ALISON RIBEIRO

Efeitos da Anandamida sobre a esfera neuroimune de camundongos: avaliação comportamental, endócrina e de parâmetros da atividade imune adquirida

São Paulo
2007

ALISON RIBEIRO

Efeitos da Anandamida sobre a esfera neuroimune de camundongos: avaliação comportamental, endócrina e de parâmetros da atividade imune adquirida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. João Palermo-Neto

São Paulo
2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1901
FMVZ

Ribeiro, Alison
Efeitos da Anandamida sobre a esfera neuroimune de camundongos: avaliação comportamental, endócrina e de parâmetros da atividade imune adquirida / Alison Ribeiro. -- São Paulo: A. Ribeiro, 2007.
124 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo-Neto.

1. Neuroimunomodulação. 2. Anandamida. 3. Ansiedade. 4. Glicocorticóides. 5. Imunidade celular. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da anandamida (AEA) sobre o comportamento e a atividade de linfócitos de camundongos", protocolado sob o nº911/2006, utilizando 180 (cento e oitenta) camundongos, sob a responsabilidade da Prof. Dr. João Palermo Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 14/06/06".

(We certify that the Research "Effects of anandamide (AEA) on the behavior and lymphocyte activity in mice", protocol number 911/2006, utilizing 180 (one hundred and eighty) mice, under the responsibility of Prof. Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 06/14/2006).

São Paulo, 19 de junho de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87 – 05508-270 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". Fax: (11) 3032-2224 – fones: (11) 309107676/7671 – e-mail: fmvz@edu.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RIBEIRO, Alison

Título: Efeitos da Anandamida sobre a esfera neuroimune de camundongos: Avaliação comportamental, endócrina e de parâmetros da atividade imune adquirida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências

Data: ___/___/___

Banca examinadora

Prof. Dr._____ Instituição_____

Assinatura_____ Julgamento_____

Prof. Dr._____ Instituição_____

Assinatura_____ Julgamento_____

Prof. Dr._____ Instituição_____

Assinatura_____ Julgamento_____

A meus pais José Carlos e Ivone e ao meu irmão Cleber, primeiramente pelo amor, pelo carinho e pelo apoio incondicional, pois acreditaram que eu estava escolhendo o meu melhor caminho.

Ao Prof. João Palermo Neto por ter aceitado me orientar na realização desse trabalho e, assim, me proporcionar desenvolvimento intelectual.

A Viviane, minha namorada, pelo amor, carinho, dedicação e companheirismo recebido todos os dias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois somente Sua força permitiu que eu continuasse a caminhada.

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto pela orientação na realização deste trabalho e por ter contribuído grandemente com o meu desenvolvimento acadêmico.

Aos Profs. Luiz Carlos e Frederico por contribuírem no meu desenvolvimento intelectual, principalmente nas manhãs de quarta-feira.

Aos funcionários Priscila e Ricardo do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do VPT (FMVZ-USP), pois sem eles muitos dos meus experimentos não teriam sido realizados.

Aos funcionários do Biotério Cláudia, Herculano, Sr. Luiz, Nelsinho, Rosiris e Idalina, por fornecerem e cuidarem dos animais utilizados nos experimentos.

A todos os outros funcionários do VPT que mesmo não contribuindo com a realização do trabalho, são peças importantes da locomotiva que movimenta o departamento.

A Priscila do Laboratório de Dosagens Hormonais do VRA (FMVZ-USP), pelas dosagens de corticosterona.

Aos colegas da pós-graduação que contribuíram intelectualmente e nos experimentos realizados neste trabalho: Viviane, Milena, Andréia, Mônica e Wanderley.

A todos os colegas da pós-graduação pela convivência e, também, por ter certeza que muitos torceram por mim.

A Viviane, minha namorada, por ter dedicado horas e horas do seu tempo me ajudando nos experimentos, nas dúvidas, nas discussões e no término deste

trabalho. Além disso, agradeço pelo amor, carinho, dedicação, companheirismo e por ter permanecido ao meu lado nos momento alegres e difíceis.

A Droga Raia por me proporcionar qualidade de vida permitindo minha transferência a uma loja mais próxima do VPT e de casa. Agradeço adicionalmente aos amigos e colegas que trabalham comigo na loja.

Ao Rodrigo (secretário do Prof. João) por ajudar nos processos burocráticos e pela ótima convivência.

Aos meus amigos da graduação, em especial Leila, Débora e Alexandre por sempre me apoiarem na escolha da carreira acadêmica.

A Luciana Vismari pela amizade, por acreditar em mim, por me apresentar ao Prof. João e por não permitir que eu deixasse a pós-graduação antes mesmo de começá-la.

Aos amigos que fiz no VPT Cleber, Daniel Cohn, Denise, Domenica, Felipe, Fred, Maria Isabel, Milena, Mônica, Renato, Ricardo e Wanderley.

“The mind has great influence over the body, and maladies often have their origin there.”

Molière (1622-1673)

RESUMO

RIBEIRO, A. **Efeitos da Anandamida sobre a esfera neuroimune de camundongos**: avaliação comportamental, endócrina e de parâmetros da atividade imune adquirida. [Anandamide effects on neuroimmune interactions in mice: Behavioral, endocrine, and parameters of adaptative immune activity evaluation]. 2007. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A neuroimunomodulação é um ramo da ciência que estuda as inter-relações existentes entre o SNC e o SI. O termo inter-relações foi empregado porque, sabe-se hoje serem estas relações bidirecionais. Conhecendo-se a existência desta comunicação, não é difícil de se supor que substâncias que atuem no sistema neuro-endócrino tenham a capacidade de influenciar as respostas imunes seja por uma ação neuroimune indireta ou por outra que se faça diretamente nas células imunes. Os canabinóides (endógenos, derivados da planta e sintéticos) apresentam um amplo espectro de ações, dentre as quais cabe destacar aquelas sobre o comportamento (ansiedade e medo), o sistema neuro-endócrino (ativação do eixo HHA) e imune (resposta imune inata e adquirida). Estes efeitos são geralmente atribuídos à ligação dos canabinóides a receptores específicos presentes no SNC (receptores CB1) e na periferia (receptores CB2). Neste sentido, buscamos neste trabalho avaliar os efeitos da Anandamida (AEA), uma agonista canabinóide endógeno, sobre o comportamento, a ativação do eixo HHA e alguns parâmetros de atividade imune adquirida, e o fizemos à luz de mecanismos neuroimunomodulatórios. Nossos resultados mostraram que os efeitos da AEA sobre o comportamento são dependentes da dose e, também, do tempo de latência para as observações. Neste sentido, 10 minutos após a administração de doses crescentes de AEA observou-se, tanto no campo aberto como no LCE, um efeito que seguiu um padrão de curva em U invertido dependente da dose. Nossos resultados mostraram, também, que a AEA na dose de 0,1mg/kg administrada 90 minutos antes das observações, aumentou o tempo gasto pelos animais em movimento na zona periférica e diminui o tempo gasto em movimento na zona central do campo aberto. Mostrou-se, ainda, que a AEA na dose de 0,1mg/kg aumentou acentuadamente os níveis séricos de corticosterona nos animais medidos 45 e 90 minutos após a administração. Finalmente, mostrou-se que uma dose de 0,1mg/kg de AEA previamente a uma imunização com OVA promoveu um aumento da reposta de

hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) e um aumento na porcentagem de proliferação de células T CD4+. Estes resultados em seu conjunto permitem sugerir que a AEA (0,1mg/kg) administrada 90 minutos antes das observações tenha se comportado como um estressor químico, promovendo efeito semelhante ao de ansiogênicos no campo aberto e aumentando os níveis séricos de corticosterona; esses níveis aumentados de corticosterona teriam sido os responsáveis pelo aumento da resposta imune celular (Th1) observada.

Palavras-chave: Neuroimunomodulação. Anandamida. Ansiedade. Glicocorticóides. Imunidade celular.

ABSTRACT

RIBEIRO, A. **Anandamide effects on neuroimmune interactions in mice:** Behavioral, endocrine, and parameters of adaptative immune activity evaluation. [Efeitos da Anandamida sobre a esfera neuroimune de camundongos: Avaliação comportamental, endócrina e de parâmetros da atividade imune adquirida]. 2007. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Neuroimmunomodulation is a field of research concerned with the relationships between the CNS and the IS. The term relationship is frequently employed because it is assumed that such communication is bidirectional. In this regard, if we consider that this communication exists, it should be accetable that substances acting on the neuroendocrine system are able of modifying immune responses, either acting via a neuroimmune indirect pathway, or acting directly on immune cells. Cannabinoids (endogenous, plant derived, and synthetic) show a large spectrum of actions over the body. We emphasize here, behavioral (anxiety and fear), endocrine (HPA axis activation), and immune (innate and adaptative immunity) effects. These effects are generally attributed to cannabinoid bind to specific receptors present on CNS (CB1 receptors) and in the periphery (CB2 receptors). In this sense, we evaluated Anandamide (AEA, an endogenous cannabinoid agonist) effects, on behavior, HPA axis activation, and parameters of adaptative immunity, particularly neuroimmune relationships. Briefly, our results show that the AEA effects on behavior are dependent on the dose and time. Thus, 10 minutes after injection of growing increasing doses of AEA, we found in the open field and plus maze an inverted U-shape dose-response for AEA which is characteristic of cannabinoids in this type of behavioral evaluation. Additionally we show, that AEA 0,1mg/kg after 90 minutes of administration increased the time spent in the peripheral zone, and decreased the time spent in the central zone of the open field. Furthermore, we found that AEA 0.1mg/kg strongly increased the serum levels of corticosterone after 45 and 90 minutes of administration. Finally, we show that AEA 0.1mg/kg prior to immunization promoted an increase of delayed-type hypersensitivity (DTH) and an increase in the percentage of CD4+ T cell proliferation. These results allow us to suggest that AEA 0.1mg/kg 90 minutes after administration acted as a chemical stressor, promoting an anxiogenic-like effect in the open field, and increasing the serum levels of corticosterone. Additionally, the increased levels of corticosterone at the moment of

antigenic exposition could be responsible for the increased cell-mediated immunity (Th1) observed.

Key words: Neuroimmunomodulation. Anandamide. Anxiety. Glucocorticoids. Cell-mediated immunity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração de como se imaginava ser a interação neuroimune em meados dos anos 70 (Adaptada de BESEDOVSKY; SORKIN, 1977)...24

Figura 2 - Via de síntese e de degradação da AEA e do 2-AG (Adaptada de HASHIMOTODANI; OHNO-SHOSAKU; KANO, 2007).....34

Figura 3 - Etho Vision® - (Vídeo Tracking Motion & Behavior Recognition System Versão 2.3). 1- Câmera filmadora acoplada ao computador, 2-Campo Aberto para camundongo, 3-Imagem digitalizada representada em pixels e 4-Monitor de vídeo.....51

Figura 4 – Campo aberto para camundongos 53

Figura 5 – Labirinto em cruz elevado para camundongos 56

Figura 6 – (A) Citograma da população de células (G1) encontradas na co-cultura de células aderentes e não aderentes do baço. (B) Citograma correspondente a G1 de células não aderentes marcadas com CFSE (FL1) e marcadas com anti-CD4 (acima) e anti-CD19 (abaixo). (C) Fluorescência FL1 correspondente às células com dupla marcação: CFSE+CD4 (acima) e CFSE+CD19 (abaixo) para determinação da porcentagem de proliferação de cada fenótipo.....62

Figura 7 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 em camundongos C57BL/6 sobre a locomoção total e nas zonas periférica e central no campo aberto. ** p<0,01 em relação ao grupo veículo-1; # p<0,001 em relação ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo.....66

Figura 8 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 em camundongos C57BL/6 sobre o tempo de locomoção total e nas zonas periférica e central no campo aberto. * p<0,05 em relação ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo.....67

Figura 9 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 sobre **(A)** velocidade média, **(B)** freqüência de levantar e **(C)** número de *grooming* de camundongos C57BL/6 observados no campo aberto. * p<0,05 em relação ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo.....68

Figura 10 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 em camundongos C57BL/6 sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos **(A)** e nos braços fechados **(B)** do labirinto em cruz elevado.* p<0,05 em relação ao grupo veículo-1, # p<0,01 em relação ao grupo veículo-1, dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo.....70

Figura 11 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 em camundongos C57BL/6 sobre a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos **(A)** e nos braços fechados **(B)** do labirinto em cruz elevado.* p<0,05 em relação ao grupo veículo-1, # p<0,01 em relação ao grupo veículo-1, dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo 70

Figura 12 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 e 1.0 mg/kg) diluída no veículo-1 sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos C57BL/6 10, 45 e 90 minutos após a administração. # p<0,001 em relação ao grupo salina, *p<0,01 em relação ao grupo veículo-1, **p<0.001 em relação ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo..... 73

Figura 13 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-1 sobre o aumento do tamanho da pata de camundongos C57BL/6 no teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH). p>0,05 em relação ao grupo salina e ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo 75

Figura 14 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-1 sobre a proliferação de células não aderentes do baço de camundongos C57BL/6 submetidos ao teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH). *p<0,05 em relação ao grupo salina, # p<0,001 em relação ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo..... 77

Figura 15 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-2 sobre o aumento do tamanho da pata de camundongos C57BL/6 no teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH). **p<0,001 em relação ao grupo veículo-2 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo 82

Figura 16 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-2 sobre a proliferação de células não aderentes do baço de camundongos C57BL/6 submetidos ao teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH). *p<0,01 em relação ao grupo salina e ao grupo veículo-2 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo 84

