

A maquinaria molecular necessária para processar mensageiros lipídicos endocanabinoides e seus respectivos receptores

The molecular machinery required to process endocannabinoids lipid signaling and their respective receptors

Tiago Marques Avelar¹, Leonardo Rafael Takahashi², José Oswaldo de Oliveira Junior¹

DOI 10.5935/2595-0118.20230017-pt

RESUMO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: Os preparados medicinais canabinoides são há muito utilizados pela humanidade e têm sido objeto de interesse da indústria farmacológica recente. Para a aplicação terapêutica adequada é necessário, no entanto, o conhecimento aprofundado do sistema canabinoide endógeno, o qual em sua grande parte é constituído por mensageiros lipídicos. O objetivo deste estudo foi explorar o conhecimento vigente a respeito dos constituintes desse sistema, com especial atenção à maquinaria molecular necessária para processá-los.

CONTEÚDO: Trata-se de uma revisão narrativa da literatura atual acerca dos integrantes do sistema canabinoide endógeno, notadamente: seus receptores, os principais ligantes endógenos e as enzimas responsáveis pelo processamento de seus componentes. Os aspectos farmacológicos e pré-clínicos foram enfatizados.

CONCLUSÃO: O melhor entendimento da ultraestrutura de receptores e enzimas contribuirá de forma decisiva para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas. A partir da descrição pormenorizada da maquinaria responsável pela metabolização lipídica endocanabinoide é que se pavimentará o caminho para a descoberta de novos fármacos que atuem no sistema endógeno e que possam ser aplicados de forma eficaz na prática clínica.

Descritores: Canabinoides, Farmacologia, Lipídeos de membrana.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Pharmaceutical preparations of cannabis have been used by mankind since long time ago, and recently they have been the pharmaceutical industry's focus. However, for proper therapeutic application, in-depth knowledge of the endocannabinoid system, which is made mainly by lipid signaling, is needed. The purpose of this study was to explore the current understanding of the players in this system, paying special attention to the molecular machinery required to process it.

CONTENTS: This is a narrative review of the current literature regarding major components of the endocannabinoid system, in particular: the receptors, main endogenous ligands, and the enzymes responsible for its components processing. The pharmacological and preclinical aspects were emphasized.

CONCLUSION: The better comprehension of the molecular structure of receptors and enzymes will be crucial to developing new pharmacological strategies. A detailed description of the machinery responsible for endocannabinoid lipid metabolism will pave the way for the discovery of new drugs that act on the endogenous system and that can be applied effectively in clinical practice.

Keywords: Cannabinoids, Membrane lipids, Pharmacology.

INTRODUÇÃO

Preparados medicinais do vegetal *Cannabis sativa* têm sido utilizados ao longo da história da humanidade¹ como já mencionado nessa edição especial. Porém, apenas recentemente a substância psicoativa, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), foi descoberta e isolada dentre centenas de fitocanabinoides presentes na planta^{2,3}. Essa descoberta fundamental levou à síntese de diversos canabinoides, o que possibilitou o acúmulo de conhecimento farmacológico até que, duas décadas após a descoberta do THC, o primeiro receptor de membrana canabinoide foi identificado e clonado, recebendo a sigla CB1⁴, seguido rapidamente pela descoberta do segundo receptor canabinoide CB2⁵.

Após a descoberta dos receptores, possibilitou-se a verificação de seus primeiros agonistas endógenos. Em 1992, reconheceu-se a substância N-araquidonoil-etanolamina (AEA ou anandamida)⁶. Posteriormente, pelo fato da AEA não conseguir reproduzir completamente os efeitos verificados com o THC, chegou-se ao segundo endocanabinoide (EC) mais importante, o 2-araquidonilglicerol (2-AG)^{7,8}. Ambos derivados do ácido araquidônico (AA), foram as primeiras

Tiago Marques Avelar – <https://orcid.org/0000-0002-7141-5815>;
Leonardo Rafael Takahashi – <https://orcid.org/0000-0002-7741-5760>;
José Oswaldo de Oliveira Junior – <https://orcid.org/0000-0003-1748-4315>.

1. Hospital São Marcos, Neurocirurgia, Teresina, PI, Brasil.
2. AC Camargo Cancer Center, Central da Dor, São Paulo, SP, Brasil.

Apresentado em 15 de junho de 2022.
Aceito para publicação em 13 de fevereiro de 2023.
Conflito de interesses: não há – Fontes de fomento: não há.

DESTAQUES

- Enfatizar a complexidade do sistema endocanabinoide e ir além da compreensão da ação farmacológica direta.
- Comentar a respeito das interações entre o sistema endocanabinoide e outras famílias de receptores como TRPs e PPARs.
- Apontar potenciais alvos promissores para futuras pesquisas.

Correspondência para:

Tiago Marques Avelar
E-mail: avelar.tm@gmail.com

substâncias canabinoides endógenas identificadas e permanecem como as mais bem estudadas. Alguns peptídeos e derivados do metabolismo do AA que geram um efeito canabinoide símile têm sido recentemente descritos e são alvo de intensa pesquisa^{9,10}.

Assim, de forma sintética, há um sistema formado por dois receptores de membrana (CB1 e CB2) e duas famílias de sinalizadores lipídicos como seus ligantes, os quais, em conjunto com as enzimas que os sintetizam e os metabolizam, formam o chamado sistema canabinoide endógeno (SCE)¹¹. Tal sistema possui algumas características que permitem distingui-lo de outros sistemas neurotransmissores clássicos, principalmente no que tange à nocicepção. Dentre elas, uma característica de fundamental importância é o fato de a maquinaria relacionada ao processamento dos mensageiros lipídicos EC estar posicionada nos terminais sinápticos da via nociceptiva. Ademais, uma vez que os ECs não são armazenados em vesículas sinápticas, mas produzidos sob demanda após ativação neuronal intensa, tem-se como provável papel do SCE a função de frenagem na sinalização neuronal em resposta à sua alta ativação¹¹. Pretende-se, neste artigo de revisão, explorar os componentes dessa maquinaria, detalhando seus constituintes e elucidando seus principais aspectos, com enfoque especial à relação entre os Ecs e seus receptores.

RECEPTORES

Os receptores CB1 e CB2 são pertencentes à grande família de receptores ligados à proteína G (GPCR, da sigla inglesa). Trata-se de uma família extensa e diversa de receptores de membrana responsáveis pela tradução de sinais externos (como luz, partículas lipídicas e proteicas, entre outros) em respostas celulares específicas¹³. Atualmente, as contribuições centrais desses receptores na sinalização celular os transformaram em peça-chave nos trabalhos de pesquisa de descoberta de fármacos^{12,13}. São constituídos de sete α -hélices transmembrana com alças as conectando, sendo o terminal N extracelular e o terminal C voltado para a face intracelular. A ligação com determinada substância leva a uma mudança conformacional no receptor, levando à ativação da proteína G atracada na face intracelular do receptor, o que inicia o processo celular específico de sinalização^{14,15}.

