 e início da década de 90 associou os efeitos da LXA₄ a algum receptor ou alvo farmacológico conhecido no SNC, mas curiosamente, todos os resultados descritos na literatura sugerem efeitos da LXA₄ que são muito similares aos efeitos causados pela ativação de receptores CB₁ pelos endocanabinóides, principalmente pela AEA. Resumidamente, os estudos anteriores sugeriram que a LXA₄ pode ser liberada no cérebro durante eventos

isquêmicos (Kim, 1988), ativa o subtipo neuronal da PKC (Shearman et al., 1988), aumenta a duração do sono de ondas lentas (Sri Kantha et al., 1994) e participa do processo de LTP no hipocampo (Williams e Bliss, 1988). Estas evidências da literatura, somadas à grande similaridade estrutural da LXA₄ com os endocanabinóides foram a principal inspiração para a idealização deste projeto. A possível identificação de um ponto de interação entre 2 vias conhecidas de eicosanóides já seria motivação suficiente para a realização deste trabalho. Contudo, se os endocanabinóides exercem tantas funções importantes no organismo, como a comunidade científica internacional vem demonstrando, a possibilidade de caracterizar a LXA₄ como um novo canabinóide de origem natural nos pareceu extraordinariamente tentadora.

De fato, a caracterização psicofarmacológica da LXA₄ identificou atividade canabimimética no teste da tétrade de efeitos canabinóides, envolvendo avaliação de atividade locomotora, temperatura corporal, sensibilidade à dor e catalepsia. A hipolocomoção, hipotermia, analgesia e catalepsia induzidas pela LXA₄ nos camundongos envolveu participação de receptores canabinóides CB₁, em maior ou menor grau, e não envolveu a participação de receptores ALX de lipoxina. O teste comportamental da catalepsia foi utilizado como ferramenta para uma abordagem mais aprofundada visando à caracterização da participação do sistema endocanabinóide nos efeitos centrais da LXA₄. Como próximo passo, excluímos novamente a participação de receptores ALX na catalepsia induzida pela LXA₄ utilizando co-injeção cerebral de LXA₄ e o antagonista dos receptores ALX BOC-2 e confirmamos a participação de receptores canabinóides CB₁ com o uso de camundongos *knock-out* para estes receptores. Estes experimentos nos permitiram caracterizar que a LXA₄ exerce efeito canabinóide no SNC, mas de maneira nenhuma nos permitem excluir que ela exerça outros efeitos comportamentais via receptores ALX, uma vez que a triagem inicial de atividade central envolveu parâmetros comportamentais e fisiológicos que são caracteristicamente afetados pelos canabinóides. Além do mais, nossa abordagem experimental da participação dos receptores ALX foi um tanto quanto limitada pela utilização exclusivamente de abordagem farmacológica usando apenas uma classe de antagonista. Visando identificar se há possibilidade de envolvimento dos receptores ALX em alguma função cerebral, realizamos um experimento de Western blot tentando identificar os receptores ALX no cérebro, já que nem mesmo a União Internacional de Farmacologia (IUPHAR) possui uma posição inequívoca sobre a existência de

receptores ALX no SNC (Brink et al., 2003). O padrão de expressão dos receptores ALX nas áreas cerebrais estudadas (hipocampo, córtex e cerebelo) foi pouco expressivo, apesar da evidente expressão de receptores ALX no baço, utilizado como experimento controle na validação da metodologia utilizada. Nosso experimento confirmou experimentos anteriores, demonstrando a expressão dos receptores ALX em órgãos imunológicos (Chiang et al., 2003), e sugere a ausência destes receptores no cérebro. Contudo o padrão de expressão dos receptores ALX em células imunológicas e seu importante papel nos processos inflamatórios sugere que os ALX possam ser expressos na glia (Verdier e Penke, 2004).

Considerando a hipótese canabinóide confirmada pelos experimentos comportamentais iniciais, passamos à investigação *in vitro* com o objetivo de identificar um mecanismo de ação concreto para a LXA₄ no cérebro. Surpreendentemente, esta busca nos levou à identificação de um provável ligante endógeno para um sítio ainda pouco estudado dos receptores canabinóides CB₁. O primeiro passo foi a realização de um ensaio de ligação contra o antagonista seletivo para os receptores canabinóides CB₁ [³H]SR141716A em membranas de cérebro de camundongos. O resultado indicou dois sítios de interação para a LXA₄ neste sistema, um de baixa e outro de alta afinidade. A ligação da LXA₄ no sítio de alta afinidade, provavelmente o mais relevante em níveis fisiológicos, inibiu cerca de 25% da ligação do antagonista CB₁. De toda maneira, a LXA₄ não inibiu nem 50% da ligação deste antagonista até a concentração relativamente alta de 10 μM. A AEA inibiu praticamente toda a ligação do antagonista CB₁ na concentração de 1 μM no mesmo ensaio, também com dois sítios de interação identificados. A conclusão geral deste experimento é que aparentemente a LXA₄ não é um ligante dos receptores canabinóides CB₁ com afinidade comparável a dos ligantes endógenos conhecidos. A fim de confirmar esta hipótese, realizamos um experimento de órgão isolado na preparação de ducto deferente, que é sabidamente sensível à ação de canabinóides e foi utilizada para a caracterização de muitos dos ligantes canabinóides conhecidos hoje em dia (Pertwee et al., 1995). A LXA₄ demonstrou baixa eficácia em inibir as contrações induzidas eletricamente no ducto deferente, corroborando os resultados do ensaio de ligação. A inibição máxima alcançada foi de apenas 25% a 1 μM, com evidente formação de platô no efeito máximo. Como comparação, a AEA provocou o dobro da inibição de contração na mesma concentração que a LXA₄. Os dois sítios de interação para a LXA₄ e

AEA no experimento de *binding* provavelmente se devem à existência de diferentes populações de receptores CB₁ no cérebro, os receptores CB₁ propriamente dito e a variante estrutural CB_{1a} (Ryberg et al., 2005).

Até o momento, 3 subtipos de receptores CB₁ gerados por splicing de mRNA foram identificados por PCR (CB₁, CB_{1a} e CB_{1b}). O subtipo originalmente descrito de receptores CB₁ é expresso prioritariamente no cérebro e intestino delgado (jejuno), o subtipo CB_{1b} é expresso prioritariamente em tecidos periféricos como nos intestinos delgado (jejuno) e grosso (cólon), útero e em cérebro fetal, enquanto o subtipo CB_{1a} é expresso em uma ampla variedade de tecidos, incluindo adipócitos, testículo, pele, pulmões, coração, intestinos (jejuno, duodeno e cólon), útero, musculatura esquelética e cérebro (adulto e fetal) (Ryberg et al., 2005). Neste mesmo estudo não foi detectada a presença de mRNA para nenhum dos subtipos de receptores CB₁ no fígado, baço e rins (Ryberg et al., 2005). Uma explicação alternativa para a existência de dois sítios de interação para a AEA e LXA₄ em nosso ensaio de ligação com membranas de tecido cerebral seria a ligação destes lipídeos (assim como do [³H]SR141716A) em outros receptores, por exemplo o GPR55 (Ryberg et al., 2007). O mRNA para os receptores GPR55 foi encontrado em diversos tecidos como glândulas adrenais, baço, intestinos (jejuno e íleo), medula espinhal e cérebro (hipocampo, córtex, cerebelo, estriado, hipotálamo, tronco cerebral) (Ryberg et al., 2007). Até onde se sabe, os receptores GPR55 também possuem afinidade para algumas das moléculas consideradas endocanabinóides, como AEA, 2-AG, noladin, virodamina, além do próprio Δ⁹-THC. Curiosamente algumas moléculas sintéticas como o WIN55,212-2 e o AM281 não se ligam nestes receptores (Ryberg et al., 2007).

Estes experimentos nos desencorajaram a procurar por um mecanismo de ação puramente CB₁ “clássico” para a LXA₄ no cérebro. Consideramos que a baixa afinidade e potência da LXA₄ nos ensaios *in vitro* preditivos para atividade canabimimética não são suficientes para explicar o potente efeito canabinóide observado nos experimentos comportamentais. Retornando à abordagem comportamental, resolvemos investigar se o mecanismo de ação da LXA₄ poderia envolver cooperação farmacológica com os endocanabinóides. Em baixíssima faixa de doses, a LXA₄ claramente potencializou o efeito de uma dose sub-efetiva de AEA, sem qualquer alteração no efeito do 2-AG. Este experimento foi repetido e o mesmo padrão de resposta se manteve. Enquanto nos sugeria que o mecanismo de ação da LXA₄ envolvia interação com os endocanabinóides, este experimento também

nos mostrava que havia diferenças importantes entre a AEA e o 2-AG no que tange à interação com a LXA₄ que deveriam ser levadas em consideração. Este foi certamente o primeiro indício sugerindo claramente que a LXA₄ poderia exercer seu efeito tipo canabinóide em outro alvo molecular ou em um sítio dos receptores CB₁ alternativo ao sítio ortostérico “clássico” onde supostamente se ligam tanto a AEA quanto o 2-AG.

A primeira tentativa de identificar um mecanismo com essa característica foi investigar se a LXA₄ poderia exercer algum efeito sobre a atividade das enzimas de degradação de endocanabinóides. Faria sentido imaginar que a diferença nos resultados dos experimentos de interação da LXA₄ com a AEA e o 2-AG fosse resultante de uma inibição da enzima de degradação da AEA e ausência de efeito da LXA₄ sobre a degradação de 2-AG. No entanto, os resultados dos *ensaios in vitro* desenhados para testar esta hipótese demonstraram que a LXA₄ não altera a atividade da FAAH, enzima de degradação da AEA, nem da MAGL, enzima de degradação do 2-AG. Estes resultados foram confirmados em um experimento mais elaborado, em que investigamos o impacto da administração de uma dose cataleptogênica de LXA₄ nos níveis de AEA e 2-AG em 3 estruturas cerebrais. Não houve qualquer diferença relacionada ao tratamento com LXA₄ nos níveis de endocanabinóides no hipocampo, córtex ou cerebelo, confirmando que a LXA₄ não altera a degradação dos mesmos *in vivo*. Além do mais, este experimento refutou de antemão qualquer hipótese de mecanismo relacionado à alteração na síntese ou recaptção, bem como o possível envolvimento de vias secundárias de metabolismo dos endocanabinóides avaliados.

Examinados os alvos farmacológicos tradicionais, tentamos elaborar uma hipótese de trabalho que fosse plausível o suficiente para ser testada. Então decidimos tentar esclarecer esta situação repetindo o experimento de interação entre a LXA₄ e AEA, mas desta vez utilizando os ensaios *in vitro* que havíamos padronizado. Estes interessantes resultados nos demonstraram que a LXA₄ contribui para a ligação da AEA pelos receptores CB₁ nas membranas de cérebro, aumentando a afinidade da AEA por estes receptores em cerca de 11 vezes no sítio de alta afinidade e em 2 vezes no sítio de baixa afinidade. Este aumento de afinidade da AEA ocorreu numa faixa de concentração de LXA₄ baixa o bastante para se supor que ele constitua um efeito fisiologicamente relevante. Mais uma vez, a existência de múltiplos sítios de interação no ensaio de ligação sugere que haja interação em sítios diferentes dos

receptores CB₁, subtipos diferentes de receptores CB₁ ou ainda outros alvos moleculares envolvidos. No experimento de órgão isolado, o efeito da interação entre LXA₄ e AEA não foi exatamente o mesmo observado no ensaio de ligação. Enquanto a LXA₄ e a AEA induzem, respectivamente, baixa e média inibição da contração da preparação de ducto deferente, a combinação destes dois eicosanóides surpreendentemente induziu um leve aumento na contração da preparação. Este resultado é um tanto quanto intrigante, mas foi observado contundentemente em nosso experimento. Por isso, testamos os efeitos da interação entre a LXA₄ e o agonista canabinóide WIN55,212-2 nas contrações do ducto deferente isolado e desta vez a LXA₄ potencializou a inibição das contrações por este canabinóide sintético. Se por um lado, estes resultados confirmam a suspeita de que a LXA₄ contribui para a transmissão dos receptores CB₁ *in vivo* interagindo com a AEA, ela também relembra o fato de que cada molécula canabinóide possui efeitos diferenciados nos tecidos em que a neuromodulação endocanabinóide atua, lembrando o conceito de “seletividade funcional” do sistema endocanabinóide apresentado na introdução desta tese. Diferenças na organização dos ensaios de ligação e órgão isolado, assim como na constituição de membrana das preparações de cérebro e ducto deferente devem explicar os diferentes resultados alcançados. Enquanto o ensaio de ligação realizado nos permite observar efeitos relacionados aos receptores CB₁, pois a “resposta” final que se observa é a inibição da ligação de um antagonista específico destes receptores, o ensaio de inibição das contrações de ducto deferente não permite inferências sobre a natureza dos receptores envolvidos, a não ser que uma abordagem de antagonismo farmacológico seja realizada, uma vez que diversos receptores diferentes podem modular as contrações induzidas eletricamente nesta preparação.

Já que a AEA e a LXA₄ inibiram a ligação do [³H]SR141716A em membranas de cérebro de camundongos, a interpretação natural deste resultado seria que ambas as moléculas se ligam a receptores canabinóides CB₁ com diferentes afinidades. Seguindo esta linha de raciocínio, a AEA induziria resposta máxima na concentração de 10 μM, inibindo praticamente toda a ligação do [³H]SR141716A (0,5 nM), enquanto que na mesma concentração de 10 μM a LXA₄ induziu somente metade do efeito inibitório máximo. O teste de concentrações mais altas de LXA₄ foi prejudicado pela baixa concentração dos estoques disponíveis comercialmente para esta molécula, que dificultam tecnicamente o experimento pela necessidade de evaporação de solvente

e aumento de concentração de estoque e inviabilizam financeiramente os experimentos devido ao alto custo destes estoques, principalmente se considerarmos a expressiva carga de impostos incluída nos preços dos produtos científicos importados. Do ponto de vista de importância fisiológica, a interpretação acima sugere que a AEA seria um ligante de relativa baixa afinidade para os receptores CB₁ e a LXA₄ possui uma afinidade praticamente desprezível para estes receptores. No entanto, se considerarmos a altíssima potência da LXA₄ i.c.v. no ensaio da catalepsia *in vivo*, cerca de 500 vezes a da AEA, aliado ao substancial aumento de afinidade da AEA pelos receptores CB₁ provocado pela LXA₄ em uma concentração que *per se* não altera a ligação do [³H]SR141716A nas membranas cerebrais, pode-se pensar em uma interpretação alternativa destes resultados. Considerando o conjunto de resultados deste estudo, a hipótese mais provável de mecanismo de ação para explicar os efeitos da LXA₄ no sistema endocanabinóide é a de que a LXA₄ é um ligante de baixa afinidade no sítio ortostérico dos receptores CB₁, mas cumulativamente se liga a outro sítio onde favorece a afinidade da AEA pelos receptores CB₁. Este tipo de cooperação funcional entre moléculas diferentes, em sítios diferentes de um mesmo receptor ou oligômero proteico é chamada de alosterismo (Christopoulos e Kenakin, 2002) e seus possíveis mecanismos e implicações para a modulação endocanabinóide serão discutidos a seguir.

A visão clássica da teoria de receptores farmacológicos foi baseada nos estudos de enzimologia cinética que adotam a lei de ação das massas como o mecanismo básico de interação entre ligantes e receptores, assumindo na grande maioria das vezes o tipo de interação mais simples possível, reversível, saturável e na proporção de 1 receptor para 1 ligante, como o primeiro mecanismo de ação considerado. É uma tendência geral na análise de estudos de interação ligante-receptor considerar que a interação do ligante ocorre somente em um sítio de ligação primário, normalmente reconhecido pelos agonistas (endógenos e sintéticos) e pelos antagonistas competitivos (Christopoulos e Kenakin, 2002). O sítio de ligação primário de um receptor protéico é conceitualmente equivalente ao sítio de interação de uma enzima com seu substrato, regido pelas leis fundamentais da termodinâmica, segundo a teoria da ação das massas. Este sítio primário de interação ligante-receptor é denominado sítio ortostérico (Proska e Tucek, 1994; Christopoulos e Kenakin, 2002). Qualquer outro sítio deste receptor que seja capaz de alterar as propriedades de ligação de substâncias ao sítio

ortostérico por uma mudança na conformação do receptor é classificado como sítio alostérico (Christopoulos e Kenakin, 2002).

O marco inicial no desenvolvimento de uma teoria alostérica (que no entanto ainda não tinha esse nome) veio de evidência experimental sugerindo que mais de uma molécula de um ligante poderia se ligar a certas enzimas ou canais iônicos, gerando uma mudança perceptível na sua atividade e cinética, um fenômeno que na época foi chamado de “cooperatividade” (Hill, 1910). O termo alostérico (do grego “outro lugar”) foi usado pela primeira vez há meros 50 anos atrás na área de enzimologia (Monod e Jacob, 1961) e mais claramente definido em um artigo descrevendo a habilidade de certas enzimas de terem sua atividade biológica modificada positivamente ou negativamente pela ligação de substratos em sítios de ligação topograficamente distintos dos sítios de ligação ortostéricos descritos (Monod et al., 1963). As interações alostéricas acontecem quando a ligação de um ligante ao sítio alostérico induz mudanças conformacionais na proteína que modulam a ligação do substrato ao seu sítio ortostérico e vice-versa (Christopoulos e Kenakin, 2002). De fato, muitos dos mediadores alostéricos não exercem efeitos biológicos por si só, pois dependem da ligação de uma substância ao sítio ortostérico para que o efeito biológico sinalizado pelo receptor seja observado, ou seja, o efeito dos moduladores alostéricos é modular a afinidade de um ligante pelo seu sítio ortostérico, mas em geral não possuem ou possuem baixa eficácia, do ponto de vista farmacológico. As características principais de uma ligação alostérica em relação à ligação ortostérica são as seguintes:

- 1) Os sítios ortostéricos e alostéricos não se sobrepõem estruturalmente e as ligações nesses sítios não são mutuamente exclusivas, ou seja, a ligação a um sítio pode ocorrer simultaneamente à ligação no outro.
- 2) A ligação de uma substância a um sítio afeta a ligação de um segundo ligante ao outro sítio e vice-versa, ou seja, as ligações alostéricas e ortostéricas são recíprocas.
- 3) O efeito de um ligante alostérico pode ser positivo ou negativo em relação à ligação (afinidade) ou função (eficácia) de uma substância no sítio ortostérico.