Figura 17 – Efeitos da administração aguda de AEA 0,1 mg/kg diluída no veículo-2 sobre a atividade locomotora de camundongos C57BL/6 observados no campo aberto. * p<0,05 em relação ao grupo salina, ** p<0,01 em relação ao grupo salina; dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações n=9 animais/grupo..... 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 sobre a atividade locomotora de camundongos C57BL/6 observados no campo aberto 66
Tabela 2 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 sobre a velocidade média, freqüência de levantar e o número de *grooming* de camundongos C57BL/6 observados no campo aberto 68
Tabela 3 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 sobre a porcentagem de entradas e a porcentagem de tempo de permanência de camundongos C57BL/6 nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado 69
Tabela 4 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 e 1.0 mg/kg) diluída no veículo-1 sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos C57BL/6 aos 10, 45 e 90 minutos após a administração 72
Tabela 5 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-1 sobre o aumento do tamanho da pata de camundongos C57BL/6 no teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) 75
Tabela 6 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-1 sobre a proliferação de células não aderentes do baço de camundongos C57BL/6 submetidos ao teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH).....77
Tabela 7 - Efeitos da administração aguda de 0.1 mg/kg de AEA diluída no veículo-1 sobre o perfil de citocinas na co-cultura de células aderentes e não aderentes do baço de camundongos C57BL/6 submetidos ao teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) 79
Tabela 8 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-2 sobre o aumento do tamanho da pata de camundongos C57BL/6 no teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) 81
Tabela 9 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-2 sobre a proliferação de células não aderentes do baço de camundongos C57BL/6 submetidos ao teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH).....84
Tabela 10- Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-2 sobre o perfil de citocinas na co-cultura de células aderentes e não aderentes do baço de camundongos C57BL/6 submetidos ao teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) 86
Tabela 11 - Efeitos da administração aguda de AEA 0,1 mg/kg diluída no veículo-2 sobre a atividade locomotora de camundongos C57BL/6 observados no campo aberto 88
Tabela 12 - Efeitos da administração aguda de AEA 0,1 mg/kg diluída no veículo-2 sobre a velocidade média, freqüência de levantar e o número de *grooming* de camundongos C57BL/6 observados no campo aberto 89
Tabela 13 - Efeitos da administração aguda de AEA 0,1 mg/kg diluída no veículo-2 sobre a porcentagem de entradas e a porcentagem de tempo de permanência de camundongos C57BL/6 nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado 90

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG	–	2-araquidonilglicerol
ACTH	–	Hormônio adenocorticotrópico
ADR	–	Adrenalina
AEA	–	Anandamida
APC	–	Célula apresentadora de antígeno
CA	–	Campo aberto
CRH	–	Hormônio liberador da corticotropina
DSE	–	Excitação induzida por despolarização
DSI	–	Inibição induzida por despolarização
DTH	–	Hipersensibilidade do tipo tardia
FAAH	–	*Fatty acid amide hydrolise*
GABA	–	Ácido γ-amino butírico
HHA	–	Hipotálamo-hipófise-adrenal
LCE	–	Labirinto em cruz elevado
Lp	–	*Legionella pneumophila*
LPS	–	Lipopolissacarídeo
MGL	–	Monoacilglicerol lípase
NA	–	Noradrenalina
OVA	–	Ovalbumina
PTX	–	Toxina Pertussis
PVN	–	Núcleo paraventricular
SI	–	Sistema Imune
SNA	–	Sistema nervoso autônomo
SNC	–	Sistema nervoso central
SNP	–	Sistema nervoso parasimpático
SNS	–	Sistema nervoso simpático
THC	–	Tetrahidrocanabinol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

2 REVISÃO DE LITERATURA 22
2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO 22
2.2 SISTEMA ENDOCANABINÓIDE 31
2.3 EFEITO DOS CANABINÓIDES SOBRE O COMPORTAMENTO, O SISTEMA NEUROENDÓCRINO E A IMUNIDADE 36

3 OBJETIVOS 45
3.1 OBJETIVO GERAL 45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 45

4 MATERIAIS E MÉTODOS 47
4.1 ANIMAIS 47
4.2 FÁRMACO 48
4.3 REAGENTES E SOLUÇÕES 49
4.4 REGISTRO COMPORTAMENTAL 50
4.4.1 Medida da Atividade Geral no Campo Aberto 52
4.4.2 Avaliação do Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado 54
4.5 DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA 56
4.5.1 Coleta de Sangue para Obtenção do Soro 56
4.5.2 Dosagem de Corticosterona 57
4.5.3 Curva Padrão 58
4.5.4 Soro Controle 58
4.6 ESTABELECIMENTO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA 59
4.7 CITOMETRIA DE FLUXO 59
4.7.1 Avaliação da Atividade Proliferativa de Linfócitos 60
4.8 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA 62
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA 63

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS 64
5.1 EXPERIMENTO 1 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM DOSES CRESCENTES DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-1 SOBRE O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS AVALIADOS 10 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO 64
5.2 EXPERIMENTO 2 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 E 1,0 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-1 SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA DE CAMUNDONGOS TOMADOS 10, 45 e 90 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO 71
5.3 EXPERIMENTO 3 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-1 SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA (DTH) 74
5.4 EXPERIMENTO 4 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-1 SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS ANTÍGENO-ESPECÍFICA 76
5.5 EXPERIMENTO 5 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-1 SOBRE O PERFIL DE

CITOCINAS PRODUZIDAS NA CO-CULTURA DE CÉLULAS ADERENTES E NÃO-ADERENTES DO BAÇO 78
5.6 EXPERIMENTO 6 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-2 SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA (DTH) 80
5.7 EXPERIMENTO 7 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-2 SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS ANTÍGENO-ESPECÍFICA 83
5.8 EXPERIMENTO 8 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-2 SOBRE O PERFIL DE CITOCINAS PRODUZIDAS NA CO-CULTURA DE CÉLULAS ADERENTES E NÃO-ADERENTES DO BAÇO 85
5.9 EXPERIMENTO 9 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-2 SOBRE O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS AVALIADOS 90 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO 87

6 DISCUSSÃO 91

7 CONCLUSÃO 106
7.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS 106
7.2 CONCLUSÃO GERAL 109

REFERÊNCIAS 110

1 INTRODUÇÃO

A evolução dos conhecimentos sobre neuroimunomodulação conceituada, atualmente, como a área que estuda as inter-relações existentes entre o SNC e o SI. O termo inter-relações foi aqui empregado por saber-se, hoje, serem estas relações bidirecionais. Neste sentido, as primeiras constatações da comunicação entre os dois super-sistemas foram demonstradas de forma pioneira por Selye (1936); ele mostrou que o estresse causava profundas alterações no tamanho do timo, baço e dos linfonodos (modulação SNC $\Rightarrow$ SI). Mais adiante, Wexler, Dolgin e Tryczynski (1957) mostraram ocorrência de uma ativação do eixo HHA após a administração de endotoxina bacteriana (modulação SI $\Leftarrow$ SNC).

Neste contexto, sabendo-se da existência de uma comunicação bidirecional entre o SNC e o SI, não é difícil de se supor que substâncias que atuem no sistema neuro-endócrino tenham a capacidade de influenciar as respostas imunes. De fato, substâncias com ação no SNC, como por exemplo, canabinóides, cocaína, anfetamina, *ecstasy*, heroína, opiáceos e benzodiazepínicos podem prejudicar muitos aspectos imunológicos, atuando indiretamente por via neuroimune ou diretamente nas células imunes.

O Sistema Endocanabinóide, responsável pela resposta aos canabinóides, foi envolvido com a regulação de uma série de processos fisiológicos, em especial com aqueles ligados aos estados comportamentais, a atividade neuro-endócrina e a resposta imune. De fato, analisaram-se muitos aspectos da ação dos canabinóides (endógenos ou derivados da planta ou sintéticos) sobre o comportamento (ansiedade e medo), sobre a ativação do eixo HHA e sobre a modificação da resposta imune inata ou adquirida. No entanto, desde a descoberta do sistema

endocanabinóide tem havido uma tendência a uma visão setorizada das abordagens experimentais que se fazem dos efeitos dessas substâncias, seja no SNC ou no SI.

Sendo a AEA o principal canabinóide endógeno e levando-se em conta as evidências de que suas ações alteram tanto funções nervosas como imunes, pareceu-nos relevante avaliar, dentro de uma perspectiva neuroimune, alguns aspectos ligados aos efeitos da AEA sobre o comportamento, o sistema endócrino e alguns parâmetros da atividade imune adquirida de camundongos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO

Evidências convergentes dos campos da psicologia, neurobiologia e imunologia têm demonstrado que o sistema imune não é regulado de maneira exclusivamente autônoma, mas que é influenciado por fatores internos ou externos direcionados pelo sistema nervoso central (SNC) (MADDEN; FELTEN, 1995; QUAN; BANKS, 2007). Em contrapartida, o sistema imune (SI), através da secreção de produtos como, por exemplo, de interleucinas, prostaglandinas e imunoglobulinas, modula a atividade do SNC (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; GOEHLER; LYTE; GAYKEMA, 2007). Embora de conhecimento amplo, foi somente nas últimas décadas que se começou a dar maior importância científica ao estudo das interações neuroimunes, já que até então prevalecia uma tendência de setorização das abordagens experimentais que se faziam, quer no SNC quer no SI (CONTI, 2000; BESEDOVSKY; DEL REY, 2007).

A neuroimunomodulação foi conceituada, inicialmente, como a área de estudo que avaliava as influências exercidas pelo sistema nervoso sobre a resposta imune (REICHLIN, 1993). No entanto, graças à evolução dos conhecimentos sobre o assunto ela é, atualmente definida como a área que estuda as inter-relações existentes entre o SNC e o SI. O termo inter-relações foi empregado porque, como

dito acima, sabe-se hoje serem estas relações bidirecionais (MADDEN; FELTEN, 1995; ALVES; PALERMO-NETO, 2007[1]).

Destaque-se, a esse respeito, que as primeiras constatações da comunicação entre os dois super-sistemas foram demonstradas de forma pioneira por Selye (1936); ele mostrou que o estresse causava alterações no tamanho do timo, do baço e dos linfonodos (modulação SNC $\Rightarrow$ SI). Mais adiante, Wexler, Dolgin e Tryczynski (1957) mostraram ocorrência de uma ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) após a administração de endotoxina bacteriana (modulação SI $\Rightarrow$ SNC).

Besedovsky et al. (1977) sugeriram, mais adiante, que a imunoregulação não seria totalmente autônoma e que haveria uma interação imuno-neuroendócrina que, provavelmente, seria bidirecional. De fato, esses autores mostraram um aumento superior a 100% nos disparos dos neurônios da porção ventromedial do hipotálamo após uma estimulação antigênica. Foram, também, Besedovsky et al. (1986) que confirmaram a hipótese relativa à interação bidirecional entre os sistemas neuroendócrino e imune. Mostraram neste trabalho que a produção de algumas citocinas por células imunes, tais como Interleucina (IL)-1, era inibida pelos glicocorticóides, *in vivo* e *in vitro*. Também mostraram que os níveis séricos de glicocorticóides eram aumentados por fatores liberados por leucócitos humanos (citocinas) e que esta atividade era neutralizada pelo uso de um anticorpo anti-IL-1. A figura 1 adaptada do trabalho de Besedovsky e Sorkin (1977) ilustra como se imaginava ser a comunicação bidirecional entre os sistemas neuroencócrino e imune. É interessante observar o pioneirismo da informação divulgada com a imaginação deste modelo e, também, a semelhança dele com os modelos propostos atualmente para descrever a ocorrência dessa interação bidirecional.

---

[1] ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmunomodulation: the croos-talk between nervous and immune systems. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, Agosto n. 6 [Epub ahead of print], 2007.

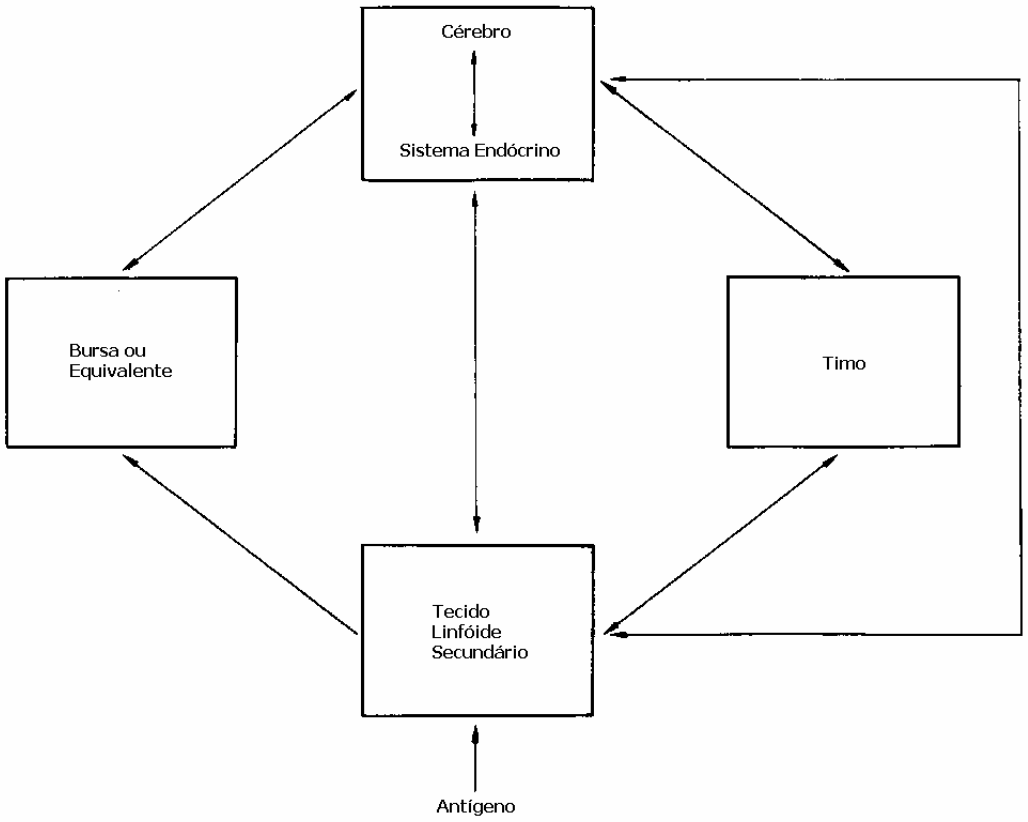

Figura 1 – Ilustração de como se imaginava ser a interação neuroimune em meados dos anos 70 (Adaptada de BESEDOVSKY; SORKIN, 1977)

Foram Blalock e Smith (1980) que primeiramente mostraram serem os leucócitos capazes de produzir um peptídeo, com características semelhantes ao liberado pela hipófise, identificado posteriormente como sendo o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). A partir deste marco, foram estabelecidas as bases moleculares para a interação entre os sistemas imune e neuroendócrino, tendo-se mostrado a expressão de receptores para hormônios, neurotransmissores e neuropeptídeos, assim como seus ligantes, em células do SI; mostrou-se, também, que citocinas produzidas por células do SNC estimulavam a comunicação neuronal (SMITHI; BLALOCK, 1988). De fato, sabe-se hoje que produtos do SI e eixo neuro-endócrino coexistem em tecidos linfóide, endócrino e neural. Hormônios, neurotransmissores e neuropeptídeos afetam o SI, assim como produtos de células

imunes, como interleucinas e prostaglandinas, afetam mecanismos neuro-endócrinos (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996).