Seguindo os objetivos de compatibilização taxonômica da União Internacional das Ciências Farmacológicas, é possível adotar uma classificação (até certo ponto minimalista, mas de grande aceitação) dos ligantes dos GPCR que os agrupa em quatro categorias de acordo com seu perfil farmacodinâmico: agonistas, antagonistas, agonistas parciais e agonistas inversos.

Resumidamente, os agonistas ligam-se ao receptor e ativam a resposta celular através da alteração conformacional. Os antagonistas ligam-se ao receptor e impedem a ligação do agonista, não gerando nenhuma resposta celular. O agonista parcial funciona como um meio-termo, ligando-se ao receptor e gerando uma resposta conformacional incompleta, mas que ainda assim permite alguma resposta celular, porém bloqueia o receptor, impedindo a atuação do agonista completo. Dessa forma, em última análise, quando presentes ambos, agonista completo e parcial, este atua como um antagonista competitivo, diminuindo o vetor global de ativação do receptor. O quarto grupo é representado pelos agonistas inversos, que induzem uma resposta fisiológica no sentido oposto ao que seria esperado de um agonista¹².

Embora a ideia de que a ativação de um receptor somente ocorre quando uma molécula de um agonista se liga a ele esteja sendo disseminada, é possível encontrar muitos exemplos de que pode ocorrer um nível apreciável de ativação mesmo na ausência de ligantes¹⁶.

Receptores de ocorrência natural ou que sofreram mutações (espontâneas ou induzidas) podem causar cenários de ativação na ausência de um ligante, ou seja, a ativação constitutiva. A ocorrência dessa ativação sem a ligação agonista é encontrada em estudos dos receptores acoplados à proteína G, como os canabinoides^{16,17}.

Na maioria das vezes, a ativação constitutiva de receptores não apresenta magnitude para repercussão clínica, no entanto, em certas condições em que há um demasiado aumento da expressão de receptores pode haver implicações fisiopatológicas de relevância. Farta documentação científica disso é mostrada em estudos dos receptores para os beta-adrenorreceptores e nos receptores para canabinoides¹⁶⁻¹⁸. Evidências acumuladas nas últimas três décadas sugeriram um modelo de dois estados¹⁹ no qual os receptores estão em equilíbrio entre a conformação inativa (R) e uma conformação espontaneamente ativa (R*) que pode se acoplar à proteína G na ausência de ligantes.

Os agonistas clássicos têm alta afinidade para R* e aumentam a concentração de R*, enquanto os agonistas inversos têm alta afinidade para R e diminuem a concentração de R*. Antagonistas competitivos neutros têm afinidade igual para R e R* e não deslocam o equilíbrio, mas podem antagonizar competitivamente os efeitos tanto dos agonistas quanto dos agonistas inversos.

A concepção do modelo de dois estados é importante para o entendimento dos mecanismos básicos de ação de várias classes de fármacos, porém não corresponde à realidade. Os receptores não estão restritos a essas duas opções, possuindo flexibilidade conformacional e possibilidades mais numerosas. As diferentes conformações que os receptores são capazes de adotar podem ser estabilizadas preferencialmente por diferentes ligantes e podem produzir diferentes efeitos funcionais pela ativação de diferentes vias de transdução de sinal. A redefinição mais atual sugere um esquema mais complexo que contempla um modelo multiestado e constitui um desafio nessa área de estudo. Um determinado receptor acoplado à proteína G como o canabinoide pode gerar uma gama diversificada de respostas de sinalização, ressaltando a relevância fisiológica e clínica dessa classe de proteínas^{20,21}. É importante salientar que o papel farmacodinâmico é independente da afinidade do ligante ao receptor. Por exemplo, é possível ter agonistas completos com ligação fraca e agonistas parciais com forte afinidade.

A mudança conformacional gerada pela união ligante-receptor origina uma alteração na orientação relativa das porções transmembrana 3 (TM3) e 6 (TM6), o que leva à exposição de pontos de ligação do complexo de proteína G previamente escondidos na face intracelular^{22,23}. O complexo de proteína G heterotrimérico é específico para determinado tipo de GPCR, o qual uma vez ativado leva a inibição ou ativação de diversas enzimas efetoras ou canais iônicos.

A compreensão da estrutura molecular dos receptores canabinoides tem aumentado com os recentes estudos de cristalização dos mesmos²⁴⁻²⁹. Até o momento, apenas o conjunto receptor-ligante canabinoide sintético foi cristalizado¹². As estruturas dos receptores humanos CB1 e CB2 compartilham uma similaridade em aminoácidos de aproximadamente 44% e uma homologia de 68% em re-

lação às hélices transmembranas (TM)^{5,30}. Foi mostrado que o local de ligação ao receptor canabinoide situa-se na bicamada lipídica da membrana, com a atuação no receptor através da inserção lateral do ligante, ao invés da ação efetuada diretamente a partir da face externa, pela solução^{12,31}. As principais diferenças entre ambos os receptores residem nas sequências da segunda alça N-terminal extracelular, da hélice TM7 C-terminal e na terminação C intracelular propriamente dita^{29,32}. Essas diferenças estruturais são justamente as que conferem a preferência por determinado ligante.

O receptor CB1 é encontrado preferencialmente no sistema nervoso central (SNC), sendo mais expresso na terminação pré-sináptica de axônios em diversas estruturas (amígdala, hipocampo, córtex, cerebelo e circuitaria dos gânglios da base)^{12,33-35}, estando fortemente associado a neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos³⁴. Sua ativação leva em última análise ao aumento da atividade de canais iônicos de potássio e cálcio, o que leva a crer que sua atuação seja a de modulação da liberação neurotransmissora de uma forma dependente¹². Apesar da predominância no SNC, o receptor CB1 também é encontrado no sistema nervoso periférico (SNP), principalmente nas fibras simpáticas³⁶ e nos nociceptores, notadamente nos gânglios das raízes dorsais e trigeminal e nas terminações nervosas periféricas dérmicas, onde atuam regulando a aferência nociceptiva³⁷⁻³⁹.

Por sua vez, o receptor CB2 está fortemente relacionado ao sistema imunológico, com sua ativação sendo associada a mecanismos de defesa neuronal e redução da inflamação⁴⁰. Receptores CB2 são expressos principalmente no SNC, em células do sistema imune, astrócitos e microglia⁴⁰. Além de sua presença como receptor de membrana nessas localizações, descreveu-se a presença intracelular do receptor CB2 em neurônios piramidais de córtex pré-frontal no modelo murino, exercendo modulação da excitabilidade neuronal através de canais de Cl^- ativados por Ca^{2+} ^{41,42}, reforçando que apesar de seu domínio de expressão dar-se na periferia, o CB2R também tem um papel em funções neurológicas como nocicepção, drogadição e neuroinflamação^{43,44}. Apesar de sua presença no SNC ser até 200 vezes menos frequente que o receptor CB1, verifica-se o aumento na transcrição de seu receptor em situações de insulto neurológico como dor crônica, acidente vascular cerebral (AVC) e neuroinflamação^{45,46}.