Uma evolução na teoria de interações alostéricas foi o reconhecimento de que os receptores existem e se comportam como populações e não como entidades únicas, além do que a estrutura

terciária dos receptores possui mais de um estado conformacional. As flutuações estruturais (conformacionais) que alteram as propriedades de ligação de uma população de receptores foram a partir de então denominadas transições alostéricas (Monod et al., 1965). Depois da adoção deste conceito de múltiplos estados conformacionais para os receptores farmacológicos, definiu-se um conjunto de características para proteínas (enzimas, receptores) que podem ser modulados alostericamente:

- 1) Proteínas alostéricas possuem natureza oligomérica, ou seja, são formadas por mais de uma subunidade.
- 2) Subunidades diferentes podem possuir sítios de ligação, gerando interações estruturais cooperativas (positiva ou negativamente).
- 3) As subunidades podem se organizar como uma mistura de estados conformacionais diferentes, permanecendo em equilíbrio na ausência de ligantes. Essas transições entre conformações são denominadas transições alostéricas.
- 4) A transição entre estados conformacionais envolve a conservação de simetria molecular, de maneira que as subunidades movem-se coordenadamente de um estado para outro.
- 5) Ligantes que possuem maior afinidade por um determinado estado conformacional “selecionam” este estado conformacional, deslocando o equilíbrio dinâmico de maneira a aumentar a proporção de proteínas naquele estado. Como consequência, a afinidade observada para um determinado ligante varia dependendo do tipo e da proporção de estados conformacionais disponíveis.

Esta mudança de conceito estrutural do receptor farmacológico trouxe duas mudanças fundamentais de paradigma. Primeiro, os cientistas passaram a considerar os receptores como uma população de estados conformacionais possíveis e em equilíbrio dinâmico ao invés de uma estrutura rígida cujo estado ativado era induzido pela presença de um ligante (Kenakin, 1995). Segundo, passou-se a admitir que o(s) estado(s) ativado(s) de um receptor possa(m) ocorrer em um determinado tecido na ausência de ativação induzido por ligante, introduzindo o conceito de atividade intrínseca (Leff, 1995). A possibilidade mais simples considerando este modelo seria a existência de dois estados conformacionais dos receptores, um estado “inativo” e um “ativado”. Este modelo de dois estados, assim como sua elaboração,

o modelo de múltiplos estados, envolve um mecanismo de seleção conformacional por ligante, pelo qual uma molécula se liga seletivamente a uma conformação pré-existente do receptor, criando um viés que aumenta proporcionalmente a quantidade desta conformação por deslocamento de equilíbrio dinâmico. O modelo de múltiplos estados conformacionais é termodinamicamente preferível em relação ao modelo antigo de indução conformacional, onde o ligante era o principal responsável na geração da nova conformação do receptor (Burgen, 1981; Kenakin, 1995). A figura 29 abaixo ilustra o modelo teórico mais simples de equilíbrio dinâmico de múltiplos (2) estados conformacionais.

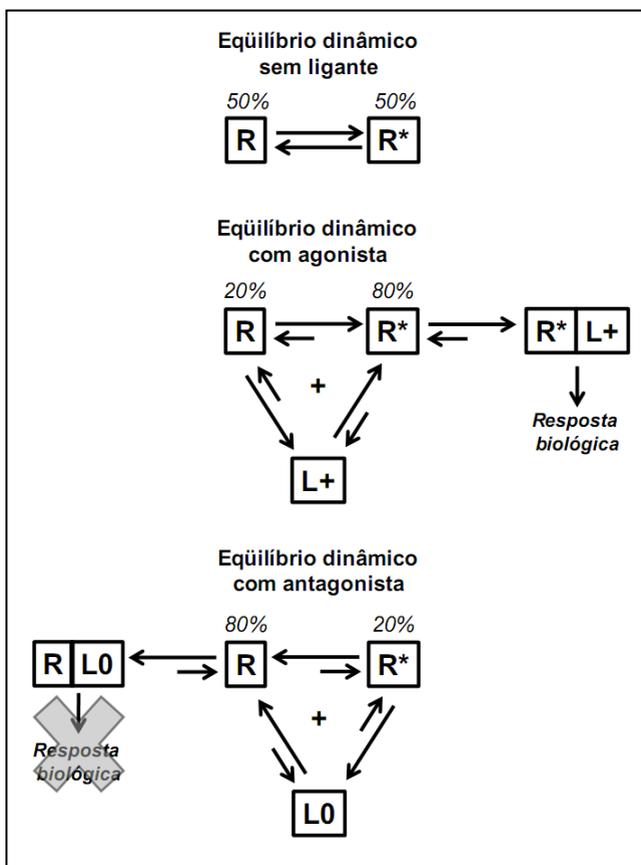


Figura 29 – Ilustração do modelo teórico de múltiplos estados conformacionais de receptores farmacológicos. Duas (ou mais) conformações de receptores coexistem em equilíbrio dinâmico. As porcentagens sugerem proporções da população de receptores em estado de equilíbrio dinâmico, na presença de ligantes agonistas ou antagonistas. Segundo este modelo teórico, a ativação de um receptor por um agonista ocorre quando o agonista estabiliza a conformação ativada do receptor, que possui afinidade para a proteína G respectiva. R: receptor inativo, R:receptor ativado; L+:ligante agonista; L0:ligante antagonista.(Figura baseada em Christopoulos e Kenakin (2002).*

O modelo de múltiplos estados simplifica a compreensão do alosterismo, permitindo que a modulação alostérica exista simplesmente como uma conseqüência natural da preferência de um ligante por um estado conformacional ou outro, sem necessariamente implicar na existência de um segundo sítio físico de interação alostérica em cada conformação, como se inferiria a partir do modelo estático monoconformacional. No entanto, o modelo de interação alostérica entre dois sítios também não exclui a existência de múltiplos estados conformacionais, de maneira que ambas as explicações são complementares e podem se aplicar a situações diferentes. O conceito de múltiplos estados conformacionais será importante para a compreensão da visão farmacológica moderna de alosterismo nos receptores acoplados a proteínas G, assim como do conceito de seletividade funcional em receptores canabinóides CB₁, abordado mais a frente.

Os receptores acoplados a proteínas G (metabotrópicos) constituem a maior família de receptores farmacológicos e são responsáveis pela maioria dos eventos de transdução de sinal que ocorrem na célula. Estes receptores respondem a uma grande variedade de moléculas relativamente pequenas e de classes químicas bastante diversas, como aminas, peptídeos, hormônios e lipídeos promovendo mudanças conformacionais e interações proteína-proteína que resultam na passagem da informação química do meio extracelular (interação molécula-receptor) para o meio intracelular (interação receptor-proteína G) com as respostas características dependendo do tipo celular em questão. A proteína G possui sub-unidades α e $\beta\gamma$ que interagem com intermediários proteicos intracelularmente. A sub-unidade α possui atividade catalítica para guanosina-tri-fosfato (GTP), que é o princípio da ativação de cascatas intracelulares de fosforilação e amplificação de sinal intracelular (Christopoulos e Kenakin, 2002). Como já discutido anteriormente, os receptores ligados a proteínas G possuem afinidade para moléculas em seu sítio ortostérico (convencionalmente definido

como o sítio de ligação do agonista endógeno), mas também pode ser alvo de ligação de moduladores alostéricos que facilitam ou dificultam a ligação da molécula “principal” ao seu sítio ortostérico. A informação alostérica pode ser transmitida através do citosol da célula, afetando a interação entre o receptor farmacológico e seus efetores intracelulares como a proteína G e sistemas de transdução de sinal subseqüentes.

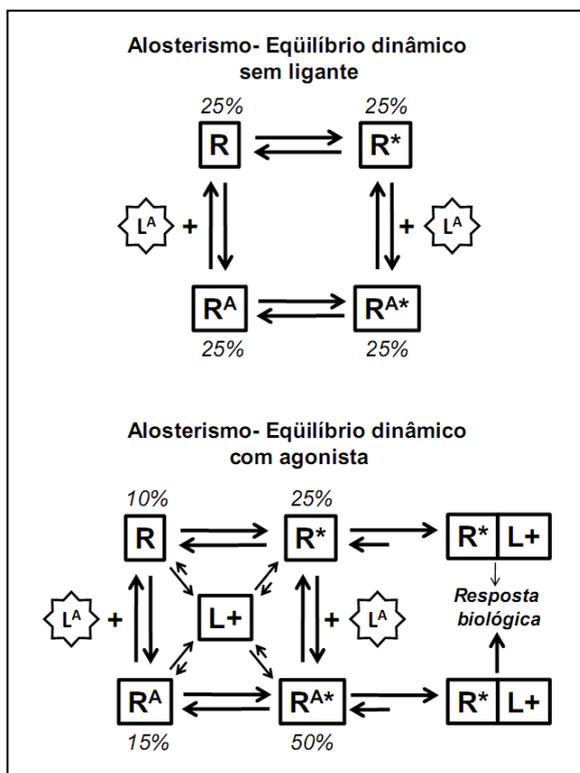


Figura 30 – Ilustração do modelo teórico de alosterismo conformacional de receptores farmacológicos. Duas (ou mais) conformações de receptores co-existem em equilíbrio dinâmico. As porcentagens sugerem proporções da população de receptores em estado de equilíbrio dinâmico, na presença de ligantes alostéricos e agonista. Segundo este modelo teórico, a ativação de um receptor por um agonista ocorre quando o agonista estabiliza a conformação ativada do receptor, que possui afinidade para a proteína G respectiva. O ligante alostérico se liga a uma conformação pré-ativada do receptor, aumentando a afinidade deste pelo ligante agonista e

possivelmente causando uma maior resposta biológica. R: receptor inativo, R:receptor ativado; RA:receptor inativo com ligante alostérico; RA*: receptor ativado com ligante alostérico; L+:ligante agonista; LA:ligante alostérico. (Figura baseada em Christopoulos e Kenakin (2002).*

Diferentes ligantes podem ativar vias de sinalização diferentes, dependendo da sua afinidade para os diversos sítios e estados conformacionais do receptor, esta propriedade foi denominada seletividade funcional (Kenakin, 2007). A natureza dos moduladores alostéricos é bastante permissiva, de modo que a função do modulador alostérico pode mudar ligeiramente dependendo do ligante ortostérico e dos mediadores intracelulares, como vimos acima. Essa possibilidade de “mudança” de atividade torna os moduladores alostéricos substâncias muito mais versáteis do que moduladores ortostéricos convencionais do ponto de vista farmacológico. Três características marcantes da ligação alostérica nos receptores ligados a proteínas G é que esta ligação é saturável, é mutuamente dependente do ligante ortostérico e pode causar efeitos diferenciados na afinidade e eficácia aparentes do ligante principal (Kenakin, 2009). Como os efeitos do alosterismo dependem em grande parte da alteração conformacional do receptor, não há regras muito bem definidas quanto ao que pode acontecer como resultado da interação com as diferentes moléculas que se ligam ao mesmo receptor. A modulação do sinal intracelular pode ser inclusive qualitativamente diferente da resposta causada pelo agonista endógeno, sintonizando as respostas funcionais de acordo com a necessidade celular momentânea (Jakubik et al., 1997). A figura 31 abaixo nos dá uma idéia da gama de possibilidades de modulação do efeito de um agonista total em uma determinada preparação por supostos moduladores alostéricos.

Algumas das interações entre proteínas são passageiras, como aqueles entre a porção intracelular de receptores metabotrópicos e as proteínas G ou uma cascata de transdução de sinal; outras vezes, as interações proteína-proteína são mais estáveis envolvendo a formação de complexos multiméricos estáveis e de longa duração. De toda forma, a interação entre proteínas envolve a formação de ligações entre elas e alterações estruturais que podem determinar as conseqüências funcionais desta interação. A figura clássica dos receptores metabotrópicos como entidades únicas (monômeros) está sendo revista desde a descoberta de que os receptores metabotrópicos podem formar complexos protéicos estáveis com outras proteínas além das proteínas G. Atualmente, inúmeras evidências apontam para o fato de que monômeros de receptores metabotrópicos podem interagir combinando-

se entre si (homodímeros) ou com monômeros de outros receptores metabotrópicos (heterodímeros) ou mesmo heterômeros de maior ordem, com 3 ou mais monômeros agrupados (Christopoulos e Kenakin, 2002). Um tipo característico de alosterismo pode surgir desta interação entre monômeros de receptores. Por exemplo, se o complexo multimérico possui propriedades farmacológicas diferentes das proteínas originais no que diz respeito à ligação de substâncias em seu sítio ortostérico, este tipo de interação é denominada alosterismo por multimerização e moduladores alostéricos podem agir em uma ou outra destas proteínas para alterar a resposta funcional final. A formação de complexos multiméricos é mais recente no campo de estudo dos receptores metabotrópicos, mas já é amplamente conhecido para outras famílias de receptores. Os receptores para fatores de crescimento como o EGF e FGF e para interferons foram identificados como homodímeros estruturais (Hebert e Bouvier, 1998). Da mesma forma, receptores ligados a canais iônicos também são conhecidos por ocorrerem em heterooligômeros, ou seja são compostos por múltiplas sub-unidades de diferentes tipos protéicos, cuja combinação pode levar a uma grande variedade de sub-tipos de receptores possíveis e funcionalmente viáveis (Galzi e Changeux, 1994).

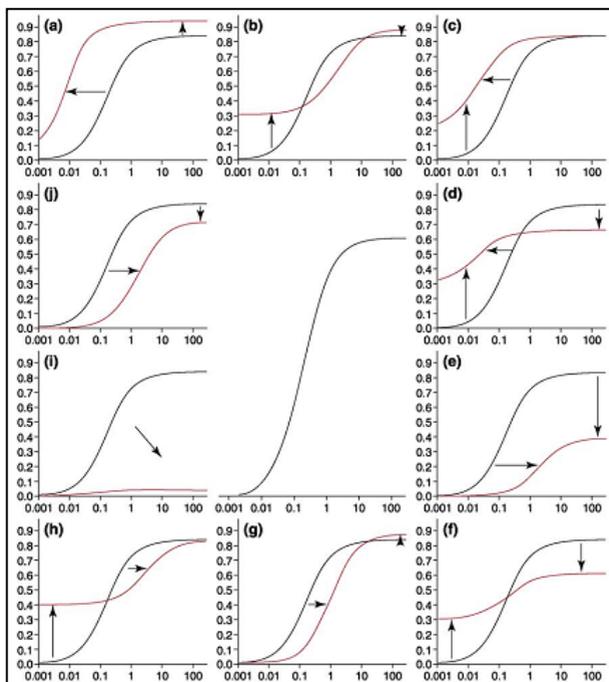


Figura 31 – Efeitos da modulação alostérica sobre a afinidade e eficácia de um agonista total. O painel central é o efeito do agonista total sem nenhuma interferência (linhas azuis). Todos os outros são possibilidades de modulação alostérica (linhas vermelhas). (Figura modificada de Kenakin (2009)).

Em suma, moduladores alostéricos podem influenciar os efeitos de agonistas no sítio ortostérico de um receptor por alteração de sua afinidade por este receptor, por influência da interação deste receptor com outros receptores (dímeros), com suas respectivas proteínas G ou via interação com outras proteínas integrantes da sinalização intracelular. Os moduladores alostéricos podem até mesmo modular a resposta celular a um dado agonista (sua eficácia) sem alterar sua ligação ao receptor (sua afinidade) (Kenakin, 2009). Importante lembrar, a modulação alostérica pode ocorrer com moléculas endógenas ou exógenas (sintéticas ou naturais). Enquanto as endógenas fazem parte do processo de regulação fina da transmissão celular, os moduladores alostéricos exógenos tem sido um grande alvo de busca por potencial terapêutico, com a promessa de promoverem menos efeitos colaterais do

que moduladores atuando diretamente nos sítios principais de ligação dos neurotransmissores. Uma das possíveis vantagens reais dos moduladores alostéricos seria a capacidade destas moléculas exercerem efeito seletivo em determinados tipos celulares ou tecidos que expressem o dímero de receptores para os quais o modulador alostérico possui alta afinidade (Milligan e Smith, 2007). Outro potencial efeito interessante dos moduladores alostéricos que pode ser terapêuticamente útil é a possibilidade de obtenção de um modulador negativo que reduza a eficácia ao mesmo tempo em que aumente a afinidade de um receptor pelo seu agonista. Como o alosterismo é recíproco, desta maneira teríamos um antagonista alostérico cuja afinidade aumentaria com o aumento da concentração do agonista. O resultado seria uma espécie de antagonista “inteligente” capaz de sentir as alterações de concentração do ambiente próximo ao receptor e ajustar a sua potência de acordo com estas variações (Kenakin, 2009). É exatamente isso que acontece com o modulador alostérico negativo dos receptores NMDA ifenprodil, para o qual foi demonstrado um aumento de potência com concentrações crescentes do agonista ortostérico NMDA (Kew et al., 1996). Além de fármacos e substâncias sintéticas, substâncias endógenas, neurotransmissoras também podem agir como moduladores alostéricos. Alguns exemplos de receptores que sofrem modulação alostérica endógena são os receptores nicotínicos de acetilcolina (Galzi et al., 1991) ou os receptores GABA_A de GABA (Sigel e Buhr, 1997), que ligam duas moléculas de seus agonistas endógenos, sendo que a ligação da primeira facilita cooperativamente a ligação da segunda molécula. No grupo dos receptores metabotrópicos, podemos citar como exemplo os receptores muscarínicos de acetilcolina que possui interações alostéricas entre 5 sub-unidades diferentes dependendo da composição do receptor muscarínico (Holzgrabe et al., 1996; Christopoulos et al., 1998). Esta diferença na composição de receptores multiméricos é uma das explicações para a diferença de afinidade observada para a mesma substância em tecidos/tipos celulares diversos.

Está cada vez mais evidente que os receptores metabotrópicos possuem sítios de ligação alostérica para ligantes endógenos e sintéticos e que a ligação do modulador alostérico provoca uma mudança no equilíbrio entre as diversas conformações do receptor, afetando a afinidade e/ou eficácia dos ligantes endógenos (Christopoulos e Kenakin, 2002). Considerando o objetivo desta tese, qual a importância da modulação alostérica para a sinalização celular via receptores canabinóides? Até há pouco tempo atrás, não se tinha o menor

conhecimento sobre a existência de sítios de modulação alostérica nos receptores canabinóides. Foi somente há 5 anos atrás que compostos sintéticos que atuam como moduladores alostéricos nos receptores canabinóides CB₁ foram desenvolvidos pela companhia farmacêutica inglesa Organon (Price et al., 2005). Estes compostos, batizados de Org27596 e Org29647 possuem características interessantes como moduladores alostéricos: eles aumentam a ligação e diminuem a constante cinética de dissociação do agonista canabinóide [³H]CP55940 a membranas do cérebro de camundongos, reduzem a eficácia de agonistas canabinóides do sítio ortostérico de maneira não competitiva e de maneira ligante-dependente, com efeitos diferentes para agonistas e antagonistas (Price et al., 2005). Ambos os compostos Org aumentam a afinidade do agonista [³H]CP55940 e reduzem a afinidade do antagonista [³H]SR141716A favorecendo a sinalização canabinóide (Price et al., 2005). Mais recentemente uma nova molécula PSNCBAM-1 foi sintetizada e caracterizada farmacologicamente, ampliando a dimensão da modulação alostérica canabinóide. Esta molécula possui um perfil farmacológico bastante diferenciado, pois aumenta a afinidade do agonista [³H]CP55940, mas diminui sua eficácia de recrutamento de proteínas G de forma não competitiva. Da mesma maneira que para as moléculas Org, o efeito do PSNCBAM-1 é ligante dependente, pois ele diminui a afinidade do antagonista [³H]SR141716A (Horswill et al., 2007). Estes dados invocam o princípio da seletividade funcional para os receptores canabinóides CB₁, sugerindo que os receptores se comportam diferentemente dependendo do tipo de ligante.