Blalock (1984) propôs que o SI, além da sua função na defesa do organismo, teria uma função de órgão sensorial que serviria para detectar estímulos que não poderiam ser ouvidos, vistos, cheirados, degustados ou sentidos. Ele sugeriu que o SI poderia funcionar como um “Sexto Sentido” capaz de detectar e levar o organismo a responder a substâncias estranhas tais como patógenos, tumores, alérgenos. Por ter grande sensibilidade e especificidade sabe-se hoje que esse “órgão sensorial”, mobiliza o corpo a responder prontamente a esses desafios; esta capacidade sensorial tem seu fundamento nas bases moleculares propostas para a análise das interações entre os sistemas imune e neuroendócrino já que os leucócitos individualmente não estão diretamente conectados ao SNC (BLALOCK, 2005).

Neste sentido, há evidências substanciais de que produtos de células imunes afetem mecanismos neuro-endócrinos. Estudos iniciais, utilizando o sobrenadante obtido de cultura de linfócitos de roedores estimulados por mitógenos, quando injetados em ratos mostraram aumento da liberação de ACTH e de corticosterona. Posteriormente, utilizando-se interleucina (IL)-1 recombinante purificada, observou-se que esta citocina estimulava de maneira similar a liberação de ACTH e de corticosterona (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996). Demonstrou-se, também, que algumas citocinas exercem profundos efeitos sobre o comportamento. Assim, em um estudo mais recente, utilizando animais *knockout*, mostrou-se que a liberação, na periferia e/ou no SNC, de IL-1 e IL-6 induzidas por lipopolissacarídeo (LPS) tem papel central no aparecimento do comportamento doentio (BLUTHE et al., 2000). Em nossos laboratórios, utilizando-se modelos experimentais de reação alérgica intestinal foi demonstrado em camundongos um aumento de ansiedade observada

no campo aberto e no labirinto em cruz elevado e aumento na expressão de *c-Fos* no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no núcleo central da amígdala (BASSO et al., 2003). Adicionalmente, em um modelo de alergia pulmonar mostrou-se que animais que haviam sido previamente imunizados com OVA, um aumento de aversão ao lado escuro de uma caixa de esquiva passiva após associação deste lado com uma nebulização com OVA; esses animais mostraram ainda um aumento da atividade de células do núcleo ventromedial do hipotálamo e da região baso-lateral da amígdala (COSTA-PINTO et al., 2005). Mostrou-se, também, que a remoção de IgE (por depleção do anticorpo utilizando um anti-IgE) preveniu estes efeitos (COSTA-PINTO et al., 2006). Em outro trabalho, relatou-se que animais tratados no período neonatal com capsaícina (neurotoxina capaz de promover um déficit nas modalidades sensoriais eliciadas pelas fibras nervosas do tipo C), uma diminuição na expressão de *c-Fos* no núcleo do trato solitário e um bloqueio completo na expressão desta proteína no PVN, fatos que sugerem ter as fibras nervosas do tipo C um papel importante nos mecanismos ligados a estas manifestações neuroimune (BASSO et al., 2004).

No sentido oposto, o SNC regula o SI através de dois mecanismos principais: (a) uma resposta hormonal ao estresse com a conseqüente produção de glicocorticóides e (b) uma resposta do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), com a liberação de noradrenalina (Sistema Nervoso Simpático - SNS) (WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002; NANCE; SANDERS, 2007). Mais recentemente, vem sendo descrito outro mecanismo envolvendo o Sistema Nervoso Parassimpático (SNP) denominado de Via Colinérgica Antiinflamatória que controla principalmente a resposta inflamatória de forma reflexa e não consciente (TRACEY, 2002; TRACEY, 2007).

O principal regulador do efeito dos glicocorticóides sobre o SI é o eixo HHA, tendo como seus principais componentes o Núcleo Paraventricular do hipotálamo (NPV), a glândula hipófise e a glândula adrenal, que levam em última instância à liberação de glicocorticóides na circulação (WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002). Assim, por exemplo, estados de medo, ansiedade e depressão, que estão ligados a um aumento da atividade do eixo HHA, têm sido correlacionados a um déficit pronunciado de imunidade, em especial, do número de células esplênicas, da proliferação de linfócitos B, linfócitos T *helper* e T citotóxico, da atividade e número de células *natural killer* (NK) e da atividade de macrófagos (PALERMO-NETO; MASSOCO; FÁVARE, 2001; PALERMO-NETO; MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003; SÁ-ROCHA; SÁ-ROCHA; PALERMO-NETO, 2006). Os glicocorticóides naturais e sintéticos inibem a proliferação de células T estimuladas por mitógenos e por aloantígenos *in vitro* através da ligação com receptores de glicocorticóides (GR) citoplasmáticos presentes em linfócitos T e B, e em macrófagos (MADDEN; FELTEN, 1995). Por outro lado, a presença de macrófagos pode modificar as reações das células T aos glicocorticóides; neste sentido, mostrou-se que a adição de glicocorticóides inibiu a atividade de células T; no entanto, quando os macrófagos ativados e/ou seus produtos estavam presentes, preveniu-se a supressão das células T mediada pelos glicocorticóides (BRADLEY; MISHELL, 1981, MADDEN; FELTEN, 1995).

Ainda, os glicocorticóides induzem uma mudança do perfil de citocinas Th1 para um perfil de citocinas Th2. A imunidade Th1 (Imunidade Celular) é caracterizada pela expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como Interferon (IFN)-γ, IL-2 e Fator de Necrose Tumoral (TNF)-β, resultando em uma diferenciação de macrófagos, células *Natural Killer* (NK) e células T citotóxicas, que estão

envolvidas na fagocitose e destruição de bactérias invasoras ou corpos estranhos. A imunidade Th2 (Imunidade Humoral) é caracterizada pela produção de citocinas antiinflamatórias, tais como IL-4, IL-10 e IL-13, resultando na diferenciação de eosinófilos, mastócitos e células B, que leva a uma defesa a antígenos mediada por anticorpos (WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002). Neste contexto, acredita-se que a mudança de perfil de citocinas induzida pelos glicocorticóides seja conseqüência de uma regulação negativa nas citocinas Th1, assim permitindo a expressão dominante de citocinas Th2 (FRANCHIMONT et al. 2000, AGARWAL; MARSHALL, 2001). Os glicocorticóides controlam a expressão de IL-12 e/ou de seu receptor, e esta regulação parece ser o mecanismo principal pelo qual eles medeiam a mudança no perfil das citocinas (ELENKOV; CHROUSOS, 1999).

O SNS exerce grande influência sobre as funções imunes tanto na imunidade inata como na imunidade adquirida. Felten et al. (1985) publicaram os primeiros relatos a respeito da inervação catecolaminérgica do timo e do baço, e subseqüentemente de outros tecidos como linfonodos, intestino e medula óssea. Após esse trabalho pioneiro, foi que se começou a buscar pelos mecanismos neuroimunes através dos quais o SNS modulava diversos parâmetros imunológicos. Na esfera da imunidade inata, a Noradrenalina (NA) pode inibir dramaticamente a produção e secreção de TNF-α (IGNATOWSKI; GALLANT; SPLENGER, 1996). Além disso, após um estímulo estressor (choque nas patas, por exemplo) os níveis plasmáticos e esplênicos de TNF-γ de animais estimulados com Lipopolissacarídeo (LPS) foram dramaticamente suprimidos (MELTZER et al., 2004). Na esfera da imunidade adquirida, assim como os glicocorticóides, as catecolaminas podem dirigir a resposta Th2 em detrimento daquelas do tipo Th1. A NA e a Adrenalina (ADR) *ex vivo* foram capazes de inibir a produção de IL-12 e de aumentar a produção de IL-10

em uma cultura de sangue total estimulada com LPS, sendo a ligação das catecolaminas a receptores β_2-adrenérgicos responsáveis por estes efeitos tanto nas células apresentadoras de antígeno (APC) como nas células Th1 (ELENKOV et al., 1996).

Desta forma, sabendo-se da existência de uma comunicação bidirecional entre os SNC e o SI, não é difícil de se supor que substâncias que atuem no sistema neuro-endócrino tenham a capacidade de influenciar as respostas imunes. De fato, substâncias com ação no SNC, como, por exemplo, maconha, cocaína, anfetamina, *ecstasy*, heroína, opiáceos e benzodiazepínicos podem prejudicar muitos aspectos imunológicos, atuando diretamente nas células imunes ou, indiretamente, por via neuroimune (CONNOR et al., 1998; MELLON; BAYER, 1998; PELLEGRINO; BAYER, 1998; RIGHI et al., 1999; DOMINGUES-JUNIOR et al., 2000; KLEIN et al., 2000; YU et al., 2002; FRIEDMAN; NEWTON; KLEIN, 2003; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003; SILVA et al., 2003; LIGEIRO-OLIVEIRA et al., 2004).

Neste contexto, os canabinóides (endógenos, derivados da planta e sintéticos) são capazes de provocar uma série de efeitos no sistema neuro-endócrino, principalmente em respostas comportamentais relacionadas ao estresse e à ansiedade. Desta forma, um interesse crescente vem sendo dado ao estudo do sistema endocanabinóide buscando-se compreender o papel por ele desempenhado na regulação de estados de ansiedade e, em especial, no tipo de resposta emocional eliciada quando da ocorrência de eventos aversivos (VIVEROS; MARCO; FILE, 2005); destaque-se, ainda, os interessantes efeitos imunomodulatórios apresentados pelos endocanabinóides tanto na esfera da imunidade inata como da imunidade adquirida (KLEIN et al., 2003). Neste sentido, provavelmente devido à recente descoberta do sistema endocanabinóide no SNC e no SI, ainda não há

dados na literatura que correlacionem de forma efetiva e lógica os efeitos neuroimunomodulatórios desencadeados pela manipulação dos canabinóides, em especial daqueles da Anandamida (AEA) um agonista canabinóide endógeno.

Neste sentido, sendo a AEA o principal canabinóide endógeno e baseado nas evidências de que suas ações afetam tanto funções nervosas como imunes, pareceu-nos relevante abordar estes efeitos, dentro de uma perspectiva neuroimune. Desta forma, resolvemos avaliar o comportamento, a atividade do eixo HHA e alguns parâmetros da atividade imune adquirida de animais tratados com AEA.

2.2 SISTEMA ENDOCANABINÓIDE

O Sistema Endocanabinóide tem um amplo espectro de influências sobre os circuitos neuronais excitatório e inibitório, principalmente devido à larga distribuição dos receptores canabinóides (CB1) em áreas vitais do SNC. Esse sistema é conhecido por regular uma série de funções fisiológicas tais como o movimento, a memória e o aprendizado, a cognição, o apetite, a emese, a temperatura corporal, a dor, o comportamento, a secreção neuroendócrina e, também, o SI devido à presença de receptores canabinóides (CB2) em leucócitos e em tecidos linfóides.

A existência do sistema endocanabinóide começou a ser desvendada quando foi determinada e caracterizada a presença de um receptor canabinóide (CB1) no cérebro de ratos (DEVANE et al., 1988; MATSUDA et al., 1990). Então, a partir desta descoberta foi demonstrado que esses receptores estão amplamente distribuídos por todo o SNC sendo o subtipo de receptor com a maior expressão entre todos os receptores ligados à proteína G em todo o cérebro (HERKENHAM et al., 1991; MAILLEUX; VANDERHAEGHEN, 1992; GLASS; DRAGUNOW; FAULL, 1997). O receptor CB1 está distribuído em todas as regiões do SNC incluindo o neocórtex, hipocampo, cerebelo e gânglios da base, amígdala, tronco encefálico, hipotálamo e pituitária (HASHIMOTODANI; OHNO-SHOSAKU; KANO, 2007). Fora do SNC o receptor CB1 também é expresso em órgãos na periferia como coração, fígado, rins, baço, células imunes, intestino, testículos e ovários (PERTWEE, 1997). Neste sentido, devido à expressão predominante de receptor CB1 no SNC, ele é geralmente referido como o receptor canabinóide cerebral (BREIVOGEL; CHILDERS, 1998).

Foi caracterizado na periferia (macrófagos e baço) um segundo tipo de receptor canabinóide (CB2) (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). Mostrou-se que a expressão deste receptor acontece predominantemente em células do SI, como células B, células T e macrófagos, assim como no baço e no timo de camundongos (SCHATZ et al., 1997). Neste contexto, mostrou-se que as subpopulações celulares do sangue humano apresentam diferentes graus de expressão de receptores CB2, assim como segue: células B > células *Natural Killer* > monócitos > neutrófilos > células T CD8 > células T CD4 (GALIEGUE et al., 1995). Até recentemente, evidências mostravam que os receptores CB2 não eram expressos no SNC (SKAPER et al., 1996). No entanto, um estudo mais recente demonstrou que estes receptores são expressos no tronco encefálico; fato que tem levado alguns autores a sugerir estarem os receptores CB2 acoplados funcionalmente e de alguma forma aos receptores CB1 na inibição da emese (VAN SICKLE et al., 2005).

Os receptores canabinóides pertencem a uma família de receptores que têm sete domínios transmembrana e que são acoplados à proteína G, portanto, ligados à inibição da adenilato ciclase e, conseqüentemente, à inibição do acumulo de AMPc. Os efeitos que produzem são bloqueados pela ação da toxina pertussis (PTX) indicando que a proteína G que está acoplada a receptores é do tipo $G_{i/0}$. Esses receptores também estão acoplados à ativação do canal de potássio e à inibição do canal de cálcio do tipo N e do tipo Q (também sensíveis à ação da PTX) e estas ações são relevantes para o papel neuromodulador dos canabinóides na liberação de neurotransmissores (RODRÍGUES DE FONSECA et al., 2005).