Como mencionado, a atividade de ambos os receptores, CB1 e CB2, está intimamente ligada à ativação específica das subunidades de proteína G. Classicamente, ambos os receptores levam à supressão da adenilato ciclase (AC) através de sinalização via $G_{i/o}$, o que resulta em redução nos níveis de AMP cíclico (cAMP)^{9,33,35,47}. Porém, como recentemente mostrado por um estudo²⁵, a diferença em apenas um resíduo da segunda alça intracelular (L222 no CB1 e P139 no CB2) pode levar à diversidade de acoplamento entre o receptor canabinoide e a família de proteínas G, com o CB2 adotando uma especificidade apenas para G_i (conferida pela presença do padrão P138-P139 na ICL2, singular ao CB2)²⁴, enquanto o CB1 pode variar entre G_i , G_s e G_q . Com isso, tem-se a explicação para determinados achados experimentais, nos quais, sob determinadas circunstâncias (como, por exemplo, quando ocorre ativação dopaminérgica concomitante em culturas de neurônios estriatais), houve um estímulo da AC pela subunidade G_s após ativação do CB1, levando a aumento no cAMP⁴⁸. A essa já complexa trama, soma-se o fato de existirem também múltiplas possibilidades de associação

entre CB1 (através da subunidade $G_{\beta\gamma}$) e isoformas da AC, gerando predomínio da estimulação (isoformas 2, 4 e 7) versus inibição (1, 3, 5, 6 e 8)^{9,49}.

Além dos ligantes ortostéricos, há entre os receptores da família GPCR uma característica de modulação que os permitem ampliar o espectro de possibilidades de estado conformacionais e, portanto, de ativação das vias de sinalização intracelular: a interação com ligantes alostéricos. Os sítios de ligação alostéricos são aqueles presentes na macromolécula do receptor, espacialmente distintos e não sobrepostos ao sítio dito ortostérico, mas conformacionalmente ligados a ele⁵⁰. Os moduladores alostéricos, ao se ligarem ao receptor na ausência do ligante ortostérico, podem estimular ou inibir a atividade basal desse receptor, o que foi denominado *alo-agonismo* e *alo-antagonismo*, respectivamente. Já na presença do ligante ortostérico, a modulação alostérica pode alterar a afinidade de ligação do primeiro bem como a sua eficiência na sinalização intracelular⁵¹.

Três características tornam esses moduladores especialmente interessantes e potencialmente mais eficazes que a ligação ortostérica: especificidade, seletividade e saturabilidade^{30,52-54}. A especificidade é conferida pela maior frequência de variação na sequência de aminoácidos que compõem o sítio de ligação alostérica (em comparação com a relativa conservação na sequência do domínio ortostérico) e é tida como a característica mais importante⁵².

A seletividade na ação do órgão-alvo é outro aspecto relevante, no qual enquanto o ligante ortostérico afeta, na maioria das vezes, as cascatas de sinalização do receptor em todos os tecidos em que ele ocorrer, a modulação alostérica ocorre majoritariamente apenas no tecido onde o ligante endógeno fora expressado em resposta a determinado estímulo⁵³. Por fim, a saturabilidade confere um efeito teto, não se esperando modulação adicional além de certa concentração limiar do ligante alostérico, protegendo-se de sobredose⁵⁵. Tais características, aliadas ao fato de que drogas de uso clínico, atuantes no SCE e baseadas primariamente na atuação ortostérica dos ligantes, como Dronabinol[®] e Cesamet[®], geram efeitos adversos consideráveis (principalmente de ordem psicoafetiva), têm tornado o estudo de moduladores alostéricos dos receptores canabinoides uma alternativa para a aplicação terapêutica⁵².

Dentro do SCE, alguns ligantes têm sido descritos como possuindo atividade modulatória alostérica. A lipoxina-4 (LXA4), um derivado oxigenado do AA, parece atuar como um modulador positivo do receptor CB1, ao fortalecer a afinidade e a atividade da anandamida⁵⁶. De forma análoga, o colesterol e, possivelmente, outros derivados esteroides endógenos como a pregnenolona têm sido verificados em modelos experimentais como possuindo atividade modulatória^{25,57}. Alguns outros moduladores alostéricos endógenos parecem apresentar função positiva (PAM, da sigla inglesa) para o receptor CB2 e função negativa (NAM) para o receptor CB1. É o caso dos pepcans (outrora hemopressinas, peptídeos canabinoides endógenos)^{58,59}.

O SCE, porém, aparenta uma complexidade muito maior que a dicotomizada por esses dois receptores. Alguns autores têm dividido os receptores que se ligam a canabinoides endógenos em três categorias⁶⁰: 1) receptores com sítio de ligação extracelular, representados majoritariamente pelos GPCR (como os já citados CB1 e CB2); 2) receptores com sítio de ligação EC intracelular como os da família de receptores de potencial transitórios (TRP da sigla inglesa) e

3) fatores de transcrição, como os receptores nucleares ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR).

Além dos GPCR já estudados, CB1 e CB2, cabe ressaltar que outros receptores demonstraram ter ativação após ligação com canabinoides. Postula-se que o receptor órfão GPR55 seja um receptor canabinoide, com autores já propondo sua denominação como "CB3"^{33,61,62}. A via de sinalização desse receptor envolve múltiplos segundos mensageiros, que em última análise levam ao aumento do Ca²⁺ intracelular. Curiosamente, o 2-AG exerce uma potência até 200 vezes maior como agonista do GPR55 em comparação à sua ligação com os receptores protótipos (CB1 e CB2)^{33,62}. Entretanto, esses achados não são unânimes, com alguns autores não reproduzindo o que foi encontrado anteriormente, falhando em demonstrar os EC como ativadores do GPR55^{61,63}. Assim, uma caracterização mais completa desse receptor, com relação a sua distribuição tecidual, localização subcelular, padrão temporal de expressão e às vias de sinalização intracelular, é necessária para levar a um maior entendimento do SCE. Outro receptor órfão que também tem sido elencado como possível receptor canabinoide no trato gastrointestinal é o GPR119⁶⁴.