Apesar da contundente modulação alostérica positiva observada no ensaio de ligação, aumentando a ligação de moléculas no sítio do agonista, mas diminuindo a ligação no sítio do antagonista nos receptores canabinóides CB₁, o efeito mais intrigante do estudo comentado acima é provavelmente a diferença observada entre os efeitos dos compostos Org no ensaio de ligação e nos ensaios funcionais (Price et al., 2005). Ao contrário do observado no ensaio de ligação onde os compostos Org influenciaram a afinidade por modulação alostérica, os compostos Org se comportaram como antagonistas não-competitivos nos ensaios de acoplamento à proteína G com [³⁵S]GTPγS e no ensaio de inibição de contração neurogênica do ducto deferente isolado, diminuindo a eficácia e efeito máximo dos agonistas WIN55,212-2, CP55940 e AEA. Este efeito foi observado somente na presença dos ligantes ortostéricos, não houve evidência de agonismo ou

agonismo inverso pelos compostos Org per se sobre a contração do ducto deferente.

A proposta dos autores para explicar estes efeitos foi de que, segundo a teoria multiconformacional, os receptores CB₁ existem em pelo menos dois estados conformacionais, o antagonista SR141716A estabiliza uma conformação do receptor CB₁ em estado inativado, talvez acoplado à proteína G em estado de alta afinidade ao GDP, enquanto o agonista CP55940 estabilizaria o receptores CB₁ em uma conformação ativada, acoplado à proteína G ligada a GTP. Neste contexto, a função dos moduladores alostéricos seria manter os receptores CB₁ em um estado “pré-ativado”, de alta afinidade, já acoplado à proteína G, mas sem de fato implicar em sinalização intracelular (Ross, 2007). Assim, os compostos Org não seriam agonistas, antagonistas ou agonistas inversos dos receptores CB₁, mas uma classe à parte de moduladores químicos, pois eles praticamente não exercem nenhum efeito observável nas preparações *in vitro* na ausência de agonista. O PSNCBAM-1 também não alterou a sinalização de receptores CB₁ expressos heterologamente em células de leveduras por si só, mas antagonizou a inibição de sinal induzida pelo agonista CP55940 e interferiu com a sinalização canabinóide endógena diminuindo o consumo de alimento quase tão eficientemente quanto o antagonista SR141716A (Horswill et al., 2007). Mudanças de estados conformacionais dos receptores CB₁ dependendo do ligante interagindo com o receptor foram demonstradas por modelagem molecular (Shim e Howlett, 2006).

Em suma, os moduladores alostéricos de receptores CB₁ sintéticos estudados até o momento possuem efeitos marcadamente divergentes quanto à afinidade e eficácia dos ligantes ortostéricos. Estas moléculas aumentam a afinidade, ao mesmo tempo em que diminuem a eficácia dos agonistas canabinóides, gerando uma espécie de paradoxo farmacológico complexo (Ross, 2007). O maior legado desta descoberta pode contudo não ter sido a obtenção dos compostos Org e PSNCBAM-1 em si, mas o reconhecimento da existência e a caracterização dos sítios alostéricos nos receptores CB₁ e sua possível influência no sistema endocanabinóide. A exemplo do que aconteceu com o Δ^9 -THC e a AEA, a descoberta dos moduladores alostéricos sintéticos pode ser somente o primeiro passo na descoberta de mediadores endógenos que façam parte do sistema endocanabinóide ou mesmo que permitam um intercâmbio de informações entre sistemas de neurotransmissão paralelos.

Além do alosterismo via modulação por substâncias sintéticas agindo diretamente em sítios alostéricos do receptor, há também

evidências da modulação alostérica por dimerização dos receptores CB₁ com outros receptores metabotrópicos. Até o momento, sabe-se que os receptores CB₁ formam homodímeros com até 4 monômeros (tetrameros) de receptores CB₁ e heterodímeros com receptores D₂ de dopamina, receptores μ opióides, receptores A_{2A} de adenosina, receptores β_2 de noradrenalina e receptores OX₁ de orexina (Wager-Miller et al., 2002; Kearns et al., 2005; Ellis et al., 2006; Rios et al., 2006; Carriba et al., 2007). Essas interações multiméricas interferem em vários aspectos funcionais dos receptores CB₁, incluindo as vias de sinalização intercelular recrutadas pela ligação de agonistas canabinóides. A dimerização entre receptores CB₁ e D₂ foi inequivocamente demonstrada por imunoprecipitação e ocorre mesma na ausência de agonistas. No entanto, agonistas CB₁ tendem a aumentar a taxa de dimerização, enquanto agonistas inversos tendem a diminuir a associação entre os dois receptores (Kearns et al., 2005). Por meio da atuação nos dímeros CB₁-D₂, os agonistas CB₁ podem reverter a inibição da adenilato ciclase e da fosforilação de MAP produzida por agonistas D₂, causando um efeito contrário ao produzido pelo agonismo de receptores CB₁ expressos isoladamente (Glass e Felder, 1997; Kearns et al., 2005). A explicação provável para esse mecanismo cooperativo é que a dimerização com receptores D₂ faz com que os receptores CB₁ promovam uma troca diametralmente oposta de efetor intracelular e ativem proteínas G_s estimulatórias, ao invés das usuais proteínas G_{i/o} inibitórias (Jarrachian et al., 2004). Um fenômeno similar ocorre quando receptores CB₁ se dimerizam com receptores μ opióides, com conseqüente alteração da eficácia de ativação das vias de MAP quinase por agonistas canabinóides e opióides. Neste caso, a ativação de cada um dos receptores do dímero por seus agonistas gera ativação de sinalização via proteínas G_i inibitórias, enquanto a co-ativação dos receptores no dímero gera ativação de proteínas G_s estimulatórias (Rios et al., 2006). Por outro lado, a dimerização de receptores CB₁ e β_2 adrenérgicos resulta em um efeito contrário, promovendo a afinidade por proteínas G_i e praticamente impedindo o acoplamento a proteínas G_s. Este efeito é decorrente exclusivamente da interação física entre os receptores, uma vez que a administração de agonistas ou antagonistas β_2 adrenérgicos não altera a funcionalidade do dímero (Hudson et al., 2010). A co-ativação de receptores CB₁ e A_{2A} dimerizados também leva à ativação de proteína G_i inibitórias e inibição da produção de AMPc induzida por forskolin, muito embora os receptores CB₁ tenham capacidade de ativar proteínas G_i inibitórias por si só (Carriba et al.,

2007). Estes resultados indicam que a dimerização CB_1 - A_{2A} gera uma estrutura física que não permite o acoplamento a proteínas G_i na ausência de agonistas A_{2A} , funcionando como um detector de coincidência de sinal entre estes dois sistemas de neurotransmissão. Receptores CB_1 também formam dímeros funcionalmente ativos com receptores de orexina OX_1 . Esses receptores são co-expressos em algumas áreas cerebrais, particularmente no hipotálamo lateral onde modulam a atividade de ingesta de alimento, o que pode explicar os efeitos do modulador alostérico PSNCBAM-1 apresentados anteriormente. A potência da orexina A, o agonista endógeno dos receptores OX_1 , em ativar cascatas de fosforilação via MAP e ERK quinases foi aumentada em cerca de 100 vezes quando os receptores OX_1 foram co-expressos com receptores CB_1 em células ovarianas de hamsters, em comparação aos efeitos observados em células expressando somente os receptores OX_1 (Hilairt et al., 2003). O tratamento de células co-expressando os dois receptores com o antagonista CB_1 SR141716A provocou uma redução na capacidade da orexina A e o tratamento destas células com o antagonista OX_1 SB-674042 diminuiu a potência do agonista canabinóide WIN55,212-2 de ativar a via de fosforilação da MAP quinase, de acordo com o processo de reversibilidade mútua da modulação alostérica (Hilairt et al., 2003). Curiosamente, os receptores CB_1 também formam homodímeros, ou seja, dímeros de receptores iguais, com até quatro monômeros de CB_1 . Não se sabe ao certo qual a vantagem fisiológica desta forma cooperativa de alteração estrutural (Mackie, 2005). Uma possibilidade seria a cooperação entre diferentes variantes estruturais, receptores CB_{1a} e CB_{1b} como abordado anteriormente.

A pesquisa envolvendo alosterismo por dimerização pode indubitavelmente resultar na geração de drogas com alvos farmacológicos inovadores e com o potencial de agir diferentemente em determinados tipos celulares, rompendo com o dogma da procura por drogas que ajam isoladamente em um único receptor. Vale a pena comentar a opinião dos pesquisadores Miligan e Smith, para os quais:

“a identificação de moduladores alostéricos requer uma mudança na abordagem de triagem farmacológica utilizada na indústria farmacêutica, porque se um receptor é estudado isoladamente em uma linhagem de células heterólogas, a dimerização de receptores nunca será observada. Novas abordagens de triagem ou o retorno para o uso de tecidos íntegros na identificação de novos ligantes são necessários” (Milligan e Smith, 2007).

Tendo em vista as considerações acima e à luz dos resultados reunidos no presente estudo seria plausível sugerir a LXA₄ como um modulador alostérico endógeno dos receptores canabinóides CB₁. A interpretação dos efeitos da LXA₄ sobre a neurotransmissão endocannabinóide seria que ela aumenta a afinidade de ligantes como a AEA e o WIN55212-2 (e provavelmente não do 2-AG) para o sítio ortostérico de agonistas, exercendo uma pequena redução de afinidade no sítio de antagonista, como observado pelo ensaio com o SR141716A. O aumento de afinidade da AEA pelos receptores CB₁ é acompanhado de um contundente aumento de potência nos seus efeitos centrais, e por uma curiosa mudança qualitativa no efeito observado na neurotransmissão no ducto deferente. Uma possibilidade é que a LXA₄ estabilize uma forma pré-ativada do receptor CB₁ cerebral, mas não exerça acoplamento à proteína G e transdução de sinal intracelular (efeito funcional), até que ocorra a ligação de um agonista ortostérico. No ducto deferente, talvez pela diferença de constituição molecular no sítio onde os receptores CB₁ se encontram, ou por proporção diferente de isoformas dos receptores CB₁, ou ainda pela presença de receptores distintos, a ligação simultânea de LXA₄ e AEA provoca o acoplamento a proteínas G estimulatórias, ao invés das proteínas G inibitórias ativadas pela LXA₄ e AEA individualmente. O alosterismo por dimerização poderia explicar este efeito colaborativo, assim como foi demonstrado para a dimerização entre receptores CB₁ e D₂ ou CB₁ e μ opióides (Jarrahian et al., 2004; Kearns et al., 2005). Uma possibilidade seria a dimerização dos receptores CB₁ com os próprios receptores ALX de lipoxinas, isto considerando que os receptores ALX sejam expressos no ducto deferente (informação ainda indisponível). Outro candidato para mediador da inibição de contração causada pela AEA no ducto

deferente poderiam ser os receptores vanilóides TRPV₁, onde agem tanto a capsaicina quanto a AEA (Ross et al., 2001; Pertwee et al., 2005). A possibilidade de dimerização entre receptores CB₁ e TRPV₁ no ducto deferente é reforçada pelo fato de que tanto o antagonista CB₁ SR141716A quanto o antagonista TRPV₁ capsazepina bloqueiam indiscriminadamente os efeitos de agonistas canabinóides (AEA, m-AEA, WIN55,212-2) e vanilóides (capsaicina, resiniferatoxina) nesta preparação (Ross et al., 2001). Interessante notar que ao contrário do que ocorreu com a AEA, a inibição de contração do ducto deferente causada pelo agonista WIN55,212-2 foi potencializada pela LXA₄ demonstrando a seletividade funcional da modulação alostérica dos receptores CB₁ pela LXA₄.

Além disso, o perfil farmacológico apresentado pela LXA₄ na contração do ducto deferente (sensível ao SR141716A e na mesma direção do WIN55,212-2) é similar ao perfil observado para moléculas que se ligam ao suposto receptor “CB₃”, ainda não caracterizado molecularmente (Pertwee et al., 2005). A participação de receptores GPR55 está aparentemente descartada, pois até onde se sabe o WIN55,212-2 não se liga nestes receptores (Ryberg et al., 2007). Para a confirmação inequívoca do perfil farmacológico da LXA₄ na preparação de ducto deferente seria necessário testar a sensibilidade a ambos antagonistas SR141716A e AM251, ao qual agonistas CB₃ seriam insensíveis, e repetir os ensaios in vitro em tecido de animal *knock-out*. Por si só, o fato de que a LXA₄ inibe a ligação do antagonista CB₁ em dois sítios de interação é evidência suficiente para se suspeitar de pelo menos dois alvos moleculares distintos. Sem desconsiderar o que foi discutido anteriormente, pode-se pensar que um dos alvos seria o sítio ortostérico dos receptores CB₁, onde a LXA₄ se ligaria exercendo os efeitos CB₁ “diretos” (ex: 25% de inibição no órgão isolado) e o outro sítio, um sítio alostérico, “silencioso” no que tange à função principal deste receptor, mas capaz de influenciar a ligação de outros ligantes ao sítio principal. Esta é, até prova contrária, a explicação mais concreta possível para os efeitos centrais da LXA₄ observados no presente estudo, convergindo os resultados obtidos nos testes comportamentais e nos ensaios utilizando tecido nervoso central.

Identificado um mecanismo de ação plausível para os efeitos da LXA₄, nos dedicamos a investigar uma possível relevância fisiológica da LXA₄ para a transmissão endocanabinóide. Primeiramente, decidimos quantificar os níveis endógenos de LXA₄ nas três estruturas cerebrais onde já havíamos identificado a presença dos

endocanabinóides. A LXA₄ se mostrou presente no córtex, cerebelo e hipocampo, com maiores níveis nesta última estrutura. Curiosamente, os níveis endógenos de LXA₄ seguem o padrão dos níveis de AEA (maior presença no hipocampo), mas não os de 2-AG (maior presença no córtex), pelo menos entre as áreas analisadas. Confirmada a presença de LXA₄ nas mesmas áreas em que os endocanabinóides também estão presentes, decidimos testar a importância da LXA₄ para os efeitos da AEA *in vivo*. Desta vez realizamos uma abordagem inversa ao do experimento de potencialização realizado anteriormente, inibindo a enzima 5-LOX para inibir a síntese de LXA₄ e conseqüentemente reduzir seus níveis endógenos. Surpreendentemente, a inibição da 5-LOX exerceu um grande impacto na transmissão endocanabinóide, reduzindo o efeito de uma dose cataleptogênica de AEA praticamente pela metade. O experimento subseqüente comprovou que a presença de LXA₄ aplicada exogenamente é suficiente para re-estabelecer a potência da AEA, mesmo com os níveis endógenos reduzidos pela inibição da 5-LOX. Interessante notar que os efeitos da inibição da 5-LOX sobre o comportamento de roedores têm sido recentemente investigados. Camundongos *knock-out* para a enzima 5-LOX exibem distúrbios de emocionalidade, com redução de comportamento ansiogênico no teste do labirinto em cruz elevado (Uz et al., 2002) e redução de comportamento tipo depressivo no teste do nado forçado (Uz et al., 2008). Nossos dados sugerem que estes efeitos podem ser decorrentes da diminuição da potência de agonistas canabinóides nos receptores canabinóides CB₁. Além disso, já se sabe que o efeito anti-inflamatório do canabinóide sintético ácido ajulêmico envolve a ativação de receptores canabinóides CB₁ e a formação de LXA₄ *in vivo* (Zurier et al., 2009). Este estudo utilizou propositalmente o ácido ajulêmico pela sua ausência de efeitos centrais, enquanto que no presente estudo nós demonstramos que esta interação entre o sistema da LOX e endocanabinóides também acontece no SNC.

A imagem que se apresenta é a de que a LXA₄ endógena de fato possui uma função fisiologicamente relevante na transmissão endocanabinóide, podendo supostamente agir mesmo como um co-agonista da AEA nos receptores canabinóides CB₁. Poder-se-ia imaginar uma regulação interna do sistema endocanabinóide, com transmissores diferentes liberados em diferentes freqüências de estímulo neuronal, ou mesmo a liberação de um endocanabinóide isolado ou em combinação com outros dependendo do tipo celular do neurônio em questão. Embora estas hipóteses sejam atraentes, não possuímos dados concretos que nos

permitam refutá-las ou confirmá-las até o momento. No entanto, estas especulações são úteis como exercício na formulação de novas hipóteses e abordagens experimentais.

Por fim, investigamos se a 15-*epi*-LXA₄, gerada como efeito da aspirina, compartilha *in vivo* dos mesmos efeitos canabimiméticos observados para a LXA₄. Comprovando a expectativa, a administração de aspirina por via oral potencializa os efeitos da AEA injetada por via i.c.v. de forma dependente de dose e tempo de administração. Além disso, demonstramos que este efeito da aspirina é indireto, pois depende essencialmente de derivados da via das LOX. Pode-se criticar que este efeito é artificial, pois só ocorreu em uma dose consideravelmente alta de aspirina; no entanto, é importante que se considere que o teste comportamental utilizado (catalepsia) geralmente só pode ser induzido em altas doses, mesmo para os canabinóides clássicos como o Δ^9 -THC. De toda maneira, este experimento serve como identificação de um possível mecanismo de ação canabinóide indireto para a aspirina, que pode ser relevante em estados de desequilíbrio do organismo, como a inflamação, além de constituir uma interessante abordagem experimental para o estudo da relação entre as vias de COX, LOX e endocanabinóides. Recentemente foi identificado um mecanismo canabinóide indireto para o paracetamol, por exemplo (Dani et al., 2007; Umathe et al., 2009). O metabolismo da molécula do paracetamol com posterior conjugação com ácido araquidônico gera um derivado estrutural (AM404) que inibe a recaptação de endocanabinóides, aumentando os níveis endógenos destas moléculas (Hogestatt et al., 2005). O aumento dos níveis de endocanabinóides certamente contribui para o efeito analgésico do paracetamol (Dani et al., 2007; Mallet et al., 2008), além de ter inspirado a investigação de um surpreendente potencial terapêutico do paracetamol como ansiolítico (Umathe et al., 2009).

Como abordagem complementar, demonstramos que a 15-*epi*-LXA₄ co-administrada por via i.c.v. potencializa o efeito cataleptogênico da AEA de uma maneira independente de receptores ALX, mas sensível ao antagonista canabinóide CB₁ SR141716A. Estes experimentos confirmaram os resultados anteriormente observados para a LXA₄ de ocorrência natural e resultaram na publicação de um artigo em periódico científico internacional (em anexo).