A descoberta destes receptores levou, naturalmente, à procura por endocanabinóides no organismo. O primeiro endocanabinóide foi identificado no cérebro de suínos sendo ele a N-araquidoniletanolamida; verificou-se que essa

molécula deslocava a ligação específica de um agonista canabinóide do receptor canabinóide, e a ela foi dado o nome de anandamida (AEA) (DEVANE et al., 1992). A AEA é biosintetizada a partir de lipídios de membrana pela ação enzimática da N-acil transferase e pela fosfolipase D (FREUND; KATONA; PIOMELLI, 2003); ela é encontrada no cérebro, em células do SI, no plasma, em órgãos linfóides secundários como o baço e em tecido periféricos como o coração (RODRÍGUES DE FONSECA et al., 2005). Um segundo endocanabinóide, o 2-Araquidonilglicerol (2-AG) foi isolado em seqüência no intestino de cães (MECHOULAM et al., 1995). O 2-AG é, também, produzido a partir de lipídios de membrana principalmente pela ação enzimática da fosfolipase C e da diacilglicerol lípase (FREUND; KATONA; PIOMELLI, 2003), sendo, também, encontrado no cérebro, em células do SI, no plasma, em órgãos linfóides secundários como o baço e em tecido periféricos (RODRÍGUES DE FONSECA et al., 2005). Estes endocanabinóides são metabolizados por enzimas intracelulares. A AEA e o 2-AG são hidrolizados pela *fatty acid amide hydrolise* (FAAH) e pela monoacilglicerol lípase (MGL), respectivamente (HASHIMOTODANI; OHNO-SHOSAKU; KANO, 2007). A figura 2 abaixo ilustra a via de síntese e de degradação destes dois endocanabinóides.

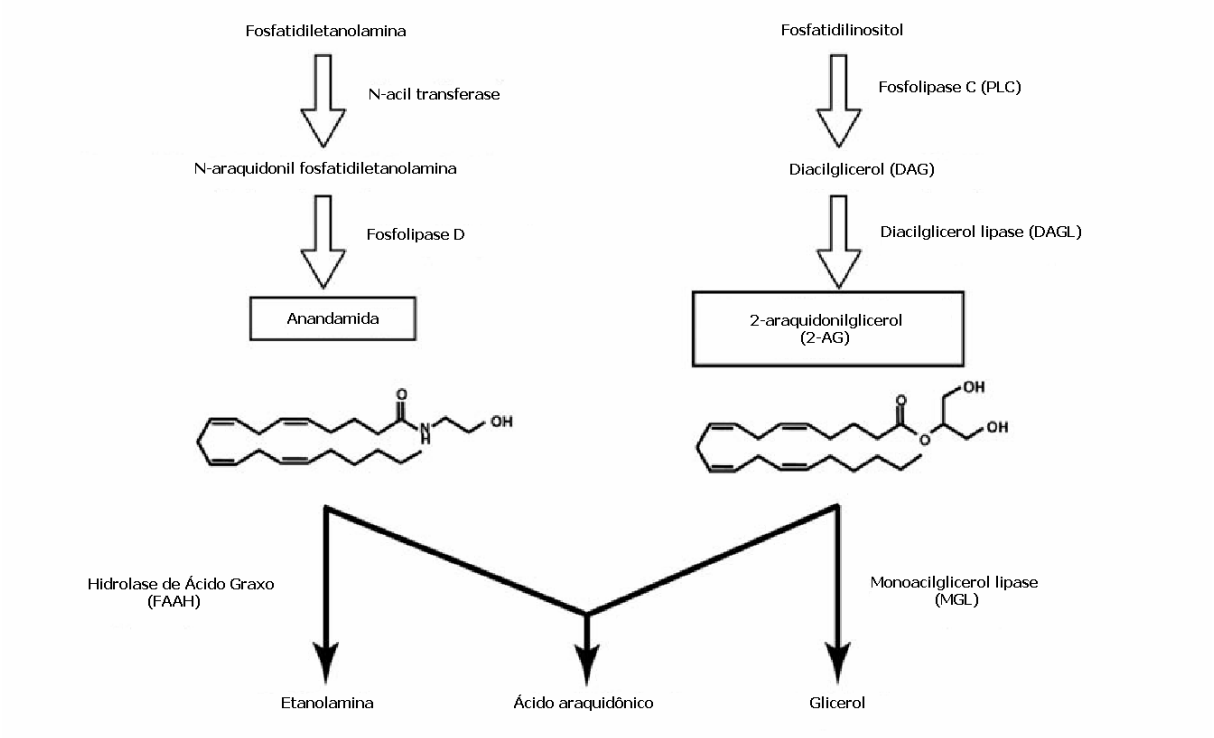

Figura 2 - Via de síntese e de degradação da AEA e do 2-AG (Adaptada de HASHIMOTODANI; OHNO-SHOSAKU; KANO, 2007)

Várias evidências têm levantado a possibilidade de um papel dos endocanabinóides como neuromoduladores; essas substâncias funcionariam como mensageiros retrógrados em sinapses no SNC (HASHIMOTODANI; OHNO-SHOSAKU; KANO, 2007). Sabe-se, a esse respeito, que os canabinóides endógenos são liberados de acordo com a demanda após a despolarização neuronal; uma vez liberados, atuam em receptores canabinóides localizados em neurônios situados ao redor do sítio de sua produção. No SNC, a distribuição altamente organizada destes elementos de sinalização nas sinapses GABAérgicas e glutamatérgicas e a sua preservação ao longo da evolução sugerem um papel fundamental dos mesmos na transmissão sináptica.

Tem sido sugerido que a inibição pré-sináptica da liberação de neurotransmissores por endocanabinóides pode adotar duas formas diferentes, dependentes do envolvimento do GABA e do glutamato, respectivamente: supressão

da inibição induzida por despolarização (DSI) e supressão da excitação induzida por despolarização (DSE). A contribuição dos endocanabinóides para estas formas de plasticidade sináptica de curta duração vem sendo descritas, principalmente, no hipocampo e no cerebelo (RODRÍGUES DE FONSECA et al., 2005).

Por outro lado, a ativação de células imunes induz um aumento na expressão tanto de receptores CB1 como CB2 presentes nas células; conseqüentemente, esses receptores estariam envolvidos com os processos de ativação. Outra evidência que suporta este conceito é a de que células imunes, principalmente macrófagos, liberam metabólitos do ácido araquidônico quando estimulados. De forma interessante, um dos metabólitos liberados é a AEA, sugerindo esse fato que células imunes ativadas respondam através da liberação de endocanabinóides. Assim, essas moléculas poderiam atuar de forma parácrina e, também, autócrina o que sugere a existência de um mecanismo imunoregulatório (KLEIN et al., 2003).

2.3 EFEITO DOS CANABINÓIDES SOBRE O COMPORTAMENTO, O SISTEMA NEUROENDÓCRINO E A IMUNIDADE

Estudos retrospectivos conduzidos em usuários de *Cannabis sativa*, pequenos *clinical trials*, além de outros proveniente de experimentos conduzidos com animais de laboratório têm mostrado um cenário complexo e geralmente contraditório para o impacto da canabis sobre o comportamento e sobre as emoções (ARÉVALO; DE MIGUEL; HERNANDEZ-TRISTAN, 2001; WACHTEL et al., 2002; TOURNIER et al., 2003). Em humanos, a droga produz uma série de efeitos que podem variar de relaxamento (sensação de bem estar) e euforia até ansiedade e ataques agudos de pânico (ZUARDI et al., 1982). Em animais de laboratório, mostrou-se que os agonistas canabinóides podem exercer tanto ações ansiolíticas como ansiogênicas dependendo da linhagem, da dose e do contexto (RODRÍGUEZ DE FONSECA et al., 1996; CHAKRABARTI; EKUTA; ONAIVI, 1998; SULCOVA; MECHOULAM, FRIDE, 1998; BERRENDERO; MALDONADO, 2002). Isto poderia ser explicado, primeiramente, pela presença de receptores canabinóides presentes em regiões do SNC que têm diferentes participações (inibitórias ou excitatórias) na regulação das emoções (FREUND; KATONA; PIOMELLI, 2003). Nesse sentido, uma segunda explicação poderia advir da localização diferencial dos receptores CB1 em áreas específicas do SNC, como o prosencéfalo, primariamente localizadas em terminais axônicos de interneurônios GABAérgicos (inibitório), onde seu efeito principal seria o de diminuir a liberação de GABA; associa-se a esse efeito um outro, devido à presença de receptores CB1 em terminais glutamatérgicos (excitatórios), cuja ativação inibiria a liberação de glutamato (FREUND; KATONA; PIOMELLI, 2003).

Assim, como resultado dessa ampla e diversificada distribuição, a ativação de receptores CB1 poderia ter conseqüências comportamentais diferentes dependendo do balanço dos seus efeitos sobre a transmissão e o tônus GABAérgico e glutamatérgico (GAETANI; CUOMO; PIOMELLI, 2003). O fato é que, mostrou-se em ratos e camundongos, que o bloqueio farmacológico ou a ablação genética de CB1 produz estados de ansiedade, o que têm sugerido a existência de um tônus intrínseco mediado pelo sistema endocanabinóide na regulação das emoções (NAVARRO et al., 1997; HALLER et al., 2002; MARTIN et al., 2002; URIGÜEN et al., 2004).

Conforme já dito, os canabinóides apresentam efeitos bifásicos sobre a atividade geral e a ansiedade em animais de laboratório: em altas doses induzem efeito inibitório/ansiogênico e em baixas doses induzem efeito estimulatório/ansiolítico (VIVEROS; MARCO; FILE, 2005). Neste sentido, a AEA em baixas doses foi capaz de aumentar a exploração e a atividade geral, fato esse constatado através da medida da quantidade de travessias e da freqüência de levantar no campo aberto (CA), e da diminuição de sinais indicativos de catalepsia e analgesia. Em altas doses, os efeitos da AEA foram exatamente opostos, observando-se uma diminuição da exploração e da atividade geral dos animais no CA e um aumento da catalepsia e da analgesia (SULCOVA; MECHOULAM; FRIDE, 1998). Em outro trabalho, a AEA nas doses de 1,0 e 10mg/kg após 10 minutos de administração, foi incapaz de produzir efeitos diferenciais no número de entradas e no tempo gasto nos braços fechados do labirinto em cruz elevado (LCE) e produziu uma tendência de redução do número de entradas e do tempo gasto por esses animais na exploração dos braços abertos desse aparelho (CHAKRABARTI; EKUTA; ONAIVI, 1998).

Em trabalhos que utilizaram agonistas canabinóides (sintéticos e derivados da planta) verificou-se que baixas doses de CP 55,940 e de Δ^9-tetrahidrocanabinol (THC) induziram um efeito ansiolítico no LCE (MARCO et al., 2004) e na caixa claro-escuro (BERRENDERO; MALDONADO, 2002). Em contrapartida, altas doses do agonista canabinóide HU-210 produziram efeitos ansiogênicos no teste de esquiva defensiva (RODRÍGUES DE FONSECA et al., 1996); mostrou-se, também, que altas doses de CP 55,940 produziram efeitos idênticos no LCE (MARCO et al., 2004).

Em contrapartida, no teste de interação social, seguido de baixas doses de CP 55,940 não se verificou efeito ansiolítico, o que teoricamente não caracterizaria um efeito bifásico entre baixas e altas doses de agonistas canabinóides (GENN et al., 2004). No entanto, esse achado não é surpreendente uma vez que se sabe serem os resultados de testes para ansiedade nesses aparelhos comparativamente diferentes e, também, o fato de que medem diferentes estados de ansiedade mediados por vias neurobiológicas também diferentes (FILE; GONZALES; ANDREWS, 1996). Isto levanta a possibilidade de que o sistema endocanabinóide possa estar envolvido em diferentes estados de ansiedade. Neste sentido, um estudo recente mostrou que a exposição ao estresse crônico aumenta a responsividade de canabinóides à ansiedade medida no LLCE; observou-se que no grupo dos animais expostos ao estresse crônico, doses tidas como ansiolíticas de canabinóides, produziram resposta ansiogênica nos animais (HILL; GORZALKA, 2004).

Há uma série de evidências que indicam serem os canabinóides capazes de induzir a ativação do eixo HHA em roedores (MALDONADO; VALVERDE, 2003). Os glicocorticóides exercem um importante papel na regulação de respostas comportamentais, cognitivas e metabólicas relacionadas ao estresse. Quando o

organismo está exposto a um estímulo estressor, a estimulação dos sistemas sensorial e límbico resulta na ativação dos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), que em última instância levam a aumento da atividade do eixo HHA e da liberação de glicocorticóides pela glândula adrenal. Em um curto espaço de tempo, a ativação do eixo HHA é benéfica para a sobrevivência do organismo; no entanto, se mantida de forma prolongada esta ativação pode desencadear efeitos deletérios sobre o metabolismo, o humor, a cognição, estando associada a uma grande variedade de doenças neuropsiquiátricas, incluindo-se aqui a depressão e a ansiedade (PATEL et al., 2004).

Os efeitos estimulatórios dos canabimiméticos sobre o eixo HHA parecem ser mediados por um aumento da liberação do hormônio liberador da corticotropina (CRH) havendo para isso uma contribuição de núcleos límbicos responsivos ao estresse (WENGER et al., 1997). Primeiramente, foi mostrado que a AEA foi capaz de estimular a atividade do eixo HHA. A AEA injetada pela via intracerebroventricular (i.c.v.), após 90 minutos, foi capaz de aumentar tanto os níveis de ACTH como de corticosterona em ratos, com uma magnitude similar à do THC (WEIDENFELD; FELDMAN; MECHOULAM, 1994). Em um trabalho mais recente a AEA injetada por via intraperitoneal (i.p.) após 90 minutos, aumentou tanto os níveis de ACTH como de corticosterona e, também a expressão de *c-FOS* no PVN. No entanto, o mais intrigante é que em animais *knockout* de receptores CB1 o aumento ocorreu com uma magnitude similar; observou-se, ainda que nos animais selvagens, o pré-tratamento com antagonistas de receptores CB1 e de receptores vanilóide (VR1) não foi capaz de prevenir estes efeitos. Estes resultados sugerem que a ativação do eixo HHA produzida pela AEA ocorra, possivelmente, via ativação de receptores

canabinóides ainda desconhecidos e presentes no PVN (WENGER; LEDENT; TRAMU, 2003).