Tem-se acumulado robusta evidência sobre a interação entre os canabinoides e os canais iônicos receptores de potencial transitórios^{33,60,65}. A superfamília de receptores TRP contém atualmente 28 canais conhecidos em mamíferos, subdivididos em seis subfamílias⁶⁶. Dentre eles, seis canais (TRPV1-4, TRPA1 e TRPM8) têm sido mostrados como possuindo ligação com substâncias canabinoides (sintéticas, vegetais e endocanabinoides), pelo que vêm sendo denominados *receptores canabinoides ionotrópicos*⁶⁵. Esses receptores nada mais são que verdadeiros poros transmembrana, formados por tetrâmeros (homo- ou heteromerizados). Cada subunidade tetramérica contém seis hélices transmembrana (S1-S6) que, quando unidas, formam um canal iônico capaz de regular a entrada de diversos cátions em resposta a um estímulo⁶⁷. Quando se refinou a atuação dos EC nesses receptores, até o momento, apenas o TRPV1, o TRPV4 e o TRPA1 mostraram ativação consistente por ligantes endógenos⁶⁵. A anandamida possui afinidade similar à capsaicina na ligação ao TRPV1, porém com efeito menos potente⁶⁸.

Em 2003, um estudo mostrou ativação do TRPV4 pelos EC protótipos anandamida e 2-AG, sendo seguido por outros estudos sobre a atuação de lipídios endógenos como N-acil triptofano e N-acil tirosina^{69,70}. Quanto ao TRPA1, a anandamida obteve uma ação agonista altamente eficaz, cerca de 59% maior que o seu agonista protótipo, o óleo de mostarda; o TRPA1 também foi ativado pelo 2-AG⁷¹. Por sua vez, o TRPM8 parece sofrer ação antagonista pela anandamida⁷². Devido à forte presença desses receptores (como TRPV1 e TRPA1) nos gânglios das raízes dorsais nociceptores, ao conhecimento funcional e clínico da ativação destes e ao efeito analgésico gerado, como o da aplicação de capsaicina tópica por exemplo, é que se tem buscado o desenvolvimento de drogas canabinoides para aplicação no enfrentamento da dor crônica.

Como mecanismo de ação, foi proposto que a modulação desses receptores pelos canabinoides leva à despolarização imediata do neurônio, seguida subsequentemente pela dessensibilização desses canais iônicos, os quais ficarão em um estado silenciado, insensíveis à atuação de seus ligantes ou do estímulo térmico, que precipitariam um estímulo nociceptivo³³. Por fim, os PPAR são uma família de

receptores hormonais nucleares heterodiméricos, com três isoformas atualmente descritas (α , γ e δ), que, após ativadas, ligam-se a uma determinada sequência do DNA (regiões chamadas *elementos de resposta ao PPAR*), levando a alterações na transcrição de determinados genes⁷³. Esses genes-alvo estão elencados na regulação do metabolismo, na homeostase, na diferenciação celular e na inflamação⁷⁴⁻⁷⁶.

Desde os anos 2000, estudos têm mostrado que substâncias canabinoides, dentre elas os EC, se ligam e ativam tais receptores⁷⁷. A oleiletanolamida (OEA) e a palmitoiletanolamida (PEA) ativam o PPAR α , enquanto a anandamida e o 2-AG também parecem apresentar atividade, apesar de que com menor evidência, na isoforma α e, de forma mais consistente, na isoforma γ ⁷⁸. A ativação desses receptores pela PEA parece exercer função de analgesia *in vivo*, como foi observado em modelos animais de comportamento nociceptivo, seja testando a inibição do PPAR α através de um antagonista, seja em modelos de nocaute⁷⁹⁻⁸¹. Porém, ainda resta elucidar a participação individual desses receptores na analgesia, uma vez que alguns autores encontraram efeitos que envolvem múltiplos receptores. Um estudo, por exemplo, identificou que os efeitos analgésicos da PEA na dor neuropática envolviam os receptores CB1, TRPV1 e PPAR γ , mas não sua isoforma α ou o CB2R⁸².

A MAQUINARIA RESPONSÁVEL PELO PROCESSAMENTO DOS ENDOCANABINOIDES E SUAS RELAÇÕES DENTRO DO SISTEMA CANABINOIDE ENDÓGENO

Os EC são moléculas lipídicas de sinalização compreendidas em dois grandes grupos: as N-aciletanolaminas (NAE) e os monoacilgliceróis (MAG)¹¹. Como citado, os dois EC mais estudados até o momento são a anandamida e o 2-AG, apresentando características farmacológicas distintas. Enquanto a anandamida parece se comportar como um agonista parcial de alta afinidade do receptor CB1, sendo quase inativa no CB2, o 2-AG atua como agonista completo em ambos, porém com afinidade baixa a moderada^{9,10,83}. Ambos são produzidos sob demanda, porém a síntese, o transporte e a inativação ocorrem de forma diferente de acordo com o tecido alvo⁹. Os níveis basais do 2-AG chegam a ser mil vezes maiores que os da anandamida no cérebro. Estudos experimentais que manipularam o metabolismo do 2-AG (o mesmo não ocorrendo com a anandamida) exerceram efeitos marcantes sobre a sinalização retrógrada endocanabinoide. Assim, chegou-se a um consenso de que o 2-AG é o ligante endógeno primário dos receptores canabinoides no SNC^{9-11,84,85}.

Como dito, os EC são produzidos sob demanda, devendo-se ter em mente que eles têm meia-vida curta (aproximadamente 15 minutos) e que enzimas metabólicas e moléculas transportadoras são responsáveis pela sua entrega ao receptor alvo na concentração exata e precisa⁶⁰. A redundância é uma marca do sistema de biossíntese e degradação dos endocanabinoides, com várias vias – inclusive aquelas que são responsáveis pela síntese de outras NAE e MAG – resultando na produção de anandamida e 2-AG^{86,87}. Duas enzimas, no entanto, se destacam: a anandamida possui como forma precursora a N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE), sintetizada pela enzima NAPE-específica fosfolipase D (NAPE-PLD)^{9,88}; por sua vez, o 2-AG é produzido a partir do diacilglicerol (DAG), pelas DAG lipases (DAGL) α ou β – com estudos evidenciando que praticamente todo o 2-AG

envolvido na transmissão sináptica no cérebro adulto seja formado pela DAGL α ^{9,85}. Porém, a etapa limitante na produção de ambos é a formação de NAPE e DAG, que são convertidos a partir da fosfatidiletanolamina pela N-aciltransferase, e dos fosfoinosítídeos pela fosfolipase C, respectivamente^{9,85,88}.

Após sintetizados e liberados no citosol, os EC são incapazes de se difundir livremente como outros neurotransmissores, devido à sua natureza hidrofóbica. Assim, diversos mecanismos como ligação com certas proteínas carreadoras, bem como endocitose através do uso de “jangadas lipídicas” (do inglês, *lipid rafts/caveolae*) têm sido estudados e propostos como forma de transporte da anandamida e do 2-AG, sendo este último menos elucidado, mas provavelmente compartilhando o sistema utilizado pela primeira⁹. Proteínas do choque térmico (HSP) 70, albumina, proteínas ligantes dos ácidos graxos (FABP) 5 e 7 e a própria albumina têm sido elencadas⁸⁹⁻⁹¹. Quanto ao transporte no meio extracelular, mais detidamente na fenda sináptica, parece ocorrer em microvesículas, ao invés do transporte ocorrer através de uma ligação com proteínas transportadoras^{92,93}.