O substrato teórico fundamental para estes experimentos foi que as enzimas COX participam do metabolismo dos endocanabinóides, sendo que inibidores da COX-2 potencializam o efeito de

endocanabinóides, sugerindo uma relação funcional entre estas vias eicosanóides (Slanina e Schweitzer, 2005). A mesma interação entre as enzimas COX e os endocanabinóides foi observada *in vivo*. O efeito analgésico do inibidor não seletivo de COX indometacina é bloqueado pelo antagonista canabinóide AM251 e ausente em camundongos CB₁^{-/-} (Guhring et al., 2002), além do mais, inibidores seletivos de COX-2 prejudicam a aquisição de memórias espaciais via ativação de receptores CB₁ (Teather et al., 2002; Rall et al., 2003), sugerindo a participação de endocanabinóides nestes efeitos. Além de inibir a COX não seletivamente, um efeito particular da aspirina é a acetilação da COX-2 com a conseqüente geração de mediadores lipídicos intermediários que são substratos da LOX. O final desta reação é a geração da 15-epi-LXA₄, como já explicado na introdução. Sabe-se que derivados da via das LOX participam dos efeitos anti-inflamatórios periféricos da aspirina, mas praticamente não se tem idéia de seus efeitos no SNC. Até o momento não há evidência experimental sugerindo a participação da via da LOX na potencialização dos efeitos de endocanabinóides pela aspirina. Esta possibilidade de que uma lipoxina gerada por ação da aspirina potencializaria os efeitos centrais de um endocanabinóide pareceu bastante desafiadora. Essa seria uma descoberta bastante promissora, incentivando a investigação da relação entre as vias de LOX e os endocanabinóides, além da sua já conhecida relação com a via das COX no SNC, com potencial terapêutico na neuroproteção (Chen e Bazan, 2005).

As diversas vias eicosanóides podem influenciar umas às outras, formando vias de sinalização interativas que regulam a fisiologia do sistema endocanabinóide. A descrição da lista completa de moléculas que influenciam a atividade dos receptores canabinóides será imprescindível na compreensão deste sistema como um todo (Placzek et al., 2008). Mesmo a presença de lipídeos que não se ligam diretamente a receptores canabinóides pode interferir na sua função. A influência da composição de membrana lipídica na produção de endocanabinóides tem sido documentada. Por exemplo, as cavéolas, microdomínios lipídicos ricos em colesterol, esfingolipídeos e ácido araquidônico organizados por proteínas estruturais conhecidas como caveolinas, alteram a ligação de endocanabinóides aos receptores CB₁ (Bari et al., 2005). O tratamento de células com metil-β-ciclodextrina, um agente que desorganiza as cavéolas, resulta em um aumento de afinidade do agonista CP55940 pelos receptores CB₁ e aumento da sinalização via AMPc e MAP quinase dependente de proteína G (Bari et al., 2005). A

composição das cavéolas também facilita a captação de AEA da região perisináptica (McFarland et al., 2004; McFarland et al., 2006) e há indícios que os produtos da degradação de endocanabinóides passam a integrar as cavéolas depois da hidrólise de AEA ou 2-AG, de maneira que as cavéolas funcionam como uma espécie de “tampão”, regulando os níveis extracelulares e atividade dos endocanabinóides (McFarland et al., 2006). Considerando as moléculas que atuam diretamente em receptores canabinóides e correlatos, o que se sabe até o momento é que a COX-2 catalisa a oxidação e a formação das prostamidas com atividade biológica a partir da AEA e do 2-AG, mas ainda sem receptores associados (Woodward et al., 2008). Já o metabolismo dos endocanabinóides pela via das LOX gera derivados estruturais que mantém atividade biológica considerável tanto nos próprios receptores CB₁, quanto em PPAR α e TRPV₁ (Edgemond et al., 1998; Craib et al., 2001; Kozak e Marnett, 2002). A AEA metabolizada pela 12-LOX mantém afinidade pelos receptores CB₁, enquanto o derivado resultante da metabolização pela 15-LOX não se liga a receptores CB, mas inibe a FAAH (Edgemond et al., 1998; Van Der Stelt et al., 2002). Outros derivados hidroxilados da AEA ainda não completamente identificados agem via receptores TRPV₁ (Craib et al., 2001). Além disso, os hidroperóxidos do ácido eicosatetraenóico derivados da vias das LOX, assim como o leucotrieno B₄ são potentes agonistas dos receptores vanilóides TRPV₁ (Hwang et al., 2000).

Outros mediadores lipídicos, apesar de demonstrarem baixa ou nenhuma afinidade pelos receptores canabinóides, ainda assim apresentam atividade canabimimética periférica e central. Por exemplo, a oleiletanolamida (OEA) e a palmitoiletanolamida (PEA), dois lipídeos de ocorrência natural de classe química similares à AEA induzem analgesia e aumento de consumo de alimento, apesar de não se ligarem aos receptores canabinóides (Lambert e Di Marzo, 1999; Lambert et al., 1999; Rodriguez De Fonseca et al., 2001). Esforços recentes têm tentado identificar novos receptores canabinóides que possam ser responsáveis por estes efeitos. Há evidências de que a OEA possa se ligar a um receptor órfão GPR119 e a PEA ao GPR55, dois receptores que vem sendo gradativamente considerados como candidatos a receptores canabinóides (Fu et al., 2005; Loverme et al., 2005; Mackie e Stella, 2006; Overton et al., 2006). Mais recentemente tem se dado atenção a uma classe relativamente nova de mediadores endógenos com atividade canabimimética, os lipoaminoácidos, cuja estrutura se assemelha a dos endocanabinóides. O lipoaminoácido mais parecido estruturalmente com

a AEA é a N-araquidonilglicina, que ocorre naturalmente no cérebro e outros tecidos (Huang et al., 2001), apesar da sua origem sintética não ser totalmente conhecida. Os estudos até o momento indicam que a N-araquidonilglicina provoca efeito que lembra o perfil farmacológico da AEA, mas é inativa no restante dos testes da tétrede de efeitos psicotrpicos típicos de canabinóides analgésicos (Huang et al., 2001). A N-araquidonilglicina não possui afinidade para os receptores canabinóides CB₁ (Sheskin et al., 1997), não altera a atividade do transportador de AEA (Huang et al., 2001), nem se liga a receptores vanilóides TRPV₁ (Huang et al., 2001), mas inibe a enzima de metabolização da AEA FAAH (Huang et al., 2001), elevando os níveis endógenos de AEA (Burstein et al., 2002). Supõe-se que a N-araquidonilglicina seja um possível agonista dos receptores órfãos GPR18 (Samuelson et al., 1996; Kohno et al., 2006). Outros lipoaminoácidos como a N-araquidonilserina também foram encontrados no cérebro e outros tecidos (Bradshaw e Walker, 2005).

Um estudo particularmente importante foi deixado para o final da discussão porque as informações sobre novos mecanismos de ação no sistema endocanabinóide, juntamente com os resultados desta tese, permitem reinterpretá-lo. Há cerca de 12 anos atrás um estudo de colaboração entre os laboratórios de Raphael Mechoulam e Vincenzo DiMarzo entre outros, descreveu um série de ésteres derivados do endocanabinóide 2-AG que não se ligam aos receptores canabinóides CB₁ / CB₂ nem inibem as enzimas de degradação de endocanabinóides, mas aumentam a eficácia do 2-AG em inibir a produção de AMPc via adenilato ciclase, potencializam seus efeitos canabimiméticos in vivo e aumentam afinidade do 2-AG para os receptores CB₁ (Ben-Shabat et al., 1998). À luz do conhecimento da época, os autores cunharam um termo novo para descrever o efeito destes ésteres de 2-AG e o chamaram de “efeito da companhia” (entourage), o que praticamente atesta que apesar do pioneirismo, eles não faziam a mínima idéia do mecanismo farmacológico envolvido no efeito que estavam observando. Um dos ésteres inibiu parcialmente a hidrólise do [³H]2-AG, mas somente numa concentração em que o próprio 2-AG “frio” também inibia, sugerindo que o éster é um substrato competitivo para a MAGL em altas concentrações (Ben-Shabat et al., 1998). Apesar de concordar com a idéia dos autores de que testando moléculas que co-existem na fenda sináptica aproximamos o teste de um ambiente mais próximo da realidade (Ben-Shabat et al., 1998), uma possível interpretação alternativa daqueles dados seria de que os autores se depararam com um

modulador alostérico endógeno para o endocanabinóide 2-AG. Um estudo recente, ainda publicado somente na forma de resumo de evento científico, identificou compostos sintéticos que potencializam a atividade da AEA em receptores CB₁ expressos heterologicamente em cultura de células. Estes compostos provocaram um modesto aumento de no máximo 5 vezes na afinidade e 2 vezes na eficácia da AEA (Ross, 2007). Nesta tese de doutorado, propomos que a LXA₄ seja um modulador alostérico endógeno positivo para o endocanabinóide AEA, provavelmente o primeiro descrito na literatura científica e mais potente do que os moduladores positivos sintéticos recentemente descritos.

Esta descoberta tem o potencial de causar impacto no campo de estudo dos endocanabinóides, pois aumenta ainda mais a complexidade deste sistema, sugerindo um ligante endógeno que participa seletivamente dos efeitos do endocanabinóide AEA nos receptores CB₁. A exemplo do que acontece em outros sistemas de neurotransmissão, estudos adicionais podem vir a caracterizar a LXA₄ como um verdadeiro co-agonista dos receptores CB₁, cuja presença é fisiologicamente importante para diversas funções endocanabinóides estudadas até o momento. O amplo potencial terapêutico indicado para a manipulação do sistema endocanabinóide (Pertwee, 2005) pode muito bem vir a ser compartilhado pela LXA₄, ainda mais considerando a existência de seus derivados estruturais metabolicamente estáveis, com maior biodisponibilidade comparado à molécula endógena. A geração da 15-epi-LXA₄ pela aspirina também pode vir a ser uma alternativa interessante do ponto de vista terapêutico. Existem diversas evidências que endocanabinóides participam em diversas situações fisiológicas e patológicas, nos quais estes sistemas parecem exercer uma função fundamentalmente protetora, sendo requerido em momentos para modular uma “superativação” de sistemas excitatórios no cérebro (Pertwee, 2005). Hipoteticamente, moduladores alostéricos da atividade endocanabinóide podem potencializar este sistema de autoproteção, sem nenhum efeito em áreas cerebrais onde os endocanabinóides não estejam ligados aos receptores CB₁, evitando efeitos adversos globais no SNC.

Os moduladores alostéricos prometem ser a nova geração de ferramentas terapêuticas endocanabinóides viáveis, a exemplo da grande esperança depositada nos inibidores seletivos da degradação de AEA e 2-AG. Se por um lado os inibidores da degradação podem agir aumentando os níveis de endocanabinóides onde eles estão abaixo dos níveis desejados, os moduladores alostéricos podem aumentar ou reduzir os efeitos endocanabinóides de maneira eficiente e localizada. A

potencialização alostérica do sistema endocanabinóide deve ser preferível em relação ao simples aumento dos níveis de endocanabinóides, pois a modulação alostérica implica em uma regulação da eficácia e afinidade destas moléculas somente em seus alvos “preferenciais”, evitando os efeitos que podem ocorrer pela ação de endocanabinóides em alvos secundários (como receptores TRPV₁) e o aumento de outras moléculas degradadas pelas mesmas enzimas metabólicas. Como mencionado anteriormente, uma das características da modulação alostérica nos receptores CB₁ é ser funcionalmente seletiva para ligantes. Apesar de sabermos que a AEA, o 2-AG e provavelmente os outros endocanabinóides possuem alta afinidade para os receptores CB₁, eles podem muito bem ter papéis fisiológicos e patológicos ainda não explorados, assim como serem liberados em tecidos diferentes, iniciando reações celulares típicas, dependendo do ambiente e composição sináptica. É particularmente estimulante pensar que a modulação alostérica possa proporcionar uma regulação fina deste sistema de múltiplos ligantes endógenos, afetando-os seletivamente, e respeitando a dinâmica da sinalização específica do tecido onde atuam. A pesquisa em moduladores alostéricos dos receptores canabinóides ainda se encontra em estágio verdadeiramente embrionário. Os efeitos destes moduladores no tráfego de receptores, expressão e taquifilaxia, tolerância e sensibilização ainda estão por serem estudados. Quando mais grupos de pesquisa despertarem para esta faceta da modulação farmacológica, o campo irá provavelmente se transformar na vanguarda da pesquisa científica em endocanabinóides, assim como na busca pelo próximo medicamento canabinóide terapeuticamente viável.

CONCLUSÕES

O lipídeo endógeno LXA₄ está presente no cérebro e provoca efeitos canabimiméticos centrais (hipolocomoção, hipotermia, catalepsia e analgesia), além de potencializar os efeitos do endocanabinóide AEA.

Estes efeitos centrais da LXA₄ dependem da ativação de receptores canabinóides CB₁, mas não da ativação de receptores ALX para lipoxinas.

A extensa investigação de um possível mecanismo farmacológico sugere que a LXA₄ é um modulador alostérico positivo dos receptores canabinóides CB₁, aumentando a afinidade destes para o endocanabinóide AEA.

A LXA₄ contribui para os efeitos *in vivo* da AEA, com possível relevância para as funções fisiológicas do sistema endocanabinóide.

O análogo estrutural 15-epi-LXA₄, gerado artificialmente como consequência da acetilação da COX-2 pela aspirina, também exerce efeitos canabimiméticos ao potencializar os efeitos da AEA de maneira dependente dos receptores CB₁.

Este estudo é o primeiro a descrever uma substância endógena que modula alostericamente os receptores canabinóides CB₁, possivelmente constituindo parte do sistema endocanabinóide cerebral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aboud, M. E., Ditto, K. E., Noel, M. A., Showalter, V. M. e Tao, Q. Isolation and expression of a mouse CB1 cannabinoid receptor gene. Comparison of binding properties with those of native CB1 receptors in mouse brain and N18TG2 neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol*, v.53, n.2, Jan 24, p.207-14. 1997.

Abumrad, N., Coburn, C. e Ibrahimi, A. Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim Biophys Acta*, v.1441, n.1, Oct 18, p.4-13. 1999.

Alexander, S. P. e Kendall, D. A. The complications of promiscuity: endocannabinoid action and metabolism. *Br J Pharmacol*, v.152, n.5, Nov, p.602-23. 2007.

Alger, B. E. Endocannabinoids and their implications for epilepsy. *Epilepsy Curr*, v.4, n.5, Sep-Oct, p.169-73. 2004.

Bari, M., Battista, N., Fezza, F., Finazzi-Agro, A. e Maccarrone, M. Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells. Implications for anandamide-induced apoptosis. *J Biol Chem*, v.280, n.13, Apr 1, p.12212-20. 2005.

Barnard, E. A., Simon, J. e Webb, T. E. Nucleotide receptors in the nervous system. An abundant component using diverse transduction mechanisms. *Mol Neurobiol*, v.15, n.2, Oct, p.103-29. 1997.

Begg, M., Pacher, P., Batkai, S., Osei-Hyiaman, D., Offertaler, L., Mo, F. M., Liu, J. e Kunos, G. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther*, v.106, n.2, May, p.133-45. 2005.

Beltramo, M. e Piomelli, D. Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol. *Neuroreport*, v.11, n.6, Apr 27, p.1231-5. 2000.

Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S. Y., Makriyannis, A. e Piomelli, D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, v.277, n.5329, Aug 22, p.1094-7. 1997.

Ben-Shabat, S., Fride, E., Sheskin, T., Tamiri, T., Rhee, M. H., Vogel, Z., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Di Marzo, V. e Mechoulam, R. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol*, v.353, n.1, Jul 17, p.23-31. 1998.

Berger, C., Schmid, P. C., Schabitz, W. R., Wolf, M., Schwab, S. e Schmid, H. H. Massive accumulation of N-acylethanolamines after stroke. Cell signalling in acute cerebral ischemia? *J Neurochem*, v.88, n.5, Mar, p.1159-67. 2004.

Bisogno, T., Cascio, M. G., Saha, B., Mahadevan, A., Urbani, P., Minassi, A., Appendino, G., Saturnino, C., Martin, B., Razdan, R. e Di Marzo, V. Development of the first potent and specific inhibitors of endocannabinoid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, v.1761, n.2, Feb, p.205-12. 2006.

Bisogno, T., Ligresti, A. e Di Marzo, V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav*, v.81, n.2, Jun, p.224-38. 2005.

Bisogno, T., Maccarrone, M., De Petrocellis, L., Jarrahian, A., Finazzi-Agro, A., Hillard, C. e Di Marzo, V. The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem*, v.268, n.7, Apr, p.1982-9. 2001.

Boarder, M. R. e Hourani, S. M. The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors. *Trends Pharmacol Sci*, v.19, n.3, Mar, p.99-107. 1998.

Bodor, A. L., Katona, I., Nyiri, G., Mackie, K., Ledent, C., Hajos, N. e Freund, T. F. Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types. *J Neurosci*, v.25, n.29, Jul 20, p.6845-56. 2005.

Bornheim, L. M., Kim, K. Y., Chen, B. e Correia, M. A. The effect of cannabidiol on mouse hepatic microsomal cytochrome P450-dependent anandamide metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*, v.197, n.2, Dec 15, p.740-6. 1993.

Bornheim, L. M., Kim, K. Y., Chen, B. e Correia, M. A. Microsomal cytochrome P450-mediated liver and brain anandamide metabolism. *Biochem Pharmacol*, v.50, n.5, Aug 25, p.677-86. 1995.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Bradshaw, H. B. e Walker, J. M. The expanding field of cannabimimetic and related lipid mediators. *Br J Pharmacol*, v.144, n.4, Feb, p.459-65. 2005.

Breivogel, C. S., Sim, L. J. e Childers, S. R. Regional differences in cannabinoid receptor/G-protein coupling in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, v.282, n.3, Sep, p.1632-42. 1997.

Brink, C., Dahlen, S. E., Drazen, J., Evans, J. F., Hay, D. W., Nicosia, S., Serhan, C. N., Shimizu, T. e Yokomizo, T. International Union of Pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacol Rev*, v.55, n.1, Mar, p.195-227. 2003.

Brown, A. J. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*, v.152, n.5, Nov, p.567-75. 2007.

Brown, D. A. e London, E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, v.275, n.23, Jun 9, p.17221-4. 2000.

Buckley, N. E., Hansson, S., Harta, G. e Mezey, E. Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience*, v.82, n.4, Feb, p.1131-49. 1998.

Burgen, A. S. Conformational changes and drug action. *Fed Proc*, v.40, n.13, Nov, p.2723-8. 1981.

Burstein, S. H., Huang, S. M., Petros, T. J., Rossetti, R. G., Walker, J. M. e Zurier, R. B. Regulation of anandamide tissue levels by N-arachidonylglycine. *Biochem Pharmacol*, v.64, n.7, Oct 1, p.1147-50. 2002.

Burstein, S. H., Rossetti, R. G., Yagen, B. e Zurier, R. B. Oxidative metabolism of anandamide. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, v.61, n.1-2, Apr, p.29-41. 2000.

Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L. e Piomelli, D. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci*, v.16, n.12, Jun 15, p.3934-42. 1996.

Capdevila, J. H. e Falck, J. R. The CYP P450 arachidonic acid monooxygenases: from cell signaling to blood pressure regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, v.285, n.3, Jul 20, p.571-6. 2001.

Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., Muller, C., Woods, A. S., Hope, B. T., Ciruela, F., Casado, V., Canela, E. I., Lluís, C., Goldberg, S. R., Moratalla, R., Franco, R. e Ferre, S. Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology*, v.32, n.11, Nov, p.2249-59. 2007.