Dado o papel do CRH e do eixo HHA na regulação das respostas relacionadas ao estresse e à ansiedade, parece haver uma relação funcional entre os efeitos do canabinóides sobre a ansiedade e aquelas que produz sobre esse eixo (VIVEROS; MARCO; FILE, 2005). Neste contexto, foi mostrado que um antagonista de CRH atenuou os efeitos ansiogênicos do agonista canabinóide HU-210 no teste de esquiva defensiva, o que indicaria uma participação do CRH na ansiedade induzida pelos canabinóides (RODRÍGUEZ DE FONSECA et al., 1996). Há evidências, ainda, de um mecanismo de inibição da liberação de hormônios hipotalâmicos, incluindo-se aqui o CRH, via liberação de endocanabinóides no PVN (DI et al., 2003). Em outro confirmou-se *in* vivo que a sinalização retrógrada dirigida pelo sistema endocanabinóide modula negativamente a ativação do eixo HHA (PATEL et al., 2004).

Há, também, evidências indicando a existência de interações funcionais entre os sistemas endocanabinóide e uma série de outros sistemas na regulação de estados de ansiedade, além daqueles que produz diretamente sobre o eixo HHA. Dentre eles, podemos citar o sistema opioidérgico (VALVERDE et al., 2001; BERRENDERO; MALDONADO, 2002; MARÍN et al., 2003), as vias GABAérgicas e colecistocininérgica (ONAIVI; GREEN; MARTÍN, 1990; BEINFELD; CONNOLLY, 2001; KATONA et al., 2001; ROTZINGER; VACCARINO, 2003) e, também, a via serotoninérgica (ARÉVALO; DE MIGUEL; HERNANDEZ-TRISTAN, 2001).

Além dos efeitos sobre o comportamento e sobre o sistema neuroendócrino, muitos estudos foram e vêm sendo desenvolvidos para testar os efeitos de canabinóides sobre uma variedade de células imunes, coletadas de humanos e de

animais. Embora algumas observações sugiram um papel para os canabinóides na imunomodulação, os mecanismos pelos quais estas substâncias induziam estes efeitos imunomodulatórios permaneceram pouco claros (CROXFORD; YAMAMURA, 2005). No entanto, a recente caracterização do sistema endocanabinóide no SI tem possibilitado uma melhor compreensão a respeito dos mecanismos destas substâncias nas células imunes (CABRAL; STAAB, 2005).

Retrospectivamente, um trabalho realizado por Nahas et al. (1974) demonstrou uma diminuição da resposta proliferativa de células T retiradas do sangue periférico de usuários de maconha; no entanto, Lau et al. (1976) não verificaram o mesmo efeito. Estudos subseqüentes mostraram supressão, induzida por vários canabinóides (THC, 11-OH-THC, canabinol, canabidiol), da proliferação de células T humanas em resposta à fitoemaglutinina (PHA) e à Concanavalina A (ConA), estando as concentrações usadas destes fármacos na faixa de μM (NAHAS et al., 1977).

Nesse sentido, foi mostrado que a AEA produziu *in vitro* uma inibição da proliferação de células T e B induzida por mitógenos (ConA e LPS) de forma dose dependente; mostrou-se que doses mais baixas de AEA, além de inibir a proliferação de células T, também levavam à fragmentação do DNA dessas células, o que indicaria indução de um mecanismo apoptótico (SCHWARZ; BLANCO; LOTZ, 1994). O THC, também *in vitro*, foi capaz de inibir a resposta proliferativa induzida por aloantígenos e o fez de uma forma dose-dependente (YUAN et al., 2002). Estudos complementares mostraram que o THC foi capaz de inibir a resposta proliferativa de linfócitos do baço induzida, *in vivo* e *in vitro*, por anti-CD3, ConA e LPS, e de induzir a apoptose de células do baço e do timo (MCKALLIP et al., 2002). A administração aguda de CP 55,940 inibiu a resposta proliferativa de linfócitos do baço induzida por

PHA; no entanto, o tratamento prolongado (6 dias) com o mesmo, aumentou a proliferação de linfócitos, sugerindo esse fato o desenvolvimento de tolerância, provavelmente devido a uma regulação negativa de receptores canabinóides presentes no baço dos ratos (PATRINI et al., 1997).

Neste contexto, vem sendo mostrado que os canabinóides têm potencial para suprimir a resposta especifica de células T e, também, para alterar o balanço de citocinas Th1 e Th2 quando administradas *in vivo* em camundongos. Mostrou-se que o THC suprimiu a imunidade celular de camundongos infectados por *Legionella pneumophila* (Lp) quando injetados antes da infecção experimental; observou-se aumento da mortalidade e das concentrações de IgG_1 para *Legionella,* enquanto que as concentrações de $IgG2_a$ diminuíram, assim como a proliferação específica de esplenócitos após Lp. Mostrou-se, ainda, uma diminuição das concentrações de IFNγ e um aumento das concentrações de IL-4, sugerindo esses fatos a ocorrência de uma diminuição da atividade Th1 (NEWTON; KLEIN; FRIEDMAN, 1994). Um estudo adicional usando este mesmo modelo mostrou que a injeção de THC suprimiu a imunidade Th1 por inibir a produção de IFN-γ e de IL-12, assim como a expressão de receptores para IL-12, provavelmente em decorrência da ativação de receptores CB1 e CB2, fatos que foram constatados pelo uso de antagonistas destes receptores. Em adição, o tratamento com o THC aumentou a expressão de citocinas produzidas por células com perfil Th2, como a IL-4 (KLEIN et al., 2000).

. Ainda não está claro, no entanto, se estes efeitos observados são devidos a uma ativação de receptores presentes no SNC, na periferia ou em ambos os locais. É possível que os efeitos centrais mediados por receptores CB1 atuem através de modificações na atividade do eixo HHA, assim afetando indiretamente a atividade de células Th em decorrência de uma mobilização de corticosterona (KLEIN et al.,

2000). Desta forma, a corticosterona seria a responsável pela diminuição da produção de IL-12 (VISSER et al., 1998). No entanto, um trabalho subseqüente mostrou que, pelo menos no modelo de infecção por Lp, a supressão da polarização da resposta Th1 induzida pelo THC não é mediada pelo aumento da atividade do eixo HHA, fato evidenciado pela administração prévia de RU-486 (antagonista de receptor de glicocorticóide) (NEWTON et al., 2004).

Outro fator de extrema importância para o desenvolvimento da imunidade adquirida é a interação entre as células apresentadoras de antígenos (APC), macrófagos e células dendríticas, e os linfócitos T naive. Há evidências de que os canabinóides diminuem a atividade co-estimulatória de macrófagos, fato evidenciado principalmente pela diminuição da expressão de IL-2 e, também, pelo uso de antagonistas de receptores CB2 (CHUCHAWANKUL et al., 2004). No entanto, há evidências mostrando que outros canabinóides como, por exemplo, o canabidiol (um componente não psicoativo da maconha), aumentou a produção de IL-12 e diminuiu a produção de IL-10. É sabido que a IL-12 tem um papel essencial na indução da resposta Th1, sendo uma citocina predominantemente pró-inflamatória, e que a IL-10 é uma citocina limitante de respostas inflamatórias; conseqüentemente, estes resultados indicariam que o canabidiol poderia induzir modificação de macrófagos com fenótipo pró-inflamatório (SACERDOTE et al., 2005).

Desde a descoberta do sistema endocanabinóide no início da década de 90, a busca pelos efeitos dos canabinóides, principalmente o THC e de outros derivados da planta, assim como canabinóides sintéticos, sobre a ansiedade vêm sendo efetivada, como se observa pela análise dos dados descritos na literatura. No entanto, poucos trabalhos têm mostrado estes efeitos após o uso do principal agonista endógeno de receptores cerebrais, a AEA. Da mesma forma, as pesquisas

a respeito dos efeitos dos canabinóides sobre a imunidade têm recebido grandes contribuições, entretanto, estes estudos são na sua grande maioria realizados *in vitro*, em uma menor extensão *in vivo*. Neste sentido, ainda não se encontram na literatura dados que analisaram de forma sistemática os possíveis efeitos neuroimunomodulatórios dos canabinóides, principalmente aqueles da AEA.

Por tudo quanto exposto, sendo a AEA o principal canabinóide endógeno e baseado nas evidências de que suas ações alteram funções nervosas e imunes, pareceu-nos relevante avaliar, dentro de uma perspectiva neuroimune, alguns aspectos ligados ao comportamento, ao sistema neuroendócrino e a parâmetros da atividade imune adquirida de camundongos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de um agonista canabinóide endógeno, Anandamida (AEA), sobre o comportamento, atividade do eixo HHA e parâmetros da atividade imune adquirida de camundongos, buscando-se a existência de correlações neuroimunes entre eles.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em camundongos os efeitos da AEA sobre:

- ✓ Parâmetros comportamentais analisados no campo aberto e no labirinto em cruz elevado.

- ✓ A atividade do eixo HHA medida através dos níveis de corticosterona sérica.

- ✓ O estabelecimento de uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) frente a ovalbumina.

- ✓ A proliferação celular de células não-aderentes provenientes do baço dos animais utilizados para o estabelecimento da DTH.

- ✓ O perfil de citocinas presentes no sobrenadante da co-cultura de células aderente e não-aderentes provenientes do baço dos animais utilizados para o estabelecimento da DTH.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP).

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos adultos da linhagem C57BL/6, com 8 a 10 semanas de idade, provenientes de proles obtidas no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP). Os animais foram utilizados segundo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Comitê de Ética da FMVZ – USP (Protocolo n° 911/2006).

Antes do início dos experimentos, os camundongos foram alojados, por um período de 7 dias, em caixas de propileno (28 x 17 x 12cm) em número de 4 por caixa, para adaptação às condições do biotério experimental. Estas caixas foram devidamente acondicionadas em salas cuja temperatura ambiente (22 a 26°C) e umidade (65 a 70%) foram mantidas constantes por meio de aparelhos de ar condicionado central, com ventilação, exaustão e luminosidade controladas, obedecendo-se a um ciclo claro – escuro de 12 horas, com início da fase clara às 7:00 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada para roedores

NUVILAB®. Ração e água foram fornecidas aos animais *ad libitum* durante todos os experimentos.

4.2 FÁRMACO

A N-araquidoniletanolamida (Anandamida – AEA) (Sigma®, St Louis, MO, USA) foi diluída em solução salina: etanol: Agnique® (1:1:18) (veículo 1) do experimento 1 ao 5; do experimento 6 ao 10, ela foi diluída em solução de etanol: Agnique®: salina (1:1:18) (veículo 2). Em ambas diluições, a AEA foi injetada por via intra-peritoneal (i.p.) em dose única, nas doses e tempos de latência específicos para cada experimento descrito abaixo.

JUSTIFICATIVA:

Conforme descrito acima, foi utilizado o veículo-1 do experimento 1 ao 5 e o veículo-2 do experimento 6 ao 9. Isto foi feito uma vez que a diluição da AEA foi feita primeiramente baseada em dados retirados da publicação de Chakrabarti, Ekuta e Onaivi (1998) e Onaivi, Green e Martin (1990). No entanto, à medida que os resultados dos experimentos 1 ao 5 foram sendo analisados, verificou-se um efeito indesejado causado pelo veículo-1. Assim, foi necessário recorrer novamente à literatura para confirmar o diluente da AEA de forma tal que não se observasse

alterações nos animais no grupo veículo-2 em relação aos do grupo controle, isto é, grupo salina. Tomando-se como base outros trabalhos, verificou-se que a proporção correta de diluição da AEA era correspondente àquela que usamos como veículo 2 (CRADOCK et al., 1973; SULCOVA; MECHOULAM; FRIDE, 1998; PATEL et al, 2003). Desta forma, a partir do experimento número 6 foi utilizado o veículo 2 para a conclusão dos testes realizados.

4.3 REAGENTES E SOLUÇÕES

- ✓ Azul de TRIPAN (*Merck*®, Darmstadt, Germany) a 0,1 % - Utilizado para corar as células do baço.
- ✓ Kit de corticosterona Coat-a-Count (DPC®, Los Angeles, CA, USA) - Kit de radioimunoensaio para dosagem de corticosterona.
- ✓ Solução de meio de cultura RPMI – 1641 (Gibco® , Grand Island, NY, USA) – utilizada na avaliação da proliferação de esplenócitos.
- ✓ Kit de ELISA para IL-4 e IFN-γ OptEIA (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) – utilizada para a quantificação das interleucinas da cultura de esplenócitos.
- ✓ Adjuvante completo de Freund (FCA) (Sigma®, St Louis, MO, USA) – utilizado na técnica de hipersensibilidade do tipo tardio.
- ✓ Ovalbumina grau 5 (Sigma®, St Louis, MO, USA) – utilizada na imunização dos animais na técnica de hipersensibilidade do tipo tardio.

- ✓ Ovalbumina grau 2 (Sigma®, St Louis, MO, USA) – utilizada no desafio da técnica de hipersensibilidade do tipo tardio.
- ✓ Solução de cloreto de amônio 0,16M – utilizada com o objetivo de romper as hemácias presentes nas amostras.
- ✓ RPMI 1640 (Gibco®, Grand Island, NY, USA) – meio de cultura celular.
- ✓ Soro fetal bovino (SFB) (Gibco®, Grand Island, NY, USA) – utilizado para enriquecer o meio de cultura.
- ✓ CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) – utilizado na marcação dos esplenócitos no ensaio de proliferação de linfócitos.
- ✓ Anticorpos conjugados com ficoeritrina (PE) anti-CD4 e anti-CD19 e isotípico (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) – utilizados para marcar as células provenientes do baço no ensaio de fenotipagem.