O SCE, como já foi salientado, atua primariamente como supressor da atividade sináptica, independentemente da natureza da sinapse ou da duração da transmissão^{89,94}. Na maioria das vezes, a sinalização retrógrada endocanabinoide inicia-se com a produção de 2-AG, em resposta ao aumento do Ca^{2+} intracelular ou de receptores ligados à unidade $G_{q/11}$, no neurônio pós-sináptico. Ocorre, então, o transporte pela fenda sináptica e a ligação do EC ao CB1R, localizado na membrana pré-sináptica. Por sua vez, o CB1R ativado suprime a liberação de neurotransmissores por dois mecanismos principais: 1) inibindo canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, diminuindo assim o influxo do cátion sinalizador pré-sináptico; 2) pela inibição da AC e a subsequente via do cAMP/PKA, que está envolvida na depressão de longa duração (LTD)^{89,94,95}.

A anandamida também atua de forma retrógrada, porém via múltiplos mecanismos, sendo o principal através dos receptores TRPV1⁹⁶. A localização das enzimas sintetizadoras dos EC tem papel crucial nesse contexto e parece estar associada aos sítios lipídicos dentro da membrana plasmática, chamados de “jangadas” ou *rafts*. A maquinaria enzimática responsável pela produção do 2-AG, por exemplo, parece se concentrar nesses microdomínios⁹⁷. Tais *rafts* atuam ainda de forma efetiva na recaptção da AEA, bem como na reciclagem de seus metabólitos, o AA e a etanolamina, que são encontrados de forma concentrada nessas porções da membrana.

A anandamida é metabolizada primariamente pelo amido hidrolase de ácido graxo (FAAH, do inglês), localizado principalmente no retículo endoplasmático do neurônio pós-sináptico^{98,99}. Essa enzima também cataboliza outras N-aciletanolaminas, como PEA e OEA, as quais apesar de terem pouca atividade biológica sobre os receptores CB1 e CB2, podem elevar os níveis da AEA de forma indireta, ao competir como substrato para a FAAH^{100,101}. Como metabólitos de degradação da anandamida, restam os mencionados AA e etanolamina. Por sua vez, o 2-AG é catabolizado em AA e glicerol pela lipase monoacilglicerol (MGL ou MAGL, a depender do texto em língua inglesa), presente no neurônio pré-sináptico^{102,103}. Múltiplas outras enzimas também estão elencadas, como a própria FAAH^{104,105} e as enzimas da superfamília de hidrolases α/β , como as ABHD2¹⁰⁶, 4⁶⁰, 6¹⁰⁷, e 12¹⁰⁸. Os EC também podem sofrer oxidação pelas en-

zimas da cascata do AA, como a ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e por diversas lipoxigenases (LOXs)¹⁰⁹, com seus subprodutos oxidativos possuindo suas próprias atividades biológicas no SCE, distintas dos EC que os geraram¹¹⁰.

Como pode-se perceber, a compreensão do metabolismo lipídico é fundamental para o completo entendimento do SCE. Mais importante ainda é lembrar que há uma elevada diversidade nas membranas lipídicas dos eucariotas¹¹¹ e que grande parte das enzimas pertencentes ao SCE são proteínas ligadas à membrana. Suas atividades e disponibilidades na membrana podem ser afetadas pelos diferentes lipídeos na vizinhança. No caso da FAAH, por exemplo, demonstrou-se que o colesterol presente na membrana é responsável por estabilizar uma forma dimérica da enzima, além de modular sua localização em nível subcelular (ou seja, nas membranas organelares) bem como incrementar sua atividade catalítica, o que em última análise afeta até onde se dá a propagação da sinalização EC em nível intracelular e conseqüentemente seu término¹¹².

De forma análoga, tem-se ganhado relevância o estudo da composição das cadeias acilas das membranas plasmáticas, demonstrando-se que o comprimento e o grau de saturação das cadeias são cruciais para os processos de tráfego intra e transmembrana, e degradação enzimática¹¹³. Assim, apesar de a MAGL poder hidrolisar diversos monoacilgliceróis – todos contendo o mesmo polo glicerol que o 2-AG, mas com cadeias acilas distintas – é o comprimento e a saturação de suas cadeias que definirão a velocidade da taxa de hidrólise, sendo até 2x mais rápida para o 2-AG (cadeia mais longa e polinsaturada) em relação ao seu congêneres 2-PG (2-palmitoilglicerol, cadeia mais curta e saturada)¹¹³.

De forma interessante, recentemente mostrou-se que a atividade da ABHD2 é dependente da progesterona no esperma, no qual o 2-AG age como um inibidor endógeno de um canal catiônico conhecido como CatSper. Na presença do referido hormônio, essa enzima hidrolisa o 2-AG e leva à abertura dos canais CatSper, hiperativando e tornando o esperma fértil em última análise¹⁰⁶. O achado de que o nível de 2-AG é controlado pelo estímulo de sua degradação é de grande relevância, uma vez que lança questões sobre o dogma atual da “produção sob demanda” do SCE, ou seja, que os EC são produzidos apenas através do controle de sua biossíntese, de forma estímulo-dependente, a partir de precursores fosfolípidos. Ao menos no sêmen, o 2-AG é “hidrolisado sob demanda” a partir de um pool preexistente¹⁰⁶ e, finalmente, ajustado pelo hormônio esteroide.

Esses exemplos vêm mostrar a complexidade do SCE, uma vez que o mesmo receptor canabinoide (p. ex. CB1) ou enzima metabólica (p. ex. FAAH), dentro de uma mesma célula, porém sob diferentes condições lipídicas, podem culminar em sinalizações EC distintas e levar a diferentes comportamentos biológicos⁶⁰.