Chen, C. e Bazan, N. G. Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, v.77, n.1-4, Sep, p.65-76. 2005.

Chevalyere, V., Takahashi, K. A. e Castillo, P. E. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*, v.29, p.37-76. 2006.

Chiang, N., Takano, T., Arita, M., Watanabe, S. e Serhan, C. N. A novel rat lipoxin A4 receptor that is conserved in structure and function. *Br J Pharmacol*, v.139, n.1, May, p.89-98. 2003.

Christopoulos, A., Coles, P., Lay, L., Lew, M. J. e Angus, J. A. Pharmacological analysis of cannabinoid receptor activity in the rat vas deferens. *Br J Pharmacol*, v.132, n.6, Mar, p.1281-91. 2001.

Christopoulos, A. e Kenakin, T. G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev*, v.54, n.2, Jun, p.323-74. 2002.

Christopoulos, A., Lanzafame, A. e Mitchelson, F. Allosteric interactions at muscarinic cholinceptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v.25, n.3-4, Mar-Apr, p.185-94. 1998.

Claria, J. e Serhan, C. N. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.92, n.21, Oct 10, p.9475-9. 1995.

Craib, S. J., Ellington, H. C., Pertwee, R. G. e Ross, R. A. A possible role of lipoxygenase in the activation of vanilloid receptors by anandamide in the guinea-pig bronchus. *Br J Pharmacol*, v.134, n.1, Sep, p.30-7. 2001.

Cravatt, B. F., Demarest, K., Patricelli, M. P., Bracey, M. H., Giang, D. K., Martin, B. R. e Lichtman, A. H. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.98, n.16, Jul 31, p.9371-6. 2001.

Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A. e Gilula, N. B. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, v.384, n.6604, Nov 7, p.83-7. 1996.

Cristino, L., De Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V. e Di Marzo, V. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, v.139, n.4, p.1405-15. 2006.

Cristino, L., Starowicz, K., De Petrocellis, L., Morishita, J., Ueda, N., Guglielmotti, V. e Di Marzo, V. Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. *Neuroscience*, v.151, n.4, Feb 19, p.955-68. 2008.

Da Silva, G. E. e Takahashi, R. N. SR 141716A prevents delta 9-tetrahydrocannabinol-induced spatial learning deficit in a Morris-type water maze in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.26, n.2, Feb, p.321-5. 2002.

Dani, M., Guindon, J., Lambert, C. e Beaulieu, P. The local antinociceptive effects of paracetamol in neuropathic pain are mediated by cannabinoid receptors. *Eur J Pharmacol*, v.573, n.1-3, Nov 14, p.214-5. 2007.

De Oliveira Alvares, L., Genro, B. P., Vaz Breda, R., Pedroso, M. F., Da Costa, J. C. e Quillfeldt, J. A. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res*, v.1075, n.1, Feb 23, p.60-7. 2006.

De Petrocellis, L., Orlando, P. e Di Marzo, V. Anandamide, an endogenous cannabinomimetic substance, modulates rat brain protein kinase C in vitro. *Biochem Mol Biol Int*, v.36, n.6, Aug, p.1127-33. 1995.

Devane, W. A., Dysarz, F. A., 3rd, Johnson, M. R., Melvin, L. S. e Howlett, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*, v.34, n.5, Nov, p.605-13. 1988.

Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. e Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, v.258, n.5090, Dec 18, p.1946-9. 1992.

Di Marzo, V. Biosynthesis and inactivation of endocannabinoids: relevance to their proposed role as neuromodulators. *Life Sci*, v.65, n.6-7, p.645-55. 1999.

Di Marzo, V. A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends Pharmacol Sci*, v.27, n.3, Mar, p.134-40. 2006.

Di Marzo, V., Breivogel, C. S., Tao, Q., Bridgen, D. T., Razdan, R. K., Zimmer, A. M., Zimmer, A. e Martin, B. R. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem*, v.75, n.6, Dec, p.2434-44. 2000.

Di Marzo, V. e Deutsch, D. G. Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis*, v.5, n.6 Pt B, Dec, p.386-404. 1998.

Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C. e Piomelli, D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, v.372, n.6507, Dec 15, p.686-91. 1994.

Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, I., Sensi, S. L., Kathuria, S. e Piomelli, D. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, n.16, Aug 6, p.10819-24. 2002.

Domenici, M. R., Azad, S. C., Marsicano, G., Schierloh, A., Wotjak, C. T., Dodt, H. U., Zieglansberger, W., Lutz, B. e Rammes, G. Cannabinoid receptor type 1 located on presynaptic terminals of principal neurons in the forebrain controls glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci*, v.26, n.21, May 24, p.5794-9. 2006.

Edgemond, W. S., Hillard, C. J., Falck, J. R., Kearn, C. S. e Campbell, W. B. Human platelets and polymorphonuclear leukocytes synthesize oxygenated derivatives of arachidonylethanolamide (anandamide): their affinities for cannabinoid receptors and pathways of inactivation. *Mol Pharmacol*, v.54, n.1, Jul, p.180-8. 1998.

Ellis, J., Padiani, J. D., Canals, M., Milasta, S. e Milligan, G. Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *J Biol Chem*, v.281, n.50, Dec 15, p.38812-24. 2006.

Fankhauser, M. History of Cannabis in Western Medicine. In: Grotenhermen, F. e Russo, E. B. (Ed.). Cannabis and Cannabinoids. New York: The Haworth Integrative Healing Press, 2002. *History of Cannabis in Western Medicine*, p.37-51

Farooqui, A. A., Rammohan, K. W. e Horrocks, L. A. Isolation, characterization, and regulation of diacylglycerol lipases from the bovine brain. *Ann N Y Acad Sci*, v.559, p.25-36. 1989.

Fiore, S., Maddox, J. F., Perez, H. D. e Serhan, C. N. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. *J Exp Med*, v.180, n.1, Jul 1, p.253-60. 1994.

Fride, E. Endocannabinoids in the central nervous system--an overview. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v.66, n.2-3, Feb-Mar, p.221-33. 2002.

Fride, E., Perchuk, A., Hall, F. S., Uhl, G. R. e Onaivi, E. S. Behavioral methods in cannabinoid research. *Methods Mol Med*, v.123, p.269-90. 2006.

Fu, J., Oveisi, F., Gaetani, S., Lin, E. e Piomelli, D. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR-alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology*, v.48, n.8, Jun, p.1147-53. 2005.

Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G. e Casellas, P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*, v.232, n.1, Aug 15, p.54-61. 1995.

Galzi, J. L. e Changeux, J. P. Neurotransmitter-gated ion channels as unconventional allosteric proteins. *Curr Opin Struct Biol*, v.4, p.554-565. 1994.

Galzi, J. L., Revah, F., Bessis, A. e Changeux, J. P. Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: from electric organ to brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v.31, p.37-72. 1991.

Gaoni, Y. e Mechoulam, R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.*, v.86, p.1646. 1964.

Gewirtz, A. T., Collier-Hyams, L. S., Young, A. N., Kucharzik, T., Guilford, W. J., Parkinson, J. F., Williams, I. R., Neish, A. S. e Madara, J. L. Lipoxin a4 analogs attenuate induction of intestinal epithelial proinflammatory gene expression and reduce the severity of dextran

sodium sulfate-induced colitis. *J Immunol*, v.168, n.10, May 15, p.5260-7. 2002.

Gewirtz, A. T., McCormick, B., Neish, A. S., Petasis, N. A., Gronert, K., Serhan, C. N. e Madara, J. L. Pathogen-induced chemokine secretion from model intestinal epithelium is inhibited by lipoxin A4 analogs. *J Clin Invest*, v.101, n.9, May 1, p.1860-9. 1998.

Giuffrida, A., Parsons, L. H., Kerr, T. M., Rodriguez De Fonseca, F., Navarro, M. e Piomelli, D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci*, v.2, n.4, Apr, p.358-63. 1999.

Glass, M. e Felder, C. C. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci*, v.17, n.14, Jul 15, p.5327-33. 1997.

Glass, M. e Northup, J. K. Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol Pharmacol*, v.56, n.6, Dec, p.1362-9. 1999.

Godson, C. e Brady, H. R. Lipoxins: novel anti-inflammatory therapeutics? *Curr Opin Investig Drugs*, v.1, n.3, Nov, p.380-5. 2000.

Gonsiorek, W., Lunn, C., Fan, X., Narula, S., Lundell, D. e Hipkin, R. W. Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol*, v.57, n.5, May, p.1045-50. 2000.

Grandordy, B. M., Lacroix, H., Mavoungou, E., Krilis, S., Crea, A. E., Spur, B. W. e Lee, T. H. Lipoxin A4 inhibits phosphoinositide hydrolysis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, v.167, n.3, Mar 30, p.1022-9. 1990.

Gronert, K., Gewirtz, A., Madara, J. L. e Serhan, C. N. Identification of a human enterocyte lipoxin A4 receptor that is regulated by interleukin (IL)-13 and interferon gamma and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced IL-8 release. *J Exp Med*, v.187, n.8, Apr 20, p.1285-94. 1998.

Guhring, H., Hamza, M., Sergejeva, M., Ates, M., Kotalla, C. E., Ledent, C. e Brune, K. A role for endocannabinoids in indomethacin-induced spinal antinociception. *Eur J Pharmacol*, v.454, n.2-3, Nov 15, p.153-63. 2002.

Hachicha, M., Pouliot, M., Petasis, N. A. e Serhan, C. N. Lipoxin (LX)A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor 1alpha-initiated neutrophil responses and trafficking: regulators of a cytokine-chemokine axis. *J Exp Med*, v.189, n.12, Jun 21, p.1923-30. 1999.

Hajos, N., Katona, I., Naiem, S. S., Mackie, K., Ledent, C., Mody, I. e Freund, T. F. Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci*, v.12, n.9, Sep, p.3239-49. 2000.

Haley, T. J. e McCormick, W. G. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Br J Pharmacol Chemother*, v.12, n.1, Mar, p.12-5. 1957.

Hanus, L., Abu-Lafi, S., Frider, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D. E., Kustanovich, I. e Mechoulam, R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.98, n.7, Mar 27, p.3662-5. 2001.

Hebert, T. E. e Bouvier, M. Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization. *Biochem Cell Biol*, v.76, n.1, p.1-11. 1998.

Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., De Costa, B. R. e Rice, K. C. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.87, n.5, Mar, p.1932-6. 1990.

Hilairt, S., Bouaboula, M., Carriere, D., Le Fur, G. e Casellas, P. Hypersensitization of the Orexin 1 receptor by the CB1 receptor: evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist, SR141716. *J Biol Chem*, v.278, n.26, Jun 27, p.23731-7. 2003.

Hill, A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol*, v.40, p.4-7. 1910.

Hillard, C. J., Edgemond, W. S., Jarrahan, A. e Campbell, W. B. Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem*, v.69, n.2, Aug, p.631-8. 1997.

Hillard, C. J., Manna, S., Greenberg, M. J., Dicamelli, R., Ross, R. A., Stevenson, L. A., Murphy, V., Pertwee, R. G. e Campbell, W. B. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J Pharmacol Exp Ther*, v.289, n.3, Jun, p.1427-33. 1999.

Hirsch, D., Stahl, A. e Lodish, H. F. A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.95, n.15, Jul 21, p.8625-9. 1998.

Hirst, R. A., Almond, S. L. e Lambert, D. G. Characterisation of the rat cerebella CB1 receptor using SR141716A, a central cannabinoid receptor antagonist. *Neurosci Lett*, v.220, n.2, Dec 13, p.101-4. 1996.

Hogestatt, E. D., Jonsson, B. A., Ermund, A., Andersson, D. A., Bjork, H., Alexander, J. P., Cravatt, B. F., Basbaum, A. I. e Zygmunt, P. M. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J Biol Chem*, v.280, n.36, Sep 9, p.31405-12. 2005.

Holzgrabe, U., Wagener, M. e Gasteiger, J. Comparison of structurally different allosteric modulators of muscarinic receptors by self-organizing neural networks. *J Mol Graph*, v.14, n.4, Aug, p.185-93, 217-21. 1996.

Horswill, J. G., Bali, U., Shaaban, S., Keily, J. F., Jeevaratnam, P., Babbs, A. J., Reynet, C. e Wong Kai in, P. PSNCBAM-1, a novel allosteric antagonist at cannabinoid CB1 receptors with hypophagic effects in rats. *Br J Pharmacol*, v.152, n.5, Nov, p.805-14. 2007.

Howlett, A. C. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase: relative activity of constituents and metabolites of marihuana. *Neuropharmacology*, v.26, n.5, May, p.507-12. 1987.

Howlett, A. C. Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol*, n.168, p.53-79. 2005.

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. e Pertwee, R. G. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, v.54, n.2, Jun, p.161-202. 2002.

Howlett, A. C., Breivogel, C. S., Childers, S. R., Deadwyler, S. A., Hampson, R. E. e Porrino, L. J. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*, v.47 Suppl 1, p.345-58. 2004.

Huang, K. P., Nakabayashi, H. e Huang, F. L. Isozymic forms of rat brain Ca²⁺-activated and phospholipid-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.83, n.22, Nov, p.8535-9. 1986.

Huang, S. M., Bisogno, T., Petros, T. J., Chang, S. Y., Zavitsanos, P. A., Zipkin, R. E., Sivakumar, R., Coop, A., Maeda, D. Y., De Petrocellis, L., Burstein, S., Di Marzo, V. e Walker, J. M. Identification of a new class of molecules, the arachidonyl amino acids, and characterization of one member that inhibits pain. *J Biol Chem*, v.276, n.46, Nov 16, p.42639-44. 2001.

Hudson, B. D., Hebert, T. E. e Kelly, M. E. Ligand- and heterodimer-directed signaling of the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol*, v.77, n.1, Jan, p.1-9. 2009.

Hwang, S. W., Cho, H., Kwak, J., Lee, S. Y., Kang, C. J., Jung, J., Cho, S., Min, K. H., Suh, Y. G., Kim, D. e Oh, U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.97, n.11, May 23, p.6155-60. 2000.

International-Association-for-Cannabis-Based-Medicine. *IACM Bulletin*. 2010.

Jakubik, J., Bacakova, L., El-Fakahany, E. E. e Tucek, S. Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, v.52, n.1, Jul, p.172-9. 1997.

Jarrahan, A., Watts, V. J. e Barker, E. L. D2 dopamine receptors modulate Galpha-subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, v.308, n.3, Mar, p.880-6. 2004.

Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M. e Watanabe, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*, v.89, n.1, Jan, p.309-80. 2009.

Katona, I., Sperlagh, B., Sik, A., Kafalvi, A., Vizi, E. S., Mackie, K. e Freund, T. F. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci*, v.19, n.11, Jun 1, p.4544-58. 1999.

Kawamura, Y., Fukaya, M., Maejima, T., Yoshida, T., Miura, E., Watanabe, M., Ohno-Shosaku, T. e Kano, M. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci*, v.26, n.11, Mar 15, p.2991-3001. 2006.

Kearn, C. S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K. e Glass, M. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol*, v.67, n.5, May, p.1697-704. 2005.

Kenakin, T. Agonist-receptor efficacy. I: Mechanisms of efficacy and receptor promiscuity. *Trends Pharmacol Sci*, v.16, n.6, Jun, p.188-92. 1995.

Kenakin, T. Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol*, v.72, n.6, Dec, p.1393-401. 2007.

Kenakin, T. P. 7TM receptor allostery: putting numbers to shapeshifting proteins. *Trends Pharmacol Sci*, v.30, n.9, Sep, p.460-9. 2009.

Kew, J. N., Trube, G. e Kemp, J. A. A novel mechanism of activity-dependent NMDA receptor antagonism describes the effect of ifenprodil in rat cultured cortical neurones. *J Physiol*, v.497 (Pt 3), Dec 15, p.761-72. 1996.

Kim, J., Isokawa, M., Ledent, C. e Alger, B. E. Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J Neurosci*, v.22, n.23, Dec 1, p.10182-91. 2002.

Kim, S. J. Formation of lipoxins by alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, v.150, n.2, Jan 29, p.870-6. 1988.

Kohno, M., Hasegawa, H., Inoue, A., Muraoka, M., Miyazaki, T., Oka, K. e Yasukawa, M. Identification of N-arachidonylglycine as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptor GPR18. *Biochem Biophys Res Commun*, v.347, n.3, Sep 1, p.827-32. 2006.

Kozak, K. R. e Marnett, L. J. Oxidative metabolism of endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v.66, n.2-3, Feb-Mar, p.211-20. 2002.

Kozak, K. R., Prusakiewicz, J. J., Rowlinson, S. W., Schneider, C. e Marnett, L. J. Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol. *J Biol Chem*, v.276, n.32, Aug 10, p.30072-7. 2001.

Kozak, K. R., Rowlinson, S. W. e Marnett, L. J. Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, v.275, n.43, Oct 27, p.33744-9. 2000.

Lambert, D. M. e Di Marzo, V. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas : are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr Med Chem*, v.6, n.8, Aug, p.757-73. 1999.

Lambert, D. M., Dipaolo, F. G., Sonveaux, P., Kanyonyo, M., Govaerts, S. J., Hermans, E., Bueb, J., Delzenne, N. M. e Tschirhart, E. J. Analogues and homologues of N-palmitoylethanolamide, a putative endogenous CB(2) cannabinoid, as potential ligands for the cannabinoid receptors. *Biochim Biophys Acta*, v.1440, n.2-3, Sep 22, p.266-74. 1999.

Laursen, S. E. e Belknap, J. K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J Pharmacol Methods*, v.16, n.4, Dec, p.355-7. 1986.

Lee, T. H., Horton, C. E., Kyan-Aung, U., Haskard, D., Crea, A. E. e Spur, B. W. Lipoxin A4 and lipoxin B4 inhibit chemotactic responses of human neutrophils stimulated by leukotriene B4 and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine. *Clin Sci (Lond)*, v.77, n.2, Aug, p.195-203. 1989.

Leff, P. The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci*, v.16, n.3, Mar, p.89-97. 1995.

Leggett, J. D., Aspley, S., Beckett, S. R., D'antona, A. M. e Kendall, D. A. Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*, v.141, n.2, Jan, p.253-62. 2004.

Leterrier, C., Laine, J., Darmon, M., Boudin, H., Rossier, J. e Lenkei, Z. Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors. *J Neurosci*, v.26, n.12, Mar 22, p.3141-53. 2006.

Li, H. L. An archaeological and historical account of cannabis in China. *Economic Botany*, v.28, n.4, p.437-448. 1973.

Li, H. L. Hallucinogenic plants in Chinese herbals. *J Psychodelic Drugs*, v.10, n.1, p.17-26. 1978.

Loverme, J., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A. e Piomelli, D. The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci*, v.77, n.14, Aug 19, p.1685-98. 2005.

Lustig, K. D., Shiau, A. K., Brake, A. J. e Julius, D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.90, n.11, Jun 1, p.5113-7. 1993.

Maccarrone, M., Rossi, S., Bari, M., De Chiara, V., Fezza, F., Musella, A., Gasperi, V., Prosperetti, C., Bernardi, G., Finazzi-Agro, A., Cravatt, B. F. e Centonze, D. Anandamide inhibits metabolism and physiological

actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nat Neurosci*, v.11, n.2, Feb, p.152-9. 2008.