4.4 REGISTRO COMPORTAMENTAL

Para registro e análise comportamental foi utilizado o aparelho Ethovision® (Noldus Information Technology®, Leesburg, VA, USA) que consiste em um sistema de rastreamento em vídeo, análise do movimento e reconhecimento comportamental. O sistema é composto pelo programa EthoVision Pro-Color 2.3 e pelos ítens de *hardware*: câmara filmadora (CCD-Iris color Sony, New York, PA, USA), monitor de vídeo (Sony, New York, PA, USA), computador (Pentium 133, 16 MB de memória RAM, 1,2 gB de disco rígido) com placa de captura de vídeo,

monitor SVGA, teclado e mouse, além de cabos e conectores. Conforme ilustrado na **figura 3**.

O sistema de observação indireta é constituído por uma filmadora instalada no teto da sala de observação, conectada ao monitor e ao microcomputador, localizados fora da sala. Para interpretar as imagens observadas durante a realização dos testes comportamentais no campo aberto (CA) e no labirinto em cruz elevado (LCE) o *software* (EthoVison – Vídeo Tracking, Motion & Behavior Recognition System® - versão 2.3 - Noldus Information Technology®, Leesburg, VA, USA) fez virtualmente as divisões do campo aberto em 4 áreas concêntricas (central, intermediária e externa e tigmotáxica) e em braços abertos, braços fechados e área central no LCE. Este sistema digitalizou e analisou os comportamentos dos animais.

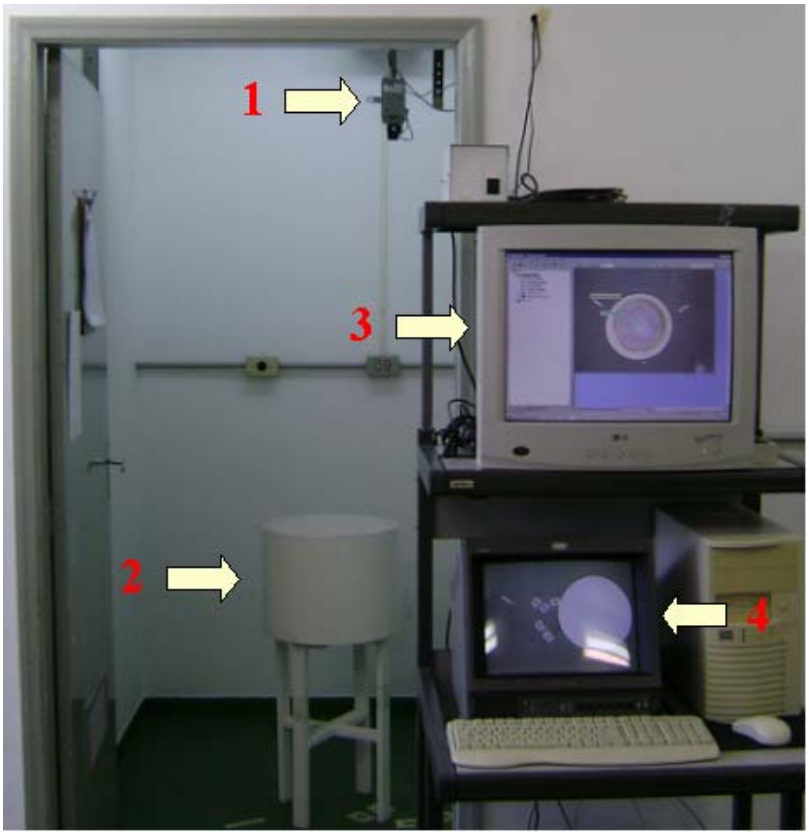

Figura 3 - Etho Vision® - (Vídeo Tracking Motion & Behavior Recognition System Versão 2.3). 1-Câmera filmadora acoplada ao computador, 2-Campo Aberto para camundongo, 3-Imagem digitalizada representada em pixels e 4-Monitor de vídeo

4.4.1 Medida da Atividade Geral no Campo Aberto

Em um ambiente novo os animais tendem a explorá-lo ou podem ficar imóveis, com a musculatura tensa, vigilantes e de prontidão. A atividade geral foi avaliada no campo aberto; esse aparelho tem sido usado para quantificar os efeitos comportamentais do estresse e da ansiedade (BELZUNG; GRIEBEL, 2001; BASSO et al., 2003, RIGHI; PALERMO-NETO, 2003, FERRAZ DE PAULA, 2007).

O CA consiste de uma arena redonda feita de madeira, pintada de branco (40 cm de diâmetro e com paredes de 25 cm de altura, sendo o conjunto todo elevado a 55 cm do solo), como ilustra a **figura 4**. A arena foi virtualmente divida em quatro zonas: tigmotáxica, externa, média e central, da região mais próxima às paredes para o centro do aparelho. Esta divisão foi realizada para que pudéssemos avaliar não só a atividade locomotora geral dos animais, mas também para avaliarmos o tempo permanecido, por ele, em cada zona.

Como exemplificado acima, a atividade geral dos animais foi avaliada por meio de observação indireta através do sistema, ETHOVISION. Desta forma, a presença do observador não interferiu com os parâmetros observados, uma vez que este ficou fora da sala onde se encontravam os animais em teste. É importante ressaltar que a sala onde foi realizado o experimento era pouco iluminada e sem nenhum tipo de ruído. Ainda, os animais dos diferentes grupos foram intercalados entre si para evitar possíveis interferências do ritmo circadiano sobre os resultados. Os animais foram colocados no centro da arena e observados por 5 minutos. A avaliação da atividade geral foi feita sempre no mesmo período do dia (entre as 7:00 hs e 12:00 hs) e entre as observações o aparelho foi limpo com solução aquosa de etanol 5%, com a finalidade de evitar influência de odores.

Os parâmetros considerados indicativos da atividade geral no campo aberto foram os seguintes: 1) distância percorrida (cm): corresponde ao ato de o animal entrar com o centro da massa corpórea em uma das divisões (zonas) do piso da arena e se locomover; 2) freqüência de levantar: corresponde ao ato de o animal permanecer apoiado em suas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão da arena, com sua cabeça voltada para cima, apoiando-se ou não nas paredes do campo aberto; 3) número de movimentos iniciados: corresponde ao ato de o animal iniciar movimentos na arena; 4) tempo (s) em movimento: quanto tempo o animal se movimentou no interior das zonas do campo aberto; 5) velocidade média (cm/s): corresponde à distância percorrida pelo animal, por unidade de tempo; 6) número de *grooming* (auto-limpeza): ato de limpar qualquer parte de sua superfície corporal com a língua, com os dentes e/ou com as patas dianteiras; 7) tempo de *grooming*: tempo gasto pelo animal na realização de *grooming*.

Figura 4 – Campo aberto para camundongos

4.4.2 Avaliação do Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado

O estudo dos níveis de ansiedade foi feito como aquele descrito para ratos por Pellow et al. (1985) e validado para camundongos por Lister (1987). O labirinto em cruz elevado é um teste freqüentemente utilizado em roedores para avaliação dos níveis de ansiedade. Trata-se de um labirinto em forma de cruz, feito de madeira e pintado de branco, constituído por dois braços abertos medindo 30 cm de comprimento por 5 cm de largura cada um, em oposição a dois braços fechados de iguais medidas, mas com paredes laterais de 15 cm de altura. Na intersecção entre os braços abertos e fechados forma-se um espaço de 25 cm^2 de área, denominado centro. O aparelho é colocado sobre um suporte a 55 cm do chão, como ilustrado na **figura 5**. Segundo Barnett (1956, 1958), os roedores têm preferência natural por locais próximos às superfícies verticais, provavelmente por ficarem menos expostos aos predadores. Este comportamento faz parte do repertório defensivo natural dos roedores (GROSSEN; KELLEY, 1972). Assim, sabe-se que animais muito ansiosos preferem os braços fechados do aparelho, enquanto fármacos ansiolíticos aumentam a exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado (PELLOW et al., 1985).

A avaliação do comportamento no labirinto em cruz elevado foi feita imediatamente após o fim do teste de campo aberto, colocando-se cada animal, individualmente, no centro do aparelho, com a cabeça voltada para um dos braços fechados. Resultados prévios deste laboratório e de outros têm mostrado que animais colocados no campo aberto ou no *hole-board,* imediatamente antes ao teste de labirinto em cruz elevado, apresentam uma melhor atividade exploratória no LCE, facilitando a análise dos dados (LISTER, 1987; PALERMO-NETO; GUIMARÃES,

2000; FERRAZ DE PAULA, 2007). Foi considerada como “entrada” em um dos braços ou permanência nos braços ao ato de o animal colocar o centro de sua massa corpórea dentro de cada área do aparelho. Cada animal foi observado por 5 minutos através do sistema indireto, o ETHOVISION como descrito em 4.4.

Foram registrados os seguintes parâmetros: 1) número de entradas nos braços abertos (EA): corresponde ao ato de o animal entrar nos braços abertos com o centro de sua massa corpórea; 2) número de entradas nos braços fechados (EF): corresponde ao ato de o animal entrar nos braços fechados com o centro de sua massa corpórea; 3) tempo em movimento nos braços abertos (TA): corresponde ao tempo gasto (s) em movimento neste braço; 4) tempo em movimento nos braços fechados (TF): corresponde ao tempo (s) em movimento gasto neste braço; 5) velocidade média (cm/s): corresponde à distância percorrida pelo animal, por unidade de tempo; 6) distância percorrida (cm): corresponde ao ato de o animal entrar com o centro de sua massa corpórea em uma das divisões (zonas) do piso da arena do LCE e se locomover.

Para comparação dos níveis de ansiedade entre os grupos foram consideradas as seguintes taxas:

$$\% \text{ de entrada em EA} = \frac{EA \times 100}{EA+EF} \quad \text{e} \quad \% \text{ de tempo em TA} = \frac{TA \times 100}{TA + TF}$$

As observações foram realizadas sempre no mesmo período do dia (entre as 7:00 hs e 12:00 hs), intercalando-se os animais dos diferentes grupos. A arena do LCE foi limpa com uma solução aquosa de álcool a 5 % imediatamente antes da introdução de cada animal.

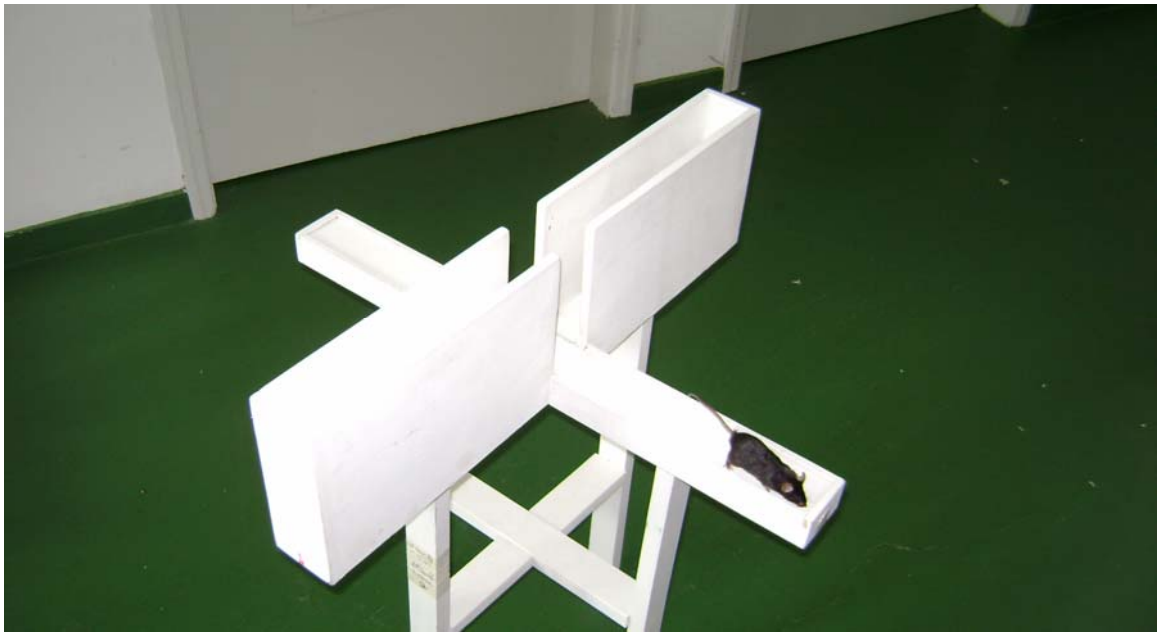

Figura 5 – Labirinto em cruz elevado para camundongos

4.5 DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA

4.5.1 Coleta de Sangue para Obtenção do Soro

Os animais foram submetidos à eutanásia, para a coleta de sangue e posterior obtenção do soro para a dosagem dos níveis séricos de corticosterona. Trata-se do glicocorticóide mais abundante na circulação de camundongos, sendo considerado como um ótimo indicador da função adrenocortical nesta espécie animal. O sangue foi coletado em *eppendorfs* secos, após 10, 45 e 90 minutos da administração de AEA (0,1 mg/kg e 1,0 mg/kg) e deixado à temperatura ambiente para a retração do coágulo. Então foi centrifugado sob refrigeração a 4025g (2500 rpm) por 20 minutos para obtenção do soro. Este soro foi armazenado em *eppendorfs* de polietileno em

freezer a -80ºC até o momento da realização das dosagens hormonais. As amostras foram coletadas à mesma hora do dia (entre 08:00 e 09:00 hs) para minimizar os efeitos do ritmo circadiano sobre os níveis séricos de corticosterona.

4.5.2 Dosagem de Corticosterona

As amostras de soro dos animais foram retiradas do freezer, sendo mantidas a temperatura ambiente (22±2º C) para o descongelamento. A quantificação de corticosterona foi realizada por radioimunoensaio em fase sólida utilizando-se o kit comercial Coat-a-Count (DPC®) específico para corticosterona.