CONCLUSÃO

Os componentes do SCE são amplamente expressos em diferentes tecidos e compõem um sistema de sinalização lipídica, exercendo um papel-chave na regulação de diversos processos fisiológicos como metabolismo, humor, apetite, controle cardiovascular, função motora, do sistema imune, de neurotransmissão e de nocicepção. A compreensão de seus elementos e um melhor entendimento da ultraestrutura dos receptores e enzimas contribuirá de forma decisiva

para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas que não se resumem apenas à ação direta do CB1R, por exemplo. Das seis enzimas envolvidas na metabolização do 2-AG, por exemplo, apenas a estrutura da MAGL é conhecida. A partir da descrição pormenorizada da maquinaria responsável pela metabolização lipídica endocanabinoide, será possível destravar o potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (como analgésicos sem os efeitos adversos CB1 mediados) e sua translação para a prática clínica.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Tiago Marques Avelar

Coleta de Dados, Conceitualização, Redação - Preparação do Original

Leonardo Rafael Takahashi

Redação - Revisão e Edição

José Oswaldo de Oliveira Junior

Conceitualização, Redação - Revisão e Edição, Supervisão

REFERÊNCIAS

- Mechoulam R. The Pharmacohistory of Cannabis Sativa. In: *Cannabinoids as Therapeutic Agents*. Chapman and Hall/CRC; 1986.
- Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol*. 2006;147(Suppl 1):S163-71.
- Mechoulam R, Gaoni Y. The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett*. 1967;12:1109-11.
- Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988;34(5):605-13.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365(6441):61-5.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992 Dec 18;258(5090):1946-9.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;215(1):89-97.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995;50(1):83-90.
- Zou S, Kumar U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3):833.
- Di Marzo V, De Petrocellis L. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012;367(1607):3216-28.
- Woodhams SG, Sagar DR, Burston JJ, Chapman V. The role of the endocannabinoid system in pain. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;227:119-43.
- Shahbazi F, Grandi V, Banerjee A, Trant JF. Cannabinoids and cannabinoid receptors: the story so far. *iScience*. 2020;23(7):101301.
- Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, Gloriam DE. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(12):829-42.
- Weis WI, Kobilka BK. The molecular basis of G protein-coupled receptor activation. *Annu Rev Biochem*. 2018;87(1):897-919.
- Latorraca NR, Venkatakrishnan AJ, Dror RO. GPCR dynamics: structures in motion. *Chem Rev*. 2017;117(1):139-55.
- Bond RA, Leff P, Johnson TD, Milano CA, Rockman HA, McMinn TR, Apparsundaram S, Hyek MF, Kenakin TP, Allen LF, et al. Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the beta 2-adrenoceptor. *Nature*. 1995;374(6519):272-6.
- Vilardaga J-P, Steinmeyer R, Harms GS, Lohse MJ. Molecular basis of inverse agonism in a G protein-coupled receptor. *Nat Chem Biol*. 2005;1(1):25-8.
- Yu Y, Li L, Nguyen DT, Mustafa SM, Moore BM, Jiang J. Inverse agonism of cannabinoid receptor type 2 confers anti-inflammatory and neuroprotective effects following status epilepticus. *Mol Neurobiol*. 2020;57(6):2830-45.
- Mewes T, Dutz S, Ravens U, Jakobs KH. Activation of calcium currents in cardiac myocytes by empty beta-adrenoceptors. *Circulation*. 1993;88(6):2916-22.
- Kuznetsov AS, Zamaletdinov MF, Bershatsky YV, Urban AS, Bocharova OV, Benasroune A, et al. Dimeric states of transmembrane domains of insulin and IGF-1R receptors: structures and possible role in activation. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2020;1862(11):183417.
- Mafi A, Kim S-K, Iii WAG. The G protein-first activation mechanism of opioid receptors by Gi protein and agonists. *QRB Discov* 2 E9. 2021;14.
- Nakanishi J, Takarada T, Yunoki S, Kikuchi Y, Maeda M. FRET-based monitoring of conformational change of the beta2 adrenergic receptor in living cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343(4):1191-6.
- Jensen AD, Guarneri F, Rasmussen Søren GF, Asmar F, Ballesteros JA, Gether U. Agonist-induced conformational changes at the cytoplasmic side of transmembrane segment 6 in the beta2 adrenergic receptor mapped by site-selective fluorescent labeling*. *J Biol Chem*. 2001;276(12):9279-90.
- Xing C, Zhuang Y, Xu TH, Feng Z, Zhou XE, Chen M, Wang L, Meng X, Xue Y, Wang J, Liu H, McGuire TF, Zhao G, Melcher K, Zhang C, Xu HE, Xie XQ. Cryo-EM structure of the human cannabinoid receptor CB2-Gi signaling complex. *Cell*. 2020 Feb 20;180(4):645-54.e13.
- Hua T, Li X, Wu L, Iliopoulos-Tsoutsouvas C, Wang Y, Wu M, Shen L, Brust CA, Nikas SP, Song F, Song X, Yuan S, Sun Q, Wu Y, Jiang S, Grim TW, Benchama O, Stahl EL, Zvonok N, Zhao S, Bohn LM, Makriyannis A, Liu ZJ. Activation and signaling mechanism revealed by cannabinoid receptor-Gi complex structures. *Cell*. 2020;180(4):655-65.e18.
- Li X, Hua T, Vemuri K, Ho JH, Wu Y, Wu L, Popov P, Benchama O, Zvonok N, Locke K, Qu L, Han GW, Iyer MR, Cinar R, Coffey NJ, Wang J, Wu M, Katritch V, Zhao S, Kunos G, Bohn LM, Makriyannis A, Stevens RC, Liu ZJ. Crystal structure of the human cannabinoid receptor CB2. *Cell*. 2019;176(3):459-67.e13.
- Krishna Kumar K, Shalev-Benami M, Robertson MJ, Hu H, Banister SD, Hollingsworth SA, Latorraca NR, Kato HE, Hilger D, Maeda S, Weis WI, Farrens DL, Dror RO, Malhotra SV, Kobilka BK, Skiniotis G. Structure of a signaling cannabinoid receptor 1-G protein complex. *Cell*. 2019;176(3):448-58.e12.
- Hua T, Vemuri K, Nikas SP, Laprairie RB, Wu Y, Qu L, Pu M, Korde A, Jiang S, Ho JH, Han GW, Ding K, Li X, Liu H, Hanson MA, Zhao S, Bohn LM, Makriyannis A, Stevens RC, Liu ZJ. Crystal structures of agonist-bound human cannabinoid receptor CB1. *Nature*. 2017;547(7664):468-71.
- Shao Z, Yin J, Chapman K, Grzemska M, Clark L, Wang J, Rosenbaum DM. High-resolution crystal structure of the human CB1 cannabinoid receptor. *Nature*. 2016;540(7634):602-6.
- Hryhorowicz S, Kaczmarek-Ryś M, Andrzejewska A, Staszak K, Hryhorowicz M, Korcz A, Słomski R. Allosteric modulation of cannabinoid receptor 1-current challenges and future opportunities. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):5874.
- Patricia HR. Endocannabinoid binding to the cannabinoid receptors: what is known and what remains unknown. *Curr Med Chem*. 2010;17(14):1468-86.
- Montero C, Campillo NE, Goya P, Páez JA. Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study. *Eur J Med Chem*. 2005;40(1):75-83.
- Amin MR, Ali DW. Pharmacology of medical cannabis. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1162:151-65.
- Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ. The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol*. 2003;2(5):291-8.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*. 2002;54(2):161-202.
- Tam J, Trembovler V, Di Marzo V, Petrosino S, Leo G, Alexandrovich A, Regev E, Casap N, Shteyer A, Ledent C, Karsak M, Zimmer A, Mechoulam R, Yirmiya R, Shohami E, Bab I. The cannabinoid CB1 receptor regulates bone formation by modulating adrenergic signaling. *FASEB J*. 2008;22(1):285-94.
- Veress G, Meszar Z, Muszil D, Avelino A, Matesz K, Mackie K, Nagy I. Characterisation of cannabinoid 1 receptor expression in the perikarya, and peripheral and spinal processes of primary sensory neurons. *Brain Struct Funct*. 2013;218(3):733-50.
- Clapper JR, Moreno-Sanz G, Russo R, Guizarro A, Vacondio F, Duranti A, Tontini A, Sanchini S, Sciolino NR, Spradley JM, Hohmann AG, Calignano A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat Neurosci*. 2010;13(10):1265-70.
- Price TJ, Helesic G, Parghi D, Hargreaves KM, Flores CM. The neuronal distribution of cannabinoid receptor type 1 in the trigeminal ganglion of the rat. *Neuroscience*. 2003;120(1):155-62.
- Mackie K. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J Neuroendocrinol*. 2008;20(s1):10-4.
- Brailoiu GC, Deliu E, Marcu J, Hoffman NE, Console-Bram L, Zhao P, Madesh M, Abood ME, Brailoiu E. Differential activation of intracellular versus plasmalemmal CB2 cannabinoid receptors. *Biochemistry*. 2014;53(30):4990-9.
- den Boon FS, Chameau P, Schaafsma-Zhao Q, van Aken W, Bari M, Oddi S, Kruse CG, Maccarrone M, Wadman WJ, Werkman TR. Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(9):3534-9.
- Dhopeshwarkar A, Mackie K. CB2 Cannabinoid receptors as a therapeutic target-what does the future hold? *Mol Pharmacol*. 2014;86(4):430-7.
- Atwood BK, Mackie K. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol*. 2010;160(3):467-79.
- Jordan CJ, Xi ZX. Progress in brain cannabinoid CB2 receptor research: from genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019;98:208-20.
- Yu SJ, Reiner D, Shen H, Wu KJ, Liu Q-R, Wang Y. Time-dependent protection of CB2 Receptor agonist in stroke. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132487.

47. Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabinol. *Br J Pharmacol.* 2008;153(2):199-215.
48. Glass M, Felder CC. 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 Off J Soc Neurosci.* 1997;17(14):5327-33.
49. Rhee MH, Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z. Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem.* 1998;71(4):1525-34.
50. Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2003;55(4):597-606.
51. May LT, Leach K, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric modulation of G Protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47(1):1-51.
52. Dopart R, Lu D, Lichtman AH, Kendall DA. Allosteric modulators of cannabinoid receptor 1: developing compounds for improved specificity. *Drug Metab Rev.* 2018;50(1):3-13.
53. Preevy VR, organizador. *Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment.* 1st ed. London: Academic Press; 2017. 1170p.
54. Janero DR, Thakur GA. Leveraging allosterity to improve G protein-coupled receptor (GPCR)-directed therapeutics: cannabinoid receptor 1 as discovery target. *Expert Opin Drug Discov.* 2016;11(12):1223-37.
55. Roth BL, Irwin JJ, Shoichet BK. Discovery of new GPCR ligands to illuminate new biology. *Nat Chem Biol.* 2017;13(11):1143-51.
56. Pamplona FA, Ferreira J, Menezes de Lima O Jr, Duarte FS, Bento AF, Forner S, Villarinho JG, Bellocchio L, Wotjak CT, Lerner R, Monory K, Lutz B, Canetti C, Matias I, Calixto JB, Marsicano G, Guimarães MZ, Takahashi RN. Anti-inflammatory lipoxin A4 is an endogenous allosteric enhancer of CB1 cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(51):21134-9. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;22;110(4):1561.
57. Vallée M, Vitiello S, Bellocchio L, Hébert-Chatelain E, Monlezun S, Martin-Garcia E, Kasanez F, Baillie GL, Panin F, Cathala A, Roullot-Lacarrière V, Fabre S, Hurst DP, Lynch DL, Shore DM, Deroche-Gamonet V, Spampinato U, Revest JM, Maldonado R, Reggio PH, Ross RA, Marsicano G, Piazza PV. Pregnenolone can protect the brain from cannabis intoxication. *Science.* 2014;343(6166):94-8.
58. Petrucci V, Chicca A, Glasmacher S, Paloczi J, Cao Z, Pacher P, Gertsch J. Pcpn-12 (RVD-hemopressin) is a CB2 receptor positive allosteric modulator constitutively secreted by adrenals and in liver upon tissue damage. *Sci Rep.* 2017;7(1):9560.
59. Gomes I, Grushko JS, Golebiewska U, Hoogendoorn S, Gupta A, Heimann AS, Ferro ES, Scarlata S, Fricker LD, Devi LA. Novel endogenous peptide agonists of cannabinoid receptors. *FASEB J.* 2009;23(9):3020-9.
60. Maccarrone M. Missing pieces to the endocannabinoid puzzle. *Trends Mol Med.* 2020;26(3):263-72.
61. Yang H, Zhou J, Lehmann C. GPR55 - a putative "type 3" cannabinoid receptor in inflammation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2016;27(3):297-302.
62. Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol.* 2007;152(7):1092-101.
63. Sharif H, Abood ME. Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacol Ther.* 2010;126(3):301-13.
64. Izzo AA, Sharkey KA. Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. *Pharmacol Ther.* 2010;126(1):21-38.
65. Muller C, Morales P, Reggio PH. Cannabinoid ligands targeting TRP channels. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:487.
66. Winter Z, Buhala A, Ötvös F, Jósavay K, Vizler C, Dombi G, Szakonyi G, Oláh Z. Functionally important amino acid residues in the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel - an overview of the current mutational data. *Mol Pain.* 2013;9:30.
67. Levine JD, Alessandri-Haber N. TRP channels: Targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(8):989-1003.
68. Maksim VS, Alexander VZ. TRP Channels as novel targets for endogenous ligands: focus on endocannabinoids and nociceptive signalling. *Curr Neuropharmacol.* 2018;16(2):137-50.
69. Raboune S, Stuart JM, Leishman E, Takacs SM, Rhodes B, Basnet A, Jameyfield E, McHugh D, Widlanski T, Bradshaw HB. Novel endogenous N-acyl amides activate TRPV1-4 receptors, BV-2 microglia, and are regulated in brain in an acute model of inflammation. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:195.
70. Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature.* 2003;424(6947):434-8.
71. Redmond WJ, Gu L, Camo M, McIntyre P, Connor M. Ligand determinants of fatty acid activation of the pronociceptive ion channel TRPA1. *Peer J.* 2014;2:e248.
72. De Petrocellis L, Starowicz K, Moriello AS, Vivese M, Orlando P, Di Marzo V. Regulation of transient receptor potential channels of melastatin type 8 (TRPM8): Effect of cAMP, cannabinoid CB1 receptors and endovanilloids. *Exp Cell Res.* 2007;313(9):1911-20.
73. Alexander SP, Cidlowski JA, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, Davies JA; CGTP Collaborators. The Concise Guide to pharmacology 2015/16: nuclear hormone receptors. *Br J Pharmacol.* 2015;172(24):5956-78.
74. Friedland SN, Leong A, Filion KB, Genest J, Lega IC, Mottillo S, Poirier P, Reoch J, Eisenberg MJ. The cardiovascular effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Am J Med.* 2012;125(2):126-33.
75. Menendez-Gutierrez MP, Roszer T, Ricote M. Biology and therapeutic applications of peroxisome proliferator-activated receptors. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(6):548-84.
76. Neher MD, Weckbach S, Huber-Lang MS, Stahel PF. New insights into the role of peroxisome proliferator-activated receptors in regulating the inflammatory response after tissue injury. *PPAR Res.* 2012;2012:728461.
77. O'Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol.* 2007;152(5):576-82.
78. O'Sullivan SE. An update on PPAR activation by cannabinoids. *Br J Pharmacol.* 2016;173(12):1899-910.
79. LoVerme J, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci.* 2005;77(14):1685-98.
80. de Novellis V, Luongo L, Guida F, Cristino L, Palazzo E, Russo R, Marabese I, D'Agostino G, Calignano A, Rossi F, Di Marzo V, Maione S. Effects of intra-ventrolateral periaqueductal grey palmitoylethanolamide on thermoceptive threshold and rostral ventromedial medulla cell activity. *Eur J Pharmacol.* 2012;676(1-3):41-50.
81. Sasso O, Russo R, Vitiello S, Raso GM, D'Agostino G, Iacono A, La Rana G, Vallée M, Cuzzocrea S, Piazza PV, Meli R, Calignano A. Implication of allopregnanolone in the antinociceptive effect of N-palmitoylethanolamide in acute or persistent pain. *Pain.* 2012;153(1):33-41.
82. Costa B, Comelli F, Bettoni I, Colleoni M, Giagnoni G. The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB(1), TRPV1 and PPARgamma receptors and neurotrophic factors. *Pain.* 2008;139(3):541-50.
83. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev.* 2010;62(4):588-631.
84. Katona I, Freund TF. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med.* 2008;14(9):923-30.
85. Murataeva N, Straiker A, Mackie K. Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br J Pharmacol.* 2014;171(6):1379-91.
86. Di Marzo V. New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(9):623-39.
87. Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* 2020;16(1):9-29.
88. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):389-462.
89. Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev.* 2009;89(1):309-80.
90. Kaczocha M, Glaser ST, Deutsch DG. Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(15):6375-80.
91. Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, D'Agostino A, Catanzaro G, De Simone C, Rapino C, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M. Molecular Identification of Albumin and Hsp70 as Cytosolic Anandamide-Binding Proteins. *Chem Biol.* 2009;16(6):624-32.
92. Gabrielli M, Battista N, Riganti L, Prada I, Antonucci F, Cantone L, Matteoli M, Maccarrone M, Verderio C. Active endocannabinoids are secreted on extracellular membrane vesicles. *EMBO Rep.* 2015;16(2):213-20.
93. Nakamura Y, Dryanovski DI, Kimura Y, Jackson SN, Woods AS, Yasui Y, Tsai SY, Patel S, Covey DP, Su TP, Lupica CR. Cocaine-induced endocannabinoid signaling mediated by sigma-1 receptors and extracellular vesicle secretion. *Elife.* 2019 Oct 9;8:e47209.
94. Castillo PE, Younts TJ, Chávez AE, Hashimoto Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron.* 2012;76(1):70-81.
95. Ohno-Shosaku T, Kano M. Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol.* 2014;29:1-8.
96. Maccarrone M, Rossi S, Bari M, De Chiara V, Fezza F, Musella A, Gasperi V, Prospertti C, Bernardi G, Finazzi-Agrò A, Cravatt BF, Centonze D. Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nat Neurosci.* 2008 Feb;11(2):152-9.
97. Placzek EA, Okamoto Y, Ueda N, Barker EL. Membrane microdomains and metabolic pathways that define anandamide and 2-arachidonoyl glycerol biosynthesis and breakdown. *Neuropharmacology.* 2008;55(7):1095-104.
98. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.* 1996;384(6604):83-7.
99. Di Marzo V. Endocannabinoids: synthesis and degradation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2008;160:1-24.
100. Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Tiger G, Fowler CJ. Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *Br J Pharmacol.* 2001;133(8):1263-75.
101. Finn DP, Haroutounian S, Hohmann AG, Krane E, Soliman N, Rice ASC. Cannabinoids, the endocannabinoid system, and pain: a review of preclinical studies. *Pain.* 2021;162(Suppl 1):S5-25.

102. Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10819-24.
103. Ueda N, Tsuboi K, Uyama T, Ohnishi T. Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Bio Factors Oxf Engl*. 2011;37(1):1-7.
104. Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H, Yamamoto S. Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett*. 1998;422(1):69-73.
105. Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol*. 2007;14(12):1347-56.
106. Miller MR, Mallowetz N, Iavarone AT, Safavi R, Gracheva EO, Smith JF, Hill RZ, Bautista DM, Kirichok Y, Lishko PV. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science*. 2016;352(6285):555-9.
107. Marrs WR, Blankman JL, Horne EA, Thomazeau A, Lin YH, Coy J, Bodor AL, Muccioli GG, Hu SS, Woodruff G, Fung S, Lafourcade M, Alexander JP, Long JZ, Li W, Xu C, Möller T, Mackie K, Manzoni OJ, Cravatt BF, Stella N. The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat Neurosci*. 2010;13(8):951-7.
108. Navia-Paldanius D, Savinainen JR, Laitinen JT. Biochemical and pharmacological characterization of human α/β -hydrolase domain containing 6 (ABHD6) and 12 (ABHD12). *J Lipid Res*. 2012;53(11):2413-24.
109. Rouzer CA, Marnett LJ. Endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochromes P450: cross-talk between the eicosanoid and endocannabinoid signaling pathways. *Chem Rev*. 2011;111(10):5899-921.
110. Fezza F, Bari M, Florio R, Talamonti E, Feole M, Maccarrone M. Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Molecules*. 2014;19(11):17078-106.
111. Harayama T, Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(5):281-96.
112. Dainese E, De Fabritiis G, Sabatucci A, Oddi S, Angelucci CB, Di Pancrazio C, Giorgino T, Stanley N, Del Carlo M, Cravatt BF, Maccarrone M. Membrane lipids are key modulators of the endocannabinoid-hydrolase FAAH. *Biochem J*. 2014;457(3):463-72.
113. Vanni S, Riccardi L, Palermo G, De Vivo M. Structure and dynamics of the acyl chains in the membrane trafficking and enzymatic processing of lipids. *Acc Chem Res*. 2019;52(11):3087-96.