Mackie, K. Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization. *Life Sci*, v.77, n.14, Aug 19, p.1667-73. 2005.

Mackie, K. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J Neuroendocrinol*, v.20 Suppl 1, May, p.10-4. 2008.

Mackie, K. e Stella, N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J*, v.8, n.2, p.E298-306. 2006.

Mallet, C., Daulhac, L., Bonnefont, J., Ledent, C., Etienne, M., Chapuy, E., Libert, F. e Eschalier, A. Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain*, v.139, n.1, Sep 30, p.190-200. 2008.

Marsicano, G. e Lutz, B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci*, v.11, n.12, Dec, p.4213-25. 1999.

Marsicano, G., Wotjak, C. T., Azad, S. C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M. G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgansberger, W., Di Marzo, V. e Lutz, B. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, v.418, n.6897, Aug 1, p.530-4. 2002.

Martin, B. R. Characterization of the antinociceptive activity of delta-9 tetrahydrocannabinol in mice. In: Harvey, D. J. (Ed.). *Marihuana*. Oxford: IRL Press, 1985. Characterization of the antinociceptive activity of delta-9 tetrahydrocannabinol in mice, p.685-692

Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. e Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, v.346, n.6284, Aug 9, p.561-4. 1990.

McFarland, M. J. e Barker, E. L. Anandamide transport. *Pharmacol Ther*, v.104, n.2, Nov, p.117-35. 2004.

McFarland, M. J., Porter, A. C., Rakhshan, F. R., Rawat, D. S., Gibbs, R. A. e Barker, E. L. A role for caveolae/lipid rafts in the uptake and recycling of the endogenous cannabinoid anandamide. *J Biol Chem*, v.279, n.40, Oct 1, p.41991-7. 2004.

McFarland, M. J., Terebova, E. A. e Barker, E. L. Detergent-resistant membrane microdomains in the disposition of the lipid signaling molecule anandamide. *AAPS J*, v.8, n.1, p.E95-100. 2006.

McGaugh, J. L. Memory--a century of consolidation. *Science*, v.287, n.5451, Jan 14, p.248-51. 2000.

McMahon, B., Mitchell, S., Brady, H. R. e Godson, C. Lipoxins: revelations on resolution. *Trends Pharmacol Sci*, v.22, n.8, Aug, p.391-5. 2001.

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D. R. e Et Al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, v.50, n.1, Jun 29, p.83-90. 1995.

Mechoulam, R. e Hanus, L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids*, v.108, n.1-2, Nov, p.1-13. 2000.

Menezes-De-Lima, O., Jr., Kassuya, C. A., Nascimento, A. F., Henriques, M. G. e Calixto, J. B. Lipoxin A4 inhibits acute edema in mice: implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, v.80, n.3-4, Sep, p.123-35. 2006.

Milligan, G. e Smith, N. J. Allosteric modulation of heterodimeric G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, v.28, n.12, Dec, p.615-20. 2007.

Monod, J., Changeux, J. P. e Jacob, F. Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol*, v.6, Apr, p.306-29. 1963.

Monod, J. e Jacob, F. General conclusions: teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth and differentiation. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, v.26, p.389-401. 1961.

Monod, J., Wyman, J. e Changeux, J. P. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol*, v.12, May, p.88-118. 1965.

Monory, K., Massa, F., Egertova, M., Eder, M., Blaudzun, H., Westenbroek, R., Kelsch, W., Jacob, W., Marsch, R., Ekker, M., Long, J., Rubenstein, J. L., Goebbels, S., Nave, K. A., Doring, M., Klugmann, M., Wolfel, B., Dodt, H. U., Zieglgansberger, W., Wotjak, C. T., Mackie, K., Elphick, M. R., Marsicano, G. e Lutz, B. The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*, v.51, n.4, Aug 17, p.455-66. 2006.

Munger, K. A., Montero, A., Fukunaga, M., Uda, S., Yura, T., Imai, E., Kaneda, Y., Valdivielso, J. M. e Badr, K. F. Transfection of rat kidney with human 15-lipoxygenase suppresses inflammation and preserves function in experimental glomerulonephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.96, n.23, Nov 9, p.13375-80. 1999.

Munro, S., Thomas, K. L. e Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, v.365, n.6441, Sep 2, p.61-5. 1993.

Murillo-Rodriguez, E., Sanchez-Alavez, M., Navarro, L., Martinez-Gonzalez, D., Drucker-Colin, R. e Prospero-Garcia, O. Anandamide modulates sleep and memory in rats. *Brain Res*, v.812, n.1-2, Nov 23, p.270-4. 1998.

Nigam, S., Fiore, S., Lusinskas, F. W. e Serhan, C. N. Lipoxin A4 and lipoxin B4 stimulate the release but not the oxygenation of arachidonic acid in human neutrophils: dissociation between lipid remodeling and adhesion. *J Cell Physiol*, v.143, n.3, Jun, p.512-23. 1990.

Nyiri, G., Cserep, C., Szabadits, E., Mackie, K. e Freund, T. F. CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience*, v.136, n.3, p.811-22. 2005.

O'Sullivan, S. E. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol*, v.152, n.5, Nov, p.576-82. 2007.

O'Sullivan, S. E., Kendall, D. A. e Randall, M. D. Characterisation of the vasorelaxant properties of the novel endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine (NADA). *Br J Pharmacol*, v.141, n.5, Mar, p.803-12. 2004.

Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Fukudome, Y., Shosaku, J., Tsubokawa, H., Taketo, M. M., Manabe, T. e Kano, M. Postsynaptic M1 and M3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signalling in the hippocampus. *Eur J Neurosci*, v.18, n.1, Jul, p.109-16. 2003.

Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gong, J. P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P. A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., Brusco, A., Akinshola, B. E., Liu, Q. R., Hope, B., Iwasaki, S., Arinami, T., Teasenfitz, L. e Uhl, G. R. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci*, v.1074, Aug, p.514-36. 2006.

Organização-Das-Nações-Unidas. Convenção de Substâncias Psicotrópicas. 1971.

Overton, H. A., Babbs, A. J., Doel, S. M., Fyfe, M. C., Gardner, L. S., Griffin, G., Jackson, H. C., Procter, M. J., Rasamison, C. M., Tang-Christensen, M., Widdowson, P. S., Williams, G. M. e Reynet, C. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab*, v.3, n.3, Mar, p.167-75. 2006.

Pacher, P., Batkai, S. e Kunos, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*, v.58, n.3, Sep, p.389-462. 2006.

Pamplona, F. A., Menezes-De-Lima, O., Jr. e Takahashi, R. N. Aspirin-triggered lipoxin induces CB1-dependent catalepsy in mice. *Neurosci Lett*, v.470, n.1, Feb 5, p.33-7.

Pamplona, F. A. e Takahashi, R. N. WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neurosci Lett*, v.397, n.1-2, Apr 10-17, p.88-92. 2006.

Paxinos, G. e Franklin, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press. 2001

Perretti, M., Chiang, N., La, M., Fierro, I. M., Marullo, S., Getting, S. J., Solito, E. e Serhan, C. N. Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. *Nat Med*, v.8, n.11, Nov, p.1296-302. 2002.

Pertwee, R. G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*, v.74, n.2, p.129-80. 1997.

Pertwee, R. G. The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *AAPS J*, v.7, n.3, p.E625-54. 2005.

Pertwee, R. G., Griffin, G., Lainton, J. A. e Huffman, J. W. Pharmacological characterization of three novel cannabinoid receptor agonists in the mouse isolated vas deferens. *Eur J Pharmacol*, v.284, n.3, Sep 25, p.241-7. 1995.

Pertwee, R. G., Thomas, A., Stevenson, L. A., Maor, Y. e Mechoulam, R. Evidence that (-)-7-hydroxy-4'-dimethylheptyl-cannabidiol activates a non-CB(1), non-CB(2), non-TRPV1 target in the mouse vas deferens. *Neuropharmacology*, v.48, n.8, Jun, p.1139-46. 2005.

Pike, L. J., Han, X., Chung, K. N. e Gross, R. W. Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry*, v.41, n.6, Feb 12, p.2075-88. 2002.

Pinto, J. C., Potie, F., Rice, K. C., Boring, D., Johnson, M. R., Evans, D. M., Wilken, G. H., Cantrell, C. H. e Howlett, A. C. Cannabinoid receptor binding and agonist activity of amides and esters of arachidonic acid. *Mol Pharmacol*, v.46, n.3, Sep, p.516-22. 1994.

Piomelli, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*, v.4, n.11, Nov, p.873-84. 2003.

Placzek, E. A., Okamoto, Y., Ueda, N. e Barker, E. L. Membrane microdomains and metabolic pathways that define anandamide and 2-arachidonyl glycerol biosynthesis and breakdown. *Neuropharmacology*, v.55, n.7, Dec, p.1095-104. 2008.

Porter, A. C., Sauer, J. M., Knierman, M. D., Becker, G. W., Berna, M. J., Bao, J., Nomikos, G. G., Carter, P., Bymaster, F. P., Leese, A. B. e Felder, C. C. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, v.301, n.3, Jun, p.1020-4. 2002.

Prediger, R. D., Medeiros, R., Pandolfo, P., Duarte, F. S., Passos, G. F., Pesquero, J. B., Campos, M. M., Calixto, J. B. e Takahashi, R. N. Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, v.151, n.3, Feb 6, p.631-43. 2008.

Price, M. R., Baillie, G. L., Thomas, A., Stevenson, L. A., Easson, M., Goodwin, R., Mclean, A., Mcintosh, L., Goodwin, G., Walker, G., Westwood, P., Marrs, J., Thomson, F., Cowley, P., Christopoulos, A., Pertwee, R. G. e Ross, R. A. Allosteric modulation of the cannabinoid CB1 receptor. *Mol Pharmacol*, v.68, n.5, Nov, p.1484-95. 2005.

Proska, J. e Tucek, S. Mechanisms of steric and cooperative actions of alcuronium on cardiac muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, v.45, n.4, Apr, p.709-17. 1994.

Raffa, R. B., Stone, D. J., Jr. e Hipp, S. J. Differential cholera-toxin sensitivity of supraspinal antinociception induced by the cannabinoid agonists delta9-THC, WIN 55,212-2 and anandamide in mice. *Neurosci Lett*, v.263, n.1, Mar 19, p.29-32. 1999.

Rall, J. M., Mach, S. A. e Dash, P. K. Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats. *Brain Res*, v.968, n.2, Apr 11, p.273-6. 2003.

Razani, B., Woodman, S. E. e Lisanti, M. P. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev*, v.54, n.3, Sep, p.431-67. 2002.

Reggio, P. H. Pharmacophores for ligand recognition and activation/inactivation of the cannabinoid receptors. *Curr Pharm Des*, v.9, n.20, p.1607-33. 2003.

Rhee, M. H., Bayewitch, M., Avidor-Reiss, T., Levy, R. e Vogel, Z. Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem*, v.71, n.4, Oct, p.1525-34. 1998.

Rios, C., Gomes, I. e Devi, L. A. mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *Br J Pharmacol*, v.148, n.4, Jun, p.387-95. 2006.

Rodriguez De Fonseca, F., Navarro, M., Gomez, R., Escuredo, L., Nava, F., Fu, J., Murillo-Rodriguez, E., Giuffrida, A., Loverme, J., Gaetani, S., Kathuria, S., Gall, C. e Piomelli, D. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, v.414, n.6860, Nov 8, p.209-12. 2001.

Romano, M., Maddox, J. F. e Serhan, C. N. Activation of human monocytes and the acute monocytic leukemia cell line (THP-1) by lipoxins involves unique signaling pathways for lipoxin A4 versus lipoxin B4: evidence for differential Ca²⁺ mobilization. *J Immunol*, v.157, n.5, Sep 1, p.2149-54. 1996.

Ross, R. A. Allosterism and cannabinoid CB(1) receptors: the shape of things to come. *Trends Pharmacol Sci*, v.28, n.11, Nov, p.567-72. 2007.

Ross, R. A., Gibson, T. M., Brockie, H. C., Leslie, M., Pashmi, G., Craib, S. J., Di Marzo, V. e Pertwee, R. G. Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens. *Br J Pharmacol*, v.132, n.3, Feb, p.631-40. 2001.

Roth, S. H. e Williams, P. J. The non-specific membrane binding properties of delta9-tetrahydrocannabinol and the effects of various solubilizers. *J Pharm Pharmacol*, v.31, n.4, Apr, p.224-30. 1979.

Rowley, A. F., Lloyd-Evans, P., Barrow, S. E. e Serhan, C. N. Lipoxin biosynthesis by trout macrophages involves the formation of epoxide intermediates. *Biochemistry*, v.33, n.4, Feb 1, p.856-63. 1994.

Russo, E. B., Jiang, H. E., Li, X., Sutton, A., Carboni, A., Del Bianco, F., Mandolino, G., Potter, D. J., Zhao, Y. X., Bera, S., Zhang, Y. B., Lu, E. G., Ferguson, D. K., Hueber, F., Zhao, L. C., Liu, C. J., Wang, Y. F. e Li, C. S. Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *J Exp Bot*, v.59, n.15, p.4171-82. 2008.

Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T. e Greasley, P. J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, v.152, n.7, Dec, p.1092-101. 2007.

Ryberg, E., Vu, H. K., Larsson, N., Groblewski, T., Hjorth, S., Elebring, T., Sjogren, S. e Greasley, P. J. Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor. *FEBS Lett*, v.579, n.1, Jan 3, p.259-64. 2005.

Samuelson, L. C., Swanberg, L. J. e Gantz, I. Mapping of the novel G protein-coupled receptor Gpr18 to distal mouse chromosome 14. *Mamm Genome*, v.7, n.12, Dec, p.920-1. 1996.

Savinainen, J. R., Jarvinen, T., Laine, K. e Laitinen, J. T. Despite substantial degradation, 2-arachidonoylglycerol is a potent full efficacy agonist mediating CB(1) receptor-dependent G-protein activation in rat cerebellar membranes. *Br J Pharmacol*, v.134, n.3, Oct, p.664-72. 2001.

Scalia, R., Gefen, J., Petasis, N. A., Serhan, C. N. e Lefler, A. M. Lipoxin A4 stable analogs inhibit leukocyte rolling and adherence in the rat mesenteric microvasculature: role of P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.94, n.18, Sep 2, p.9967-72. 1997.

Schaffer, J. E. e Lodish, H. F. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*, v.79, n.3, Nov 4, p.427-36. 1994.

Schottelius, A. J., Giesen, C., Asadullah, K., Fierro, I. M., Colgan, S. P., Bauman, J., Guilford, W., Perez, H. D. e Parkinson, J. F. An aspirin-

triggered lipoxin A4 stable analog displays a unique topical anti-inflammatory profile. *J Immunol*, v.169, n.12, Dec 15, p.7063-70. 2002.

Serhan, C. N. Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? *Prostaglandins*, v.53, n.2, Feb, p.107-37. 1997.

Serhan, C. N., Hamberg, M. e Samuelsson, B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.81, n.17, Sep, p.5335-9. 1984.

Shearman, M. S., Berry, N., Oda, T., Ase, K., Kikkawa, U. e Nishizuka, Y. Isolation of protein kinase C subspecies from a preparation of human T lymphocytes. *FEBS Lett*, v.234, n.2, Jul 18, p.387-91. 1988.

Shearman, M. S., Naor, Z., Sekiguchi, K., Kishimoto, A. e Nishizuka, Y. Selective activation of the gamma-subspecies of protein kinase C from bovine cerebellum by arachidonic acid and its lipoxygenase metabolites. *FEBS Lett*, v.243, n.2, Jan 30, p.177-82. 1989.

Sheskin, T., Hanus, L., Slager, J., Vogel, Z. e Mechoulam, R. Structural requirements for binding of anandamide-type compounds to the brain cannabinoid receptor. *J Med Chem*, v.40, n.5, Feb 28, p.659-67. 1997.

Shim, J. Y. e Howlett, A. C. WIN55212-2 docking to the CB1 cannabinoid receptor and multiple pathways for conformational induction. *J Chem Inf Model*, v.46, n.3, May-Jun, p.1286-300. 2006.

Shin, J., Cho, H., Hwang, S. W., Jung, J., Shin, C. Y., Lee, S. Y., Kim, S. H., Lee, M. G., Choi, Y. H., Kim, J., Haber, N. A., Reichling, D. B., Khasar, S., Levine, J. D. e Oh, U. Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, n.15, Jul 23, p.10150-5. 2002.

Sigel, E. e Buhr, A. The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci*, v.18, n.11, Nov, p.425-9. 1997.

Simmet, T. e Peskar, B. A. Lipoxygenase products of polyunsaturated fatty acid metabolism in the central nervous system: biosynthesis and putative functions. *Pharmacol Res*, v.22, n.6, Nov-Dec, p.667-82. 1990.

Slanina, K. A. e Schweitzer, P. Inhibition of cyclooxygenase-2 elicits a CB1-mediated decrease of excitatory transmission in rat CA1 hippocampus. *Neuropharmacology*, v.49, n.5, Oct, p.653-9. 2005.

Souza, M. H., De Lima, O. M., Jr., Zamuner, S. R., Fiorucci, S. e Wallace, J. L. Gastritis increases resistance to aspirin-induced mucosal injury via COX-2-mediated lipoxin synthesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v.285, n.1, Jul, p.G54-61. 2003.

Sri Kantha, S., Matsumura, H., Kubo, E., Kawase, K., Takahata, R., Serhan, C. N. e Hayaishi, O. Effects of prostaglandin D2, lipoxins and leukotrienes on sleep and brain temperature of rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v.51, n.2, Aug, p.87-93. 1994.

Starowicz, K., Nigam, S. e Di Marzo, V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther*, v.114, n.1, Apr, p.13-33. 2007.

Stella, N., Schweitzer, P. e Piomelli, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, v.388, n.6644, Aug 21, p.773-8. 1997.

Su, S. B., Gong, W., Gao, J. L., Shen, W., Murphy, P. M., Oppenheim, J. J. e Wang, J. M. A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. *J Exp Med*, v.189, n.2, Jan 18, p.395-402. 1999.

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A. e Waku, K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, v.215, n.1, Oct 4, p.89-97. 1995.

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Tonegawa, T., Nakane, S., Yamashita, A., Ishima, Y. e Waku, K. Transacylase-mediated and phosphodiesterase-mediated synthesis of N-arachidonylethanolamine, an endogenous cannabinoid-receptor ligand, in rat brain microsomes. Comparison with synthesis from free arachidonic acid and ethanolamine. *Eur J Biochem*, v.240, n.1, Aug 15, p.53-62. 1996.

Takahashi, R. N., Pamplona, F. A. e Fernandes, M. S. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neurosci Lett*, v.380, n.3, Jun 3, p.270-5. 2005.

Takano, T., Clish, C. B., Gronert, K., Petasis, N. e Serhan, C. N. Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and novel lipoxin B4 stable analogues. *J Clin Invest*, v.101, n.4, Feb 15, p.819-26. 1998.

Takano, T., Fiore, S., Maddox, J. F., Brady, H. R., Petasis, N. A. e Serhan, C. N. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors. *J Exp Med*, v.185, n.9, May 5, p.1693-704. 1997.