Nesta técnica de radioimunoensaio, há competição da corticosterona marcada com [I^{125}] (iodo radioativo) e do hormônio contido na amostra (soro) pelos sítios de anticorpos fixados à parede do tubo de ensaio (“fase sólida”). Foi pipetado dentro de cada tubo de ensaio um volume de 50 µl de cada amostra de soro dos animais dos grupos controles e experimentais. Após a adição de 1 mL da corticosterona marcada com [I^{125}], estes tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 2 horas para atingirem um equilíbrio. A seguir, o conteúdo dos tubos foi desprezado sendo a leitura da radioatividade remanescente desta reação feita no contador automático de radiação gama (Packard®). Os resultados finais das contagens por minutos foram expressos em ng/mL.

4.5.3 Curva Padrão

Para obtenção de uma curva padrão de corticosterona, foram utilizados calibradores padrões (50µl) com concentrações previamente conhecidas de corticosterona, quais sejam: 0; 20; 50; 100; 200; 500; 1.000 e 2.000 ng/mL, no ensaio realizado.

4.5.4 Soro Controle

Foi utilizado um soro controle (50µl) com concentração de 200ng/ml de corticosterona no início, meio e final do ensaio. Os seguintes parâmetros de validação foram registrados:

- ✓ Sensibilidade do método: 91,30%.
- ✓ Coeficiente de Variação Baixo: 0,76%.
- ✓ Coeficiente de Variação Alto: 0,59%.
- ✓ Limite de Detecção: 2,4465 ng/mL.

Todos os ensaios para dosagem de corticosterona foram realizados no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal (VRA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ –USP).

4.6 ESTABELECIMENTO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA

Os animais foram inoculados subcutaneamente com 50 μg de OVA (albumina de ovo – Sigma®, St Louis, MO, USA) emulsificada em 0,1mL de adjuvante completo de Freund (Sigma®, St Louis, MO, USA). Decorridos sete dias da data de sensibilização com OVA, os animais foram desafiados também s.c. no coxim plantar com uma solução de OVA agregada a 4%. O crescimento na espessura da pata foi medida em momentos estipulados (1h, 6h, 24h e 48h), para verificação do processo inflamatório inicial e do estabelecimento de uma hipersensibilidade do tipo tardio. Para avaliar o crescimento da pata, os dados de cada momento foram subtraídos do valor inicial de cada coxim plantar.

Ao final das 48 horas, os animais foram submetidos à eutanásia e seus baços foram removidos e processados para avaliações *in vitro*.

4.7 CITOMETRIA DE FLUXO

Foi utilizado um citômetro de fluxo (Becton Dickison Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado a um computador (Machintosh Apple, San Jose, CA, USA). Foram adquiridos 50000 eventos por meio de um programa denominado Cell Quest Pro® (Becton Dickison Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). Estes eventos foram analisados por meio do programa FlowJo® versão 7,0.

As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades de FSC – Foward Scatter e SSC –Side Scatter que avaliam o tamanho e a

complexidade das células, respectivamente. As fluorescências foram adquiridas em escala logarítmica para avaliação das moléculas de superfície celular (fenotipagem) e proliferação de linfócitos. A fluorescência do CFSE foi detectada pelo leitor FL-1 (530 $\pm$ 30 nm) e a fluorescência do PE foi detectada pelo leitor FL-2 (585 $\pm$ 42 nm).

Foram analisadas através do *sofware* FlowJo® as populações de interesse (linfócitos TCD4+ e linfócitos TCD19+) por meio de *gates*, excluindo-se assim outros tipos celulares das amostras. Além disso, para os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo branco, um isotípico, um vede, um vermelho e um verde/vermelho.

4.7.1 Avaliação da Atividade Proliferativa de Linfócitos

Cada baço foi coletado e macerado em 5 mL de RPMI-1640 estéril formando uma suspensão de células. Esta suspensão foi centrifugada a 1200 rpm/8 minutos e ressuspensa em 4 mL de cloreto de amônio estéril para a lise das hemácias, sendo centrifugado novamente em seguida. Este procedimento foi repetido mais uma vez para a lise completa das hemácias. Em seguida, as células foram ressuspensas em 5 mL de meio RPMI completo (10% SFB) estéril e cultivadas em placas de 6 poços em estufa a 37ºC (5% CO_2) por duas horas.

Depois deste período de incubação, o sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos falcon de 15 mL e contado (1:20 em azul de tripan), sendo ajustado 1 x 10^7 célula/mL e incubado no escuro com 1 μL de CFSE (5mM em DMSO). Após 20 minutos, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 5 mL de meio RPMI completo e contadas novamente (1:10 em azul de tripan). Ajustou-se

o número de células para 1,3 x 10^5 células/mL. As células aderentes, oriundas do mesmo ensaio de aderência, foram pulsadas com 1mg de Ovalbumina, por uma hora. Em seguida, elas foram contadas (1:10 em azul de tripan) e ajustadas 3,9 x 10^6 células/mL. Após o ajuste foram colocadas 50 μL de cada suspensão de células em placas de 96 poços.

As células não-aderentes e as células aderentes foram, então, co-incubadas na proporção de 30:1 (não-aderentes:aderentes) por quatro dias em estufa a 37ºC (5% CO_2). Após este período as células foram coletadas, incubadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD19 e analisadas em citômetro de fluxo quanto a taxa de proliferação e o tipo de linfócito proliferado. Para a análise dos dados de proliferação, foi utilizado o *software* FlowJo versão 7.0.

Para o cálculo da porcentagem de proliferação foi utilizado o método proposto por Lyons (2000), no qual ele considera que porcentagem de eventos em uma geração de células proliferadas (Pn) deve ser dividida por 2n, para calcular a porcentagem original das células que deram origem a estas. Este número é chamado de células não divididas (CND) e a soma destes é o total de células não divididas (TND). A soma das CND das gerações subseqüentes ao primeiro é o total de células precursoras que proliferaram durante os dias de incubação, sendo chamadas de (PRE). Hipoteticamente, 5 gerações de proliferação (P0 a P4), teríamos então o TND = P0 + (P1/2) + (P2/4) + (P3/8) + (P4/16), o PRE = (P1/2) + (P2/4) + (P3/8) + (P4/16). A porcentagem de proliferação é, então, obtida por PRE/TND x 100. A **figura 6** ilustra a fluorescência (FL1 e FL2) da população selecionada para linfócitos T CD4+ e linfócitos B CD19+.

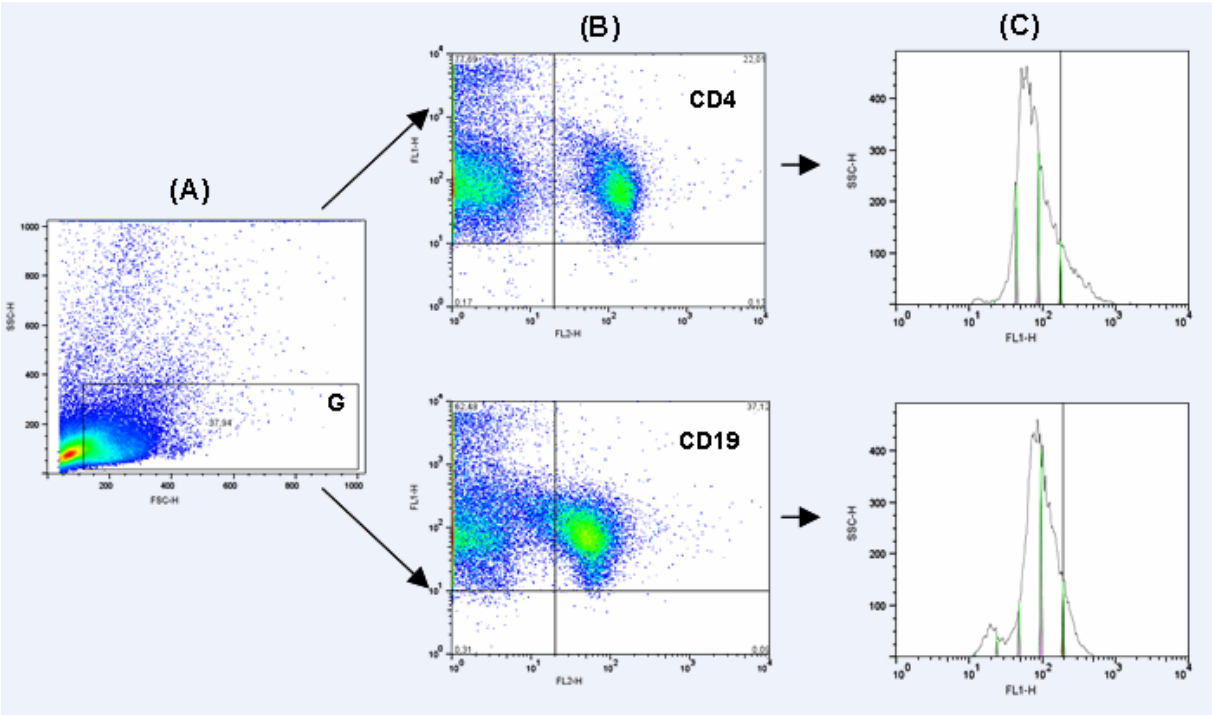

Figura 6 – **(A)** Citograma da população de células **(G1)** encontradas na co-cultura de células aderentes e não aderentes do baço. **(B)** Citograma correspondente a G1 de células não aderentes marcadas com CFSE (FL1) e marcadas com anti-CD4 (acima) e anti-CD19 (abaixo). **(C)** Fluorescência FL1 correspondente às células com dupla marcação: **CFSE+CD4** (acima) e **CFSE+CD19** (abaixo) para determinação da porcentagem de proliferação de cada fenótipo

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA

O sobrenadante das co-culturas estabelecidas no item 4.6.1 foi coletado e armazenado para posterior quantificação de IFN-γ e IL-4. Essas dosagens de citocinas foram realizadas por ELISA, utilizando-se os kits OptEIA para citocinas (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Neste método, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 50 μL por poço de anticorpo de captura diluído em tampão PBS, e incubadas por uma noite. Após 3 lavagens com 300 μL/poço de tampão de lavagem para ELISA, as placas foram bloqueadas com 200 μL/poço de tampão de

bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente. Após 3 lavagens, as amostras foram incubadas por um período de 2 horas em temperatura ambiente. Para a curva padrão da citocina foram incubadas duplicatas de 50 μL/poço das diluições seriadas das citocinas recombinantes, conforme recomendações do fabricante. O período de incubação das amostras e curva padrão foram de 2 horas em temperatura ambiente. Após cinco lavagens foram adicionados 50 μL/poço do anticorpo de detecção, com incubação por 1 hora à temperatura ambiente no escuro. Novamente, a placa foi lavada sete vezes, 50 μL/poço de estreptoavidina foi adicionada e incubada por 20 min, no escuro, em temperatura ambiente. Por fim, 50 μL/poço de H_2SO_4 (2N) foram adicionados para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados pelo teste de Bartlet para determinação da homogeneidade das variâncias. Os dados paramétricos foram analisados através do teste “t” de Student ou da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para avaliação dos contrastes. Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com sua resolução própria. Foram considerados significantes as análises com nível de significância menor ou igual $p<0,05$.

Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio dos programas GRAPHPAD INSTAT em sua versão 3.01.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM DOSES CRESCENTES DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-1 SOBRE O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS AVALIADOS 10 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO

Cinqüenta camundongos foram separados ao acaso em 5 grupos iguais: um grupo Veículo-1 e quatro grupos experimentais. O experimento foi realizado em dois dias consecutivos, sempre no mesmo período (entre as 7h e 12h). Os animais dos grupos experimentais foram tratados pela via intraperitoneal com doses crescentes de AEA, a saber: 0,01, 0,1, 1,0 e 10,0 mg/kg. Os animais do grupo controle receberam volume idêntico (0,1 mL/10g) do veículo-1 da AEA. Dez minutos após as administrações, os animais foram colocados individualmente na arena do campo aberto para a medida da atividade geral conforme item 4.4.1. Após 5 minutos de observação no campo aberto os animais foram retirados e colocados no labirinto em cruz elevado para avaliação dos níveis de ansiedade, por mais 5 minutos conforme descrito no item 4.4.2. As doses de AEA, o tempo de latência e o veículo utilizado para as observações foram embasados em dados de literatura (ONAIVI; GREEN; MARTIN, 1990; CHAKRABARTI; EKUTA; ONAIVI, 1998).

RESULTADOS

A **tabela 1** mostra os efeitos da administração aguda de AEA sobre a distância total percorrida e o tempo em movimento na arena do campo aberto, e sobre a distância movida e o tempo gasto nas zonas periférica (tigmotáxica + externa) e central (média + interna) do aparelho. Da análise estatística dos resultados verificou-se um aumento da distância total percorrida ($F(4,45)=7,905$; $p<0,0001$) e do tempo em movimento ($F(4,42)=3,554$; $p<0,05$) na arena em animais tratados com AEA na dose de 0,01 mg/kg em relação aos animais do grupo veículo-1. Verificou-se, também, um aumento da distância percorrida ($F(4,45)=15,078$; $p<0,0001$) e um aumento do tempo em movimento ($F(4,38)=5,015$; $p<0,05$) na zona central do aparelho em animais tratados com 0,1 e 10,0 mg/kg de AEA; observou-se, ainda, uma diminuição da distância percorrida na zona periférica após a dose de 1,0 mg/kg de AEA ($F(4,45)=10,213$; $p<0,0001$). As **figuras 7** e **8** ilustram esses resultados.

Tabela 1 **-** Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 sobre a atividade locomotora de camundongos C57BL/6 observados no campo aberto

	Grupos				
Parâmetros[A]	**Veículo-1**	**AEA 0.01 mg/kg**	**AEA 0.1 mg/kg**	**AEA 1.0 mg/kg**	**AEA 10.0 mk/kg**
DT (cm)	998,48±54,51	1203,44±152,85#	1130,95±123,56	981,07±82,26	1083,69±76,39
DZP (cm)	992,55±87,62	1100,24±98,03	1045,38±120,08	821,07±77,83**	943,25±133,86
DZC (cm)	72,64± 24,03	115,72±35,22	166,05±67,02#	95,95±25,93	209,19±56,01#
TM (s)	24,30±7,75	44,5830±21,00*	36,5350±3,50	26,47±7,62	34,83±13,41
TZP (s)	28,68±16,11	42,45±14,90	33,69±6,29	21,67±9,80	28,93±10,54
TZC (s)	2,22±1,57	6,41±3,72*	6,62±3,75*	2,21±1,64	4,57±2,86

Os dados representam a média±DP (desvio padrão). * p<0,05 em relação ao grupo veículo-1, ** p<0,01 em relação ao grupo veículo-1; # p<0,001 em relação ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo.