Teather, L. A., Packard, M. G. e Bazan, N. G. Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation. *Learn Mem*, v.9, n.1, Jan-Feb, p.41-7. 2002.

Touwn, M. The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *J Psychoactive Drugs*, v.13, p.23-34. 1981.

Ueda, N., Yamamoto, K., Yamamoto, S., Tokunaga, T., Shirakawa, E., Shinkai, H., Ogawa, M., Sato, T., Kudo, I., Inoue, K. e Et Al. Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of arachidonylethanolamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochim Biophys Acta*, v.1254, n.2, Jan 20, p.127-34. 1995.

Umathe, S. N., Manna, S. S., Utturwar, K. S. e Jain, N. S. Endocannabinoids mediate anxiolytic-like effect of acetaminophen via CB1 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.33, n.7, Oct 1, p.1191-9. 2009.

Uz, T., Dimitrijevic, N., Imbesi, M., Manev, H. e Manev, R. Effects of MK-886, a 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) inhibitor, and 5-lipoxygenase deficiency on the forced swimming behavior of mice. *Neurosci Lett*, v.436, n.2, May 9, p.269-72. 2008.

Uz, T., Dimitrijevic, N., Tueting, P. e Manev, H. 5-lipoxygenase (5LOX)-deficient mice express reduced anxiety-like behavior. *Restor Neurol Neurosci*, v.20, n.1-2, p.15-20. 2002.

Van Der Stelt, M., Van Kuik, J. A., Bari, M., Van Zadelhoff, G., Leeflang, B. R., Veldink, G. A., Finazzi-Agro, A., Vliegthart, J. F. e Maccarrone, M. Oxygenated metabolites of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: conformational analysis and interaction with cannabinoid receptors, membrane transporter, and fatty acid amide hydrolase. *J Med Chem*, v.45, n.17, Aug 15, p.3709-20. 2002.

Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J. S., Marnett, L. J., Di Marzo, V., Pittman, Q. J., Patel, K. D. e Sharkey, K. A. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, v.310, n.5746, Oct 14, p.329-32. 2005.

Varma, N., Carlson, G. C., Ledent, C. e Alger, B. E. Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J Neurosci*, v.21, n.24, Dec 15, p.RC188. 2001.

Verdier, Y. e Penke, B. Binding sites of amyloid beta-peptide in cell plasma membrane and implications for Alzheimer's disease. *Curr Protein Pept Sci*, v.5, n.1, Feb, p.19-31. 2004.

Von Der Weid, P. Y., Hollenberg, M. D., Fiorucci, S. e Wallace, J. L. Aspirin-triggered, cyclooxygenase-2-dependent lipoxin synthesis modulates vascular tone. *Circulation*, v.110, n.10, Sep 7, p.1320-5. 2004.

Wager-Miller, J., Westenbroek, R. e Mackie, K. Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem Phys Lipids*, v.121, n.1-2, Dec 31, p.83-9. 2002.

Williams, J. H. e Bliss, T. V. Induction but not maintenance of calcium-induced long-term potentiation in dentate gyrus and area CA1 of the hippocampal slice is blocked by nordihydroguaiaretic acid. *Neurosci Lett*, v.88, n.1, May 16, p.81-5. 1988.

Wilson, R. I. e Nicoll, R. A. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, v.296, n.5568, Apr 26, p.678-82. 2002.

Woodward, D. F., Liang, Y. e Krauss, A. H. Prostamides (prostaglandin-ethanolamides) and their pharmacology. *Br J Pharmacol*, v.153, n.3, Feb, p.410-9. 2008.

Yu, M., Ives, D. e Ramesha, C. S. Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, v.272, n.34, Aug 22, p.21181-6. 1997.

Zurier, R. B., Sun, Y. P., George, K. L., Stebulis, J. A., Rossetti, R. G., Skulas, A., Judge, E. e Serhan, C. N. Ajulemic acid, a synthetic cannabinoid, increases formation of the endogenous proresolving and anti-inflammatory eicosanoid, lipoxin A4. *FASEB J*, v.23, n.5, May, p.1503-9. 2009.

**ANEXO 1 – PUBLICAÇÃO DE PARTE DOS RESULTADOS EM
PERIÓDICO CIENTÍFICO INTERNACIONAL**



Aspirin-triggered lipoxin induces CB₁-dependent catalepsy in mice

Fabrice A. Pamplona^a, Octavio Menezes-de-Lima Jr.^b, Reinaldo N. Takahashi^{a,*}

^a Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^b Laboratório de Farmacologia Aplicada, FarManguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2009

Received in revised form

14 December 2009

Accepted 20 December 2009

Keywords:

Aspirin-triggered lipoxin

15-Epi-lipoxin A₄

Endocannabinoid

Anandamide

Lipoxygenase

ABSTRACT

Evidence are that inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2) enhances endocannabinoid signaling, indicating a crosstalk between these two eicosanoid pathways. Aspirin, a non-selective COX inhibitor, acetylates COX-2 with generation of a lipoxygenase (LOX) substrate, whose end product is the 15-epi-lipoxin A₄ (15-epi-LXA₄), an aspirin-triggered lipoxin. Our objective was to investigate whether 15-epi-LXA₄ would potentiate *in vivo* effects of the endocannabinoid anandamide (AEA). Catalepsy was selected as a behavioral parameter and tested 5 min after AEA injection in all experiments. AEA induced dose-dependent (200 pmol/2 μl, i.c.v.) catalepsy. A sub-dose of AEA (10 pmol/2 μl, i.c.v.) was potentiated by aspirin (300 mg/kg, p.o.) via a 5-LOX-dependent step. The cataleptic effect induced by the interaction between sub-doses of 15-epi-LXA₄ (0.01 pmol/2 μl, i.c.v.) and AEA (10 pmol/2 μl, i.c.v.) was prevented by the cannabinoid CB₁ receptors antagonist SR141716A (1 mg/kg, i.p.), but not by the antagonist of lipoxin ALX receptors Boc-2 (10 μg/kg, i.p.). While previous studies have shown that COX inhibition itself may enhance endocannabinoid effects, here we add another piece of evidence revealing that a LOX-derivative produced in consequence of COX-2 acetylation participates in this process.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

The endocannabinoid system is one of the most abundant neuromodulatory systems in the brain. It is basically composed by the CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors, the endocannabinoids – the most studied molecules are anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) – and the enzymes responsible for its synthesis (phospholipase D for AEA; phospholipase C and/or diacylglycerol lipase for 2-AG) and metabolism (fatty acid amide hydrolase – FAAH – for AEA and monoacylglycerol lipase – MGL – for 2-AG) (for an excellent review, see [1]). In addition to FAAH and MGL, evidence are that inhibition of cyclooxygenase (COX) 2 – but not of COX-1 – enhances endocannabinoid signaling, indicating a crosstalk between these two eicosanoid pathways [10,18]. The same interaction between COX enzymes and endocannabinoid has been observed *in vivo*, as non-selective or COX-2-selective inhibition impaired memory acquisition/consolidation in the water maze spatial reference task [17,21]. Moreover, the analgesic effect of the non-selective COX inhibitor indomethacin is blocked by the CB₁ cannabinoid receptors antagonist AM251 and is absent in CB₁ knockout mice, suggesting participation of endocannabinoids [8]. A schematic representation of the eicosanoid metabolic pathways is provided in Fig. 1.

One particular effect of aspirin, a non-selective COX inhibitor, is the acetylation of COX-2 and the consequent generation of distinct oxygenated molecular mediators, such as 15-R-HETE, which is a substrate of the lipoxygenases (LOX). The end product of this enzymatic reaction is the generation of aspirin-triggered lipoxins (ATL), whose best known representative is 15-epi-lipoxin A₄ (15-epi-LXA₄), an optic isomer of the naturally occurring lipoxin A₄ [12]. This LOX-derivative plays a role on the anti-inflammatory effects of aspirin, but there is hardly any idea about its effects on the central nervous system. Therefore, the possibility that ATL might contribute to the enhancement of brain endocannabinoid signaling secondary to aspirin-induced COX inhibition is intriguing. This would add to the interesting concept that the endocannabinoid system may also crosstalk with LOX pathways in addition to the already described role of COX enzymes in endocannabinoid metabolism [25]. Nevertheless, as high-affinity binding sites for lipoxins have already been described, we also investigated the participation of lipoxin ALX receptors on the observed responses [2]. Importantly, endogenous LOX derivatives have already been reported to activate TRPV1 vanilloid receptors, where AEA also binds and is proposed as one of the possible natural ligands [9].

Therefore, our objective was to investigate whether the ATL 15-epi-LXA₄ produced by LOX would influence mouse behavior by enhancing endocannabinoid signaling. Our initial approach was to define a sub-effective dose of AEA and test whether it interacts with a dose of aspirin known to inhibit COX and produce 15-epi-LXA₄ *in vivo* [19]. Then, we investigated the role of 5-LOX on this process and confirmed the effects of 15-epi-LXA₄ itself.

* Corresponding author at: Departamento de Farmacologia CCB-UFSC, Campus Universitário Trindade, 88049-900, Florianópolis, SC, Brazil. Tel.: +55 48 3721 9491; fax: +55 48 3337 5479.
E-mail address: takahashi@farmaco.ufsc.br (R.N. Takahashi).

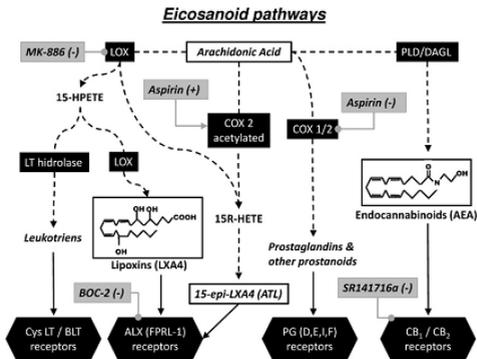


Fig. 1. Schematic representation of the eicosanoid metabolic pathways, including the sites of action of the substances used in the present study. Arachidonic acid is the common precursor of prostaglandins and other prostanoids, endocannabinoids, leukotrienes and lipoxins. From left to right: the leukotrienes and lipoxins share a common metabolic pathway using lipoxygenases (LOX) to generate the 15-HPETE precursor. Then, leukotriene hydrolase yields the leukotrienes, which act on leukotriene receptors (CysLT, BLT). Lipoxins are primarily generated via a serial LOX pathway and act at ALX receptors (specially lipoxin A_4 , LXA $_4$) previously named formyl peptide-like receptors 1 (FPRL-1). An alternative route for the synthesis of 15-epi-lipoxin A_4 (15-epi-LXA $_4$) is via acetylation of cyclooxygenase (COX/2) by aspirin. (For this reason 15-epi-LXA $_4$ is named aspirin-triggered lipoxin, or ATL). Prostaglandins are synthesized by COX 1/2 enzymes and act at the level of prostaglandin receptors (PGD, PGE, PGI, PGG). Endocannabinoids are synthesized either via phospholipase D (PLD) for anandamide (AEA) or via diacylglycerol lipase (DAGL) for 2-arachidonoyl glycerol (not represented) and activate CB $_1$ /CB $_2$ receptors. Aspirin inhibits COX enzymes and acetylates COX-2; MK-886 inhibits the LOX pathway; SR141716A is an antagonist of CB $_1$ receptors; BOC-2 is an antagonist of ALX receptors. All these drugs have been used in the present study. Dashed line represents synthetic route. Solid line represents site of action.

which was prevented by the CB $_1$ cannabinoid receptors antagonist SR141716A, but not by the ALX receptors antagonist Boc-2. Catalepsy was used as a behavioral parameter, since it is part of the tetrad of cannabinoid effects, widely used for *in vivo* screening of drugs with cannabinoid-like activity [7,14].

Experiments were carried out on 3-months-old male Swiss albino mice from the animal facility of Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, Brazil), weighing 30–35 g at the time of testing. They were kept in groups of 15–20 animals per cage in a room under controlled temperature (23 ± 1 °C) and subjected to a 12-h light cycle (lights on 7:00 a.m.) with free access to food and water. All procedures used in the present study comply with the guidelines on animal care of the local Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA, UFSC), which follows the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the U.S. National Institutes of Health.

Anandamide (TOCRIS, USA) and 15-epi-lipoxin A_4 (Oxford Biomedical Research, USA) were dissolved in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), with final ethanol concentration of 0.5% and injected via i.c.v. route. Acetylsalicylic acid (Aspirin; Sigma–Aldrich, USA) was suspended in 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) and given via gavage. MK-886 (Cayman, USA) was dissolved in 0.9% saline. SR141716A (Sanofi–Aventis, France) and Boc-2 (MP Biomedicals, USA) were dissolved in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) plus 0.1% Tween 80 and injected i.p. The control solution consisted of the respective drug vehicle. The doses were selected based on the literature [13,19,20].

The i.c.v. injection was performed as previously described [11] and established as standard procedure in our laboratory [15,16]. Briefly, a 10 μ l microsyringe (Hamilton, USA) attached to a 26-gauge stainless-steel needle by a polyethylene tubing (PE 10) was used for the injections. The animals underwent slight isoflurane anesthesia (Abbot, Brazil) and were gently restrained by hand for i.c.v. injections. The needle was inserted to a depth of 2.4 mm uni-

laterally 1 mm to the right of the midline point equidistant from each eye, at an equal distance between the eyes and the ears and perpendicular to the plane of the skull. The solution was injected gradually and mice exhibited apparent normal behavior within 1–2 min after injection. Accurate placement was verified by the position of the needle track during brain dissection (80–90% of right placements).

Catalepsy was measured using a modification of the original 'ring test' developed by [14], the so-called 'bar catalepsy test' [6]. Mice were hung by their front paws from a bar (0.5 cm diameter, 5 cm high) fixed horizontally at a position allowing the mice to touch the hindpaws on the bench. The time taken for the mouse to move off the bar was recorded and expressed as immobility time (300 s cut-off). As some animals resist staying on the upright position in the first time, a maximum of three placements were performed and the total immobility time summed up.

Experiment 1: A dose–response experiment was performed to define a sub-effective dose of the endocannabinoid AEA for the subsequent experiments of pharmacological interaction. Mice were injected with increasing doses of AEA (1–200 pmol/2 μ l, i.c.v.) or control and 5 min later tested in the catalepsy bar test.

Experiment 2: To investigate if aspirin enhances endocannabinoid signaling, mice were given aspirin (30–300 mg/kg, p.o.) and 25 min after injected with AEA (10 pmol/2 μ l, i.c.v.) or control. Additionally, mice were treated with a selected dose of aspirin (300 mg/kg, p.o.) and after 10, 25, 55 or 85 min injected with AEA (10 pmol/2 μ l, i.c.v.) or control. Catalepsy was assessed 5 min after anandamide injection.

Experiment 3: The participation of LOX derivatives on the aspirin-induced enhancement of AEA effects was investigated by inhibition of the LOX pathway. Mice were treated with the 5-LOX inhibitor MK-886 (1 mg/kg, i.p.) or control 10 min before aspirin (300 mg/kg, p.o.) administration. AEA (10 pmol/2 μ l, i.c.v.) or con-

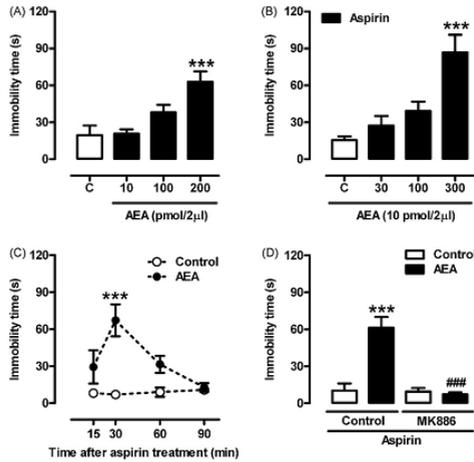


Fig. 2. (A) Anandamide (AEA) induces dose-dependent (10–200 pmol/2 µl, i.c.v.), catalepsy compared to control (C; 0.5% ethanol). (B and C) Aspirin (300 mg/kg, p.o.) potentiates the effects of a sub-dose of AEA (10 pmol/2 µl, i.c.v.). (D) The 5-lipoxygenase inhibitor MK-886 (1 mg/kg, i.p.) prevents the aspirin-induced potentiation of AEA effects ($n=6-8$ animals per group). *** $p<0.001$ compared to control; ### $p<0.001$ compared to the combined treatment with AEA+aspirin (Duncan's post hoc test).

control was injected 25 min after aspirin and catalepsy was assessed 5 min after AEA injection.

Experiment 4: As the involvement of 5-LOX on aspirin effects suggests the participation of ATL, we tested whether an ATL interacts with an endocannabinoid, as observed for aspirin. Mice were co-injected with 15-epi-LXA₄ (0.1 pmol/2 µl, i.c.v.) or control and AEA (10 pmol/2 µl, i.c.v.) or control 5 min before assessment of catalepsy.

Experiment 5: The role of cannabinoid CB₁ receptors on the ATL-induced enhancement of AEA cataleptic effects was investigated by the use of one CB₁-selective antagonist, SR141716A (1 mg/kg, i.p.) or control was injected 55 min before the co-administration of 15-epi-LXA₄ (0.1 pmol/2 µl, i.c.v.) or control and AEA (10 pmol/2 µl, i.c.v.). Catalepsy was assessed 5 min later.

Experiment 6: The role of ALX receptors on the ATL-induced enhancement of AEA cataleptic effects was investigated by the use of one ALX-selective antagonist, Boc-2 (10 µg/kg, i.p.) or control was injected 55 min before the co-administration of 15-epi-LXA₄ (0.1 pmol/2 µl, i.c.v.) or control and AEA (10 pmol/2 µl, i.c.v.). Catalepsy was assessed 5 min later.

Statistical analysis of data was performed using Statistica 7 (Statsoft, USA) and graphs designed with GraphPad 5 (Graph Pad Inc., USA). One- or two-way ANOVA were used, establishing time, treatment and pre-treatment as independent variables. Duncan's test was used for post hoc comparisons, following significant ANOVAs. All data are presented as mean ± s.e.m. The accepted level of significance was $p \leq 0.05$.

Experiment 1: AEA induced a dose-dependent cataleptic effect [$F(3,21)=8.89$, $p<0.001$]; which was borderline at the dose of 100 pmol ($p=0.07$) and significant at the dose of 200 pmol

($p<0.001$). The estimated EC₅₀ (95% confidence interval) for AEA was 1087 (690–1711) pmol.

Experiment 2: Aspirin potentiated the cataleptic effects of a sub-dose of AEA [$F(3,24)=11.83$, $p<0.0001$; Fig. 2B], with higher effect at the dose of 300 mg/kg compared to control and the other doses ($p<0.0001$). The potentiation of AEA effects by aspirin was time-dependent (Time × Treatment [$F(3,21)=8.89$, $p<0.001$]; Fig. 2C), with peak effect occurring 30 min after aspirin administration ($p<0.001$).

Experiment 3: Administration of MK886, a 5-LOX inhibitor, abolished the catalepsy induced by the combination of aspirin and AEA (Pre-treatment × Treatment [$F(1,26)=21.74$, $p<0.0001$]; Fig. 2D). Aspirin enhanced the cataleptic effect of AEA ($p<0.001$), which was prevented by the inhibition of 5-LOX ($p<0.001$).

Experiment 4: As evidence suggested the participation of LOX derivatives on the aspirin-induced enhancement of AEA cataleptic effects, we tested whether co-injected 15-epi-LXA₄ would also potentiate AEA effects. In fact, one-way ANOVA showed overall difference between groups [$F(3,32)=7.69$, $p<0.001$; Fig. 3A]. While the selected doses of AEA and 15-epi-LXA₄ were sub-effective ($p>0.05$), the combination of both induced catalepsy ($p<0.001$).

Experiment 5: Blockade of cannabinoid CB₁ receptors by SR141716A influenced the combined effects of 15-epi-LXA₄ and AEA (Pre-treatment × Treatment [$F(1,20)=7.08$, $p<0.01$]; Fig. 3B). The combination of sub-effective doses of AEA and 15-epi-LXA₄ induced catalepsy ($p<0.001$) and this effect was prevented by the blockade of cannabinoid CB₁ receptors ($p<0.001$).

Experiment 6: Pre-treatment with Boc-2 did not influence behavior [$F(1,25)=0.08$, $p=0.77$], whereas i.c.v. treatment induced catalepsy [$F(1,25)=16.95$, $p<0.001$]. There was no pre-treatment × treatment interaction [$F(1,25)=0.00$, $p=0.97$; Fig. 3C]. Confirming previous results, the combination of sub-effective

doses of 15-*epi*-LXA₄ and AEA induced catalepsy compared to control ($p < 0.01$). There was no effect of the blockade of ALX receptors by Boc-2 ($p > 0.05$).

In the present report, we show that COX inhibition by aspirin enhances AEA effects in vivo, confirming the proposed role of COX on endocannabinoid metabolism [27]. While previous studies have shown that COX inhibition itself may enhance endocannabinoid effects, here we add another piece of evidence revealing that a LOX-derivative produced in consequence of COX-2 acetylation participates in this process. Our results suggest that not only

COX inhibition, but also an ATL product of LOX pathways, indirectly underlie this effect. The role of LOX on endocannabinoid metabolism was previously suggested [25], but to the best of our knowledge, this is the first report that the ATL 15-*epi*-LXA₄ exerts *in vivo* effects via CB₁ cannabinoid receptors.

The evidence here provided does not allow us to define whether the present effects of aspirin are due to COX inhibition or via production of LOX derivatives. A combination of both pharmacological mechanisms is likely involved. However, the fact that 15-*epi*-LXA₄ influences endocannabinoid signaling is certainly worth of further investigation, since it suggests the crosstalk between these two eicosanoids pathways. If on the one hand, it may add to the mechanisms of action of aspirin; on the other hand, it raises the question as to whether endogenous molecules of the LOX pathway would interact with the endocannabinoid system as well. So far, it has been shown that the LOX derivatives 12- and 15-(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acids, 5- and 15-(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acids and leukotriene B₄ are highly potent agonists at TRPV1 receptors, where the prototype endocannabinoid AEA also binds [9]. On the other hand, the agonist of CB₁ cannabinoid receptors, ajulemic acid increases the formation of LXA₄ *in vivo*, which probably participates on the anti-inflammatory effects of this synthetic cannabinoid [28]. Interestingly, the aforementioned study intentionally used ajulemic acid due to its non-psychoactive characteristic, whereas here we show for the first time that the interaction between CB₁ receptors and LOX-derivatives also occur in the brain.

The effects of 15-*epi*-LXA₄ in the periphery are frequently attributed to activation of lipoxin ALX receptors. These G-protein-coupled receptors have been initially identified as orphans with high structural homology to FPRL1 receptors. More recently, despite being described as promiscuous receptors and also activated by non-lipid ligands, the ALX receptors are regarded as receptors for lipoxins and were found in several peripheral tissues [3]. Here we presented a central effect of 15-*epi*-LXA₄ that is apparently independent of ALX receptors, as ruled out by pharmacological means. In partial support of our hypothesis, the expression of LOX, the anandamide-degrading enzyme FAAH and COX-2 in close vicinity in the brain was recently reported, thus suggesting that a cooperative molecular mechanism between them is possible [4]. Importantly, the expression of ALX receptors in the brain is not yet established.

Conversely, the role of LOX-derivatives on centrally mediated behaviors is recently being depicted. The expression of 5-LOX enzyme in the brain was already shown in the hippocampus [26] and cerebellum [24]. Moreover, 5-LOX knock-out mice exhibit disturbed emotionality, as represented by reduced anxiety-like behavior in the elevated plus-maze test [23] and increased climbing behavior in the forced swim test [22]. Moreover, activation of glucocorticoid receptors by dexamethasone induces up-regulation of 5-LOX in cultured rat cerebellar neurons, which could be a possible explanation for the modulation of this enzyme by stress [24]. This is paralleled by the fact that pharmacological 5-LOX inhibition attenuates the stress-induced decreased of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the prefrontal cortex [5].

In conclusion, here we demonstrated a cannabinoid-like activity induced by the ATL 15-*epi*-LXA₄, which is indirectly derived from the 5-LOX pathway. Due to the innovative characteristic of our findings, there is not yet a concrete mechanism or explanation for them. One possibility would be that the ATL production and COX inhibition are two unrelated parallel consequences of aspirin administration and the former lead to an increase in arachidonic acid levels and its further consequences. Yet, if one assumes a direct role of ATL on aspirin-induced enhancement of endocannabinoid signaling, what would be a putative mechanism for the ATL effect? As the participation of ALX receptors on the present effects

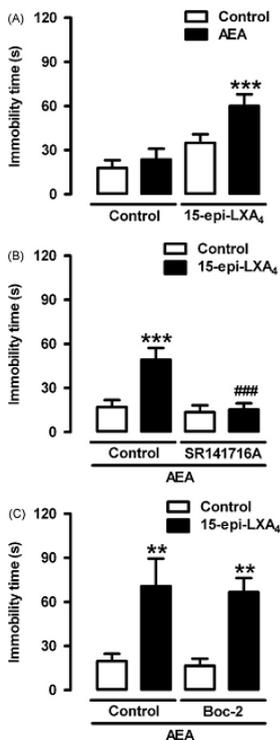


Fig. 3. (A) The aspirin-triggered lipoxin 15-*epi*-lipoxin A₄ (15-*epi*-LXA₄; 0.01 pmol/2 μ l) potentiates the effects of a sub-dose of AEA (10 pmol/2 μ l, i.c.v.) without effect per se. (B) The CB₁-selective cannabinoid antagonist SR141716A (1 mg/kg, i.p.) prevents the 15-*epi*-LXA₄-induced potentiation of AEA effects. (C) The ALX receptors antagonist Boc-2 (10 μ g/kg, i.p.) does not prevent the 15-*epi*-LXA₄-induced potentiation of AEA effects ($n=6-8$ animals per group) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control; # $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared to the combined treatment with AEA+15-*epi*-LXA₄ (Duncan's post hoc test).

is apparently ruled out, putative orthosteric or allosteric sites at CB₁ receptors may support this interaction. Alternative interpretations of our results could include unidentified downstream effectors or metabolic interactions. Ongoing studies in our laboratory are exploring these possibilities and further investigating the physiological significance of LOX pathways for the endocannabinoid system.

Acknowledgements

F.A.P. is truly grateful to Mr. Daniel Rial for his excellent technical contribution in one of the experiments. This study was supported by research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil). F.A.P. received a doctoral scholarship from CNPq-Brazil. O.L.M. Jr. is the holder of a CNPq/FIOCRUZ invited researcher fellowship. R.N.T. is the holder of a CNPq research fellowship.

References

- [1] T. Bisogno, A. Ligresti, V. Di Marzo, The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81 (2005) 224–238.
- [2] C. Brink, S.E. Dahlen, J. Drazen, J.F. Evans, D.W. Hay, S. Nicosia, C.N. Serhan, T. Shimizu, T. Yokomizo, International Union of Pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacol. Rev.* 55 (2003) 195–227.
- [3] N. Chiang, C.N. Serhan, S.E. Dahlen, J.M. Drazen, D.W. Hay, G.E. Rovati, T. Shimizu, T. Yokomizo, C. Brink, The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions *in vivo*. *Pharmacol. Rev.* 58 (2006) 463–487.
- [4] L. Cristiano, K. Starowicz, L. De Petrocellis, J. Morishita, N. Ueda, V. Guglielmotti, V. Di Marzo, Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. *Neuroscience* 151 (2008) 955–968.
- [5] S. Dostoyeva, M. Imbesi, T. Uz, N. Dimitrijevic, H. Manev, R. Manev, Caffeic acid attenuates the decrease of cortical BDNF transcript IV mRNA induced by swim stress in wild-type but not in 5-lipoxygenase-deficient mice. *J. Neural Transm.* 115 (2008) 823–827.
- [6] A. Fox, A. Kastingland, C. Gentry, K. McNair, S. Patel, L. Urban, J. James, The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain* 92 (2001) 91–100.
- [7] E. Frida, A. Perchuk, F.S. Hall, C.R. Uhl, E.S. Gravi, Behavioral methods in cannabinoid research. *Methods Mol. Med.* 123 (2006) 269–290.
- [8] H. Guhring, M. Hamza, M. Sergejeva, M. Ates, C.E. Kotalla, C. Ledent, K. Brune, A role for endocannabinoids in Indomethacin-induced spinal antinociception. *EUR. J. Pharmacol.* 454 (2002) 153–163.
- [9] S.W. Hwang, H. Cho, J. Kwak, S.V. Lee, C.J. Kang, J. Jung, S. Cho, K.H. Min, Y.G. Suh, D. Kim, U. Oh, Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 6155–6160.
- [10] J. Kim, B.E. Alger, Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat. Neurosci.* 7 (2004) 697–698.
- [11] S.E. Laursen, J.K. Belknap, Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J. Pharmacol. Methods* 16 (1986) 355–357.
- [12] B. McMahon, S. Mitchell, H.R. Brady, C. Godson, Lipoxins: revelations on resolution. *Trends Pharmacol. Sci.* 22 (2001) 391–395.
- [13] O. Menezes-de-Lima Jr., C.A. Kassuya, A.F. Nascimento, M.G. Henriques, J.B. Calixto, Lipoxin A₄ inhibits acute edema in mice: implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin, Prostaglandins Other Lipid Mediat. 80 (2006) 123–135.
- [14] K.G. Perwee, The ring test: a quantitative method for assessing the 'cataleptic' effect of cannabis in mice. *Br. J. Pharmacol.* 46 (1972) 753–763.
- [15] R.D. Prediger, J.L. Franco, P. Pandolfo, R. Medeiros, F.S. Duarte, G. Di Giunta, C.P. Figueiredo, M. Farina, J.B. Calixto, R.N. Takahashi, A.L. Dafre, Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1–40) administration in C57BL/6J and Swiss albino mice: evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. *Behav. Brain Res.* 177 (2007) 205–213.
- [16] R.D. Prediger, R. Medeiros, P. Pandolfo, F.S. Duarte, G.F. Passos, J.B. Pasquero, M.M. Campos, J.B. Calixto, R.N. Takahashi, Genetic deletion or antagonism of kinin (K₁) and (K₂) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 151 (2008) 631–643.
- [17] J.M. Rial, S.A. Mach, P.K. Dash, Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats. *Brain Res.* 968 (2003) 273–278.
- [18] K.A. Slanina, M. Roberto, P. Schweizer, Endocannabinoids restrict hippocampal long-term potentiation via CB₁. *Neuropharmacology* 49 (2005) 660–668.
- [19] M.H.L.P. Souza, O. Menezes-de-Lima Jr., S.R. Zamuner, S. Fiorucci, J.L. Wallace, Gastritis increases resistance to aspirin-induced mucosal injury via COX-2-mediated lipoxin synthesis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285 (2003) G54–61.
- [20] R.N. Takahashi, F.A. Pamplona, M.S. Fernandes, The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neurosci. Lett.* 380 (2005) 271–275.
- [21] L.A. Teather, M.G. Packard, N.C. Bazan, Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation. *Learn. Mem.* 9 (2002) 41–47.
- [22] T. Uz, N. Dimitrijevic, M. Imbesi, H. Manev, R. Manev, Effects of MK-886, a 5-lipoxygenase activating protein (LAP) inhibitor, and 5-lipoxygenase deficiency on the forced swimming behavior of mice. *Neurosci. Lett.* 435 (2008) 269–272.
- [23] T. Uz, N. Dimitrijevic, P. Tuetting, H. Manev, 5-lipoxygenase (5LOX)-deficient mice express reduced anxiety-like behavior. *Restor. Neurol. Neurosci.* 20 (2002) 15–20.
- [24] T. Uz, Y. Dwivedi, A. Qeli, M. Peters-Golden, C. Pandey, H. Manev, Glucocorticoid receptors are required for up-regulation of neuronal 5-lipoxygenase (5LOX) expression by dexamethasone. *FASEB J.* 15 (2001) 1792–1794.
- [25] M.L. Yates, E.L. Barkler, Inactivation and biotransformation of the endogenous cannabinoids anandamide and 2-arachidonylglycerol. *Mol. Pharmacol.* 76 (2009) 11–17.
- [26] E. Yildirim, Z. Zhang, T. Uz, C.Q. Chen, R. Manev, H. Manev, Valproate administration to mice increases histone acetylation and 5-lipoxygenase content in the hippocampus. *Neurosci. Lett.* 345 (2003) 141–143.
- [27] M. Yu, D. Ives, C.S. Ramesha, Synthesis of prostaglandin E₂ ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 21181–21186.
- [28] R. B. Zurier, Y.P. Sun, K.L. George, J.A. Steubler, R.G. Rossetti, A. Skalkas, E. Judge, C.N. Serhan, Ajudamic acid, a synthetic cannabinoid, increases formation of the endogenous proresolving and anti-inflammatory eicosanoid, lipoxin A₄. *FASEB J.* 23 (2009) 1503–1509.

**ANEXO 2 – OUTRAS PUBLICAÇÕES E PREMIAÇÕES
RESULTANTES DESTA TESE DE DOUTORADO**

Prêmios – Menções Honrosas

Pamplona, F.A.; Ferreira, J.; Menezes-de-Lima Jr, O.; Calixto, J.B.; Takahashi, R.N. Lipoxin A₄: a new player on endocannabinoid neurotransmission suggests endogenous allosteric modulation of CB1 receptors. 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental – SBFTE, Brasil, 2009.

Pamplona, F.A.; Ferreira, J.; Duarte, F.S.; Menezes-de-Lima Jr., O.; Calixto, J.B.; Takahashi, R.N. Lipoxina A₄: um novo ligante endocanabinóide com ações centrais? 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental – SBFTE, Brasil, 2006.

Resumos apresentados em congressos contendo resultados da tese:

Takahashi, R.N.; Pamplona, F.A. Lipoxin A₄ exerts neuroprotective effects mediated by the endocannabinoid system in mice. 22º European College of Neuropsychopharmacology – ECNP, Turquia, 2009.

Pamplona, F.A.; Ferreira, J.; Menezes-de-Lima Jr, O.; Calixto, J.B.; Takahashi, R.N. Lipoxin A₄: a new player on endocannabinoid neurotransmission suggests endogenous allosteric modulation of CB1 receptors. 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental – SBFTE, Brasil, 2009.

Pamplona, F.A.; Prediger, R.D.S.; Menezes-de-Lima Jr, O.; Takahashi, R.N. Lipoxin A₄: a new player in endocannabinoid-mediated neuroprotection? 2º Simpósio do Instituto Internacional de Neurociências de Natal – IINN, Brasil, 2007.

Pamplona, F.A.; Ferreira, J. Duarte, F.S.; Menezes-de-Lima Jr, O.; Calixto, J.B.; Takahashi, R.N. Lipoxina A₄: um novo ligante endocanabinóide com ações centrais? 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental – SBFTE, Brasil, 2006.

Pamplona, F.A.; Prediger, R.D.S.; Menezes-de-Lima Jr, O.; Takahashi, R.N. Administração i.c.v. de lipoxina A₄ previne prejuízos cognitivos em um modelo animal da doença de Alzheimer. 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental – SBFTE, Brasil, 2006.

**ANEXO 3 – OUTRAS PUBLICAÇÕES DURANTE
O PERÍODO DO DOUTORADO**

Capítulo de Livro (1)

Pamplona, F.A.; Takahashi, R.N. *Cannabis e Estresse Pós-Traumático* em Zuardi, A.W.; Crippa, J.A.S.; Guimarães, F.S. et al. *Cannabis e Saúde Mental*. São Paulo: FUNPEC-Editora, 2008.

Artigos Completos (11)

Pamplona, F.A.; Henes, K.; Micale, V.; Mauch, C.P.; Takahashi, R.N.; Wotjak, C.T. Prolonged fear incubation leads to generalized avoidance behavior in mice. *Journal of Psychiatric Research* (submetido).

Pamplona, F.A.; Pandolfo, P.; Duarte, F.S.; Takahashi, R.N. Altered emotionality leads to increase pain tolerance in amyloid β (1-40) peptide-treated mice. *Behavioural Brain Research* (in press).

de Carvalho, C.R.; Pandolfo, P.; Pamplona, F.A.; Takahashi, R.N. Environmental enrichment reduces the impact of novelty and motivational properties of ethanol in spontaneously hypertensive rats. *Behavioral Brain Research* 208 (2010) 231-6.

Pamplona, F.A.; Menezes-de-Lima, O. Jr.; Takahashi, R.N. Aspirin-triggered lipoxin induces CB(1)-dependent catalepsy in mice. *Neuroscience Letters* 470 (2010) 33-37.

Pamplona, F.A.; Pandolfo, P.; Savoldi, R.; Prediger, R.D.; Takahashi, R.N. Environmental enrichment improves cognitive deficits in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR): relevance for Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 33 (2009) 1153-60.

Pires, V.A.; Prediger, R.D.S.; Pamplona, F.A.; Pandolfo, P.; Fernandes, D.; Takahashi, R.N. Adenosine receptor antagonists improve short-term object recognition ability of Spontaneously Hypertensive Rats (SHR): an animal model of Attention / Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). *Behavioral Pharmacology* 20 (2009) 134-45.

Bitencourt, R.M.; Pamplona, F.A.; Takahashi, R.N. Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of

AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *European Neuropsychopharmacology* 18 (2008) 849-859.

Pamplona, F.A.; Bitencourt, R.M.; Takahashi, R.N. Short- and long-term of cannabinoids on the extinction of contextual fear memory in rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 90 (2008) 290-293.

Takahashi, R.N.; Pamplona, F.A.; Prediger, R.D.S. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: A review of animal studies. *Frontiers in Biosciences* 13 (2008) 2614-2632. *Review*.

Pamplona, F.A.; Vendruscolo, L.F.; Takahashi, R.N. Increased sensitivity to cocaine-induced analgesia in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). *Behavioral and Brain Functions* 3 (2007) 9-13.

Pandolfo, P.; Pamplona, F.A.; Prediger, R.D.S.; Takahashi, R.N. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2. *European Journal of Pharmacology* 563 (2007) 141-148.