[A]DT=distância total movida na arena, DZP=distância movida na zona periférica, DZC=distância movida na zona central, TM=tempo em movimento na arena, TZP=tempo em movimento na zona periférica, TZC=tempo em movimento na zona central.

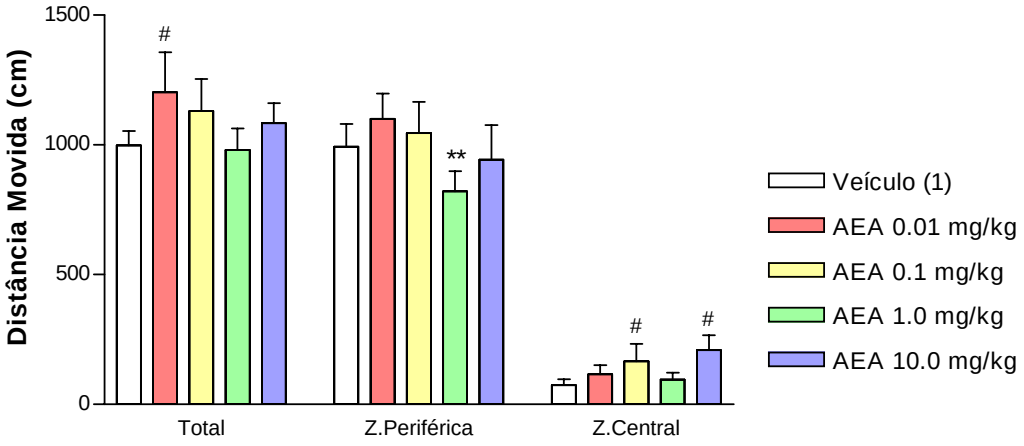

Figura 7 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 em camundongos C57BL/6 sobre a locomoção total e nas zonas periférica e central no campo aberto. ** p<0,01 em relação ao grupo veículo-1; # p<0,001 em relação ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo

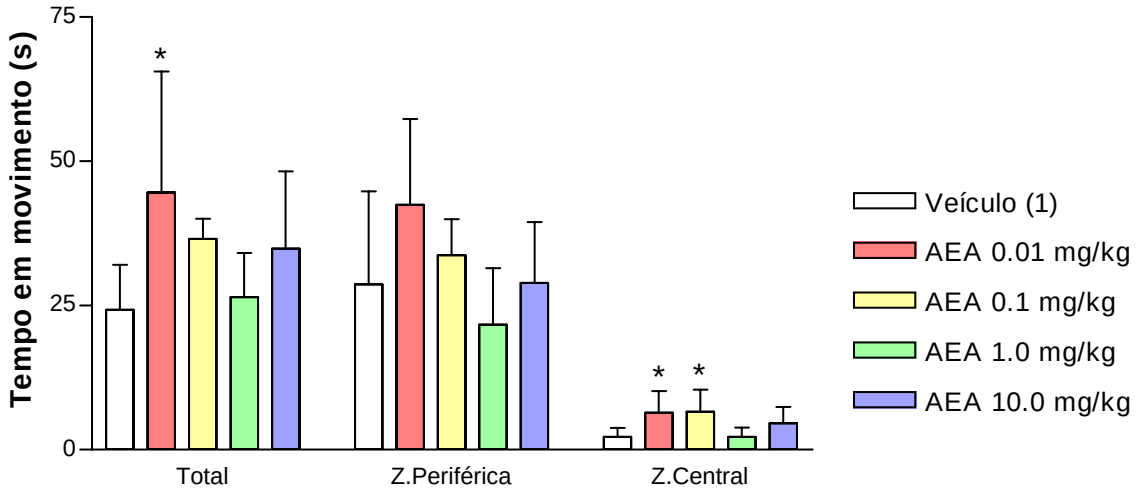

Figura 8 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 em camundongos C57BL/6 sobre o tempo de locomoção total e nas zonas periférica e central no campo aberto. * $p<0,05$ em relação ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo

A **tabela 2** mostra os efeitos da administração aguda de AEA diluída no veículo-1 sobre a velocidade média, a freqüência de levantar e o número de *grooming* na arena. A análise dos dados mostrou um aumento na freqüência de levantar ($F(4,45)=3,259$; $p<0,05$) nos animais tratados com AEA após a dose de 0,01 mg/kg. A **figura 9** ilustra esses resultados.

Tabela 2 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 sobre a velocidade média, freqüência de levantar e o número de *grooming* de camundongos C57BL/6 observados no campo aberto

	Grupos				
Parâmetros[A]	**Veículo-1**	**AEA 0.01 mg/kg**	**AEA 0.1 mg/kg**	**AEA 1.0 mg/kg**	**AEA 10.0 mk/kg**
VM (cm/s)	3,49±0,76	4,23±1,07	4,31±1,37	3,46±1,32	3,69±0,68
FL (n)	3,60±2,07	7,20±3,52*	5,80±2,53	3,90±2,42	4,20±2,57
NG (n)	6,0±3,05	6,20±2,70	6,70±1,70	4,6±2,17	4,80±1,14

Os dados representam a média±DP (desvio padrão). * p<0,05 em relação ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo.

[A]VM=velocidade média da locomoção na arena, FL=freqüência de levantar, NG=número de *grooming*.

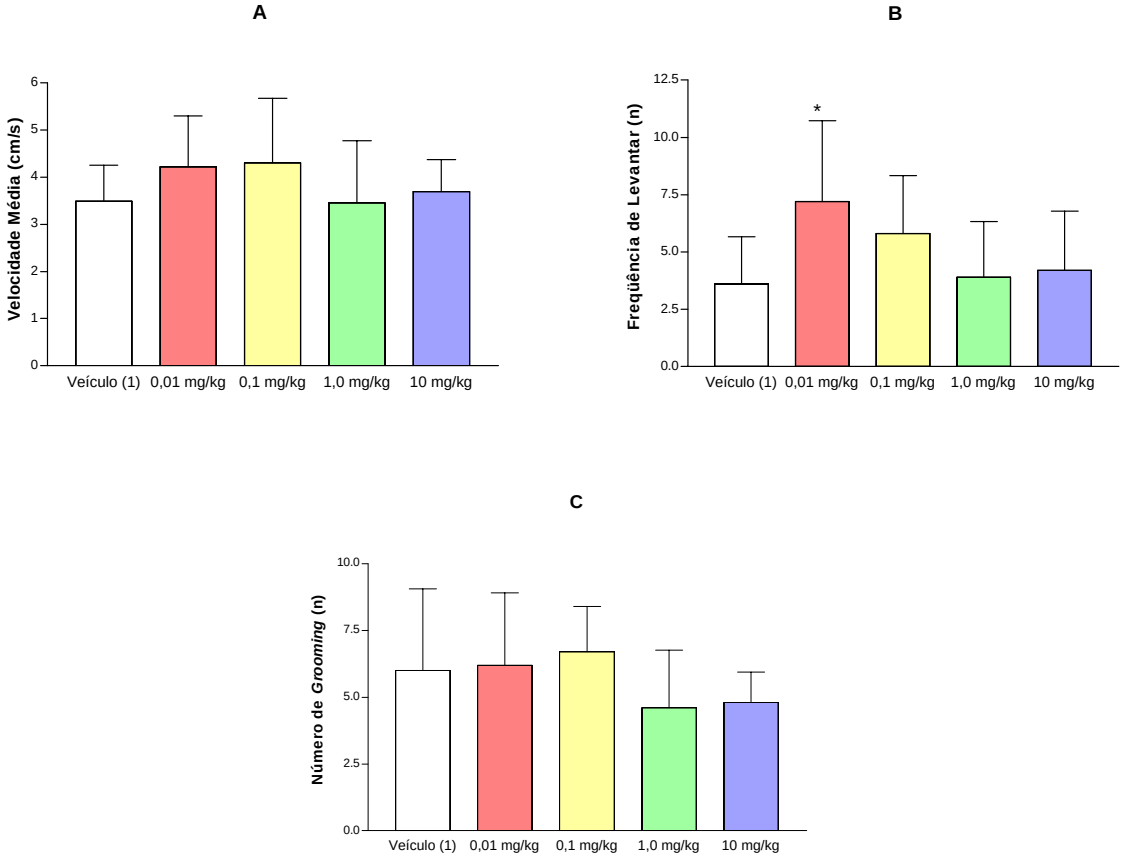

Figura 9 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 sobre **(A)** velocidade média, **(B)** freqüência de levantar e **(C)** número de *grooming* de camundongos C57BL/6 observados no campo aberto. * p<0,05 em relação ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo

A **tabela 3** mostra os efeitos da administração aguda de diferentes doses de AEA diluída no veículo-1 sobre os níveis de ansiedade de camundongos C57BL/6, avaliados no labirinto em cruz elevado, 5 minutos após a exposição ao campo aberto. A análise dos dados mostrou que os animais tratados com AEA nas doses de 0,1 e 10,0 mg/kg apresentaram um aumento na porcentagem de entradas ($F(4,45)=14,658$; $p<0,001$) e na porcentagem de tempo gasto ($F(4,45)=20,335$; $p<0,001$) nos braços abertos do LCE. Além disso, verificou-se uma diminuição na porcentagem de entradas ($F(4,45)=8,118$; $p<0,05$) e na porcentagem de tempo gasto ($F(4,45)=10,342$; $p<0,05$) nos braços fechados do aparelho. As **figuras 10** e **11** ilustram esses resultados.

Tabela 3 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 sobre a porcentagem de entradas e a porcentagem de tempo de permanência de camundongos C57BL/6 nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado

	Grupos				
Parâmetros[A]	**Veículo-1**	**AEA 0.01 mg/kg**	**AEA 0.1 mg/kg**	**AEA 1.0 mg/kg**	**AEA 10.0 mg/kg**
%EBA	18,79±5,38	22,41±2,85	31,37±4,16**	20,87±6,02	31,93±6,17**
%EBF	79,33±7,99	77,59±2,85	69,77±5,50*	79,38±7,52	66,07±8,82**
%TBA	1,91±1,31	5,63±2,09	17,76±7,19**	2,60±1,20	10,37±6,83#
%TBF	97,96±1,34	95,57±3,03	87,96±6,07**	96,60±2,78	92,81±4,49*

Os dados representam a média±DP (desvio padrão).* $p<0,05$ em relação ao grupo veículo-1, # $p<0,01$ em relação ao grupo veículo-1, **$p<0.001$ em relação ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo.

[A]%EBA=porcentagem de entradas nos braços abertos, %EBF=porcentagem de entradas nos braços fechados, %TBA=porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos, %TBF=porcentagem de tempo de permanência nos braços fechados.

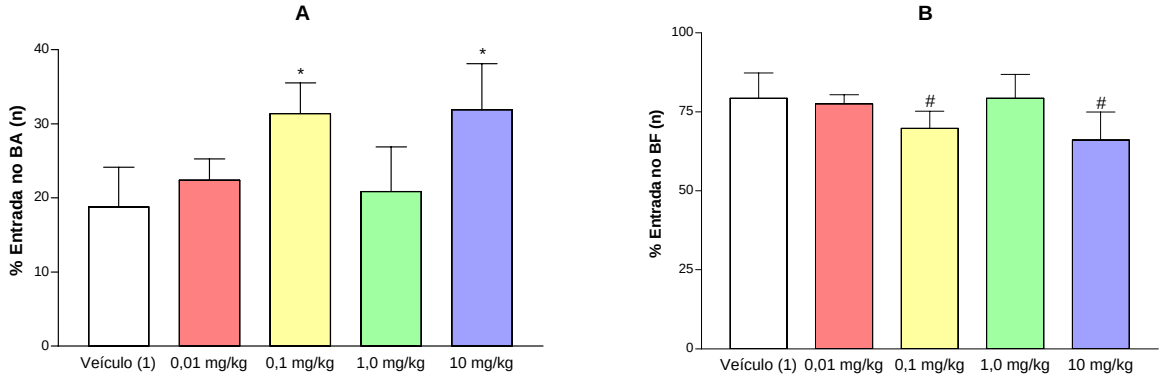

Figura 10 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 em camundongos C57BL/6 sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos **(A)** e nos braços fechados **(B)** do labirinto em cruz elevado.* p<0,05 em relação ao grupo veículo-1, # p<0,01 em relação ao grupo veículo-1, dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo

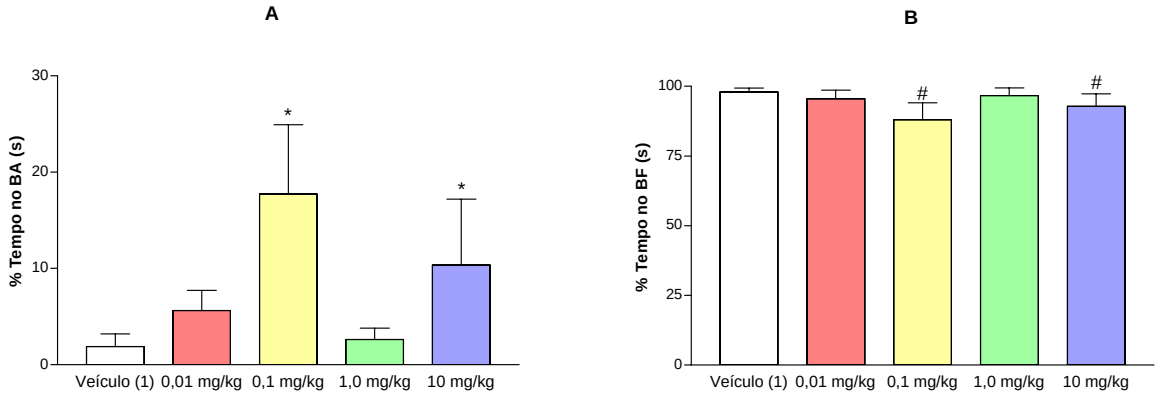

Figura 11 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AEA diluída no veículo-1 em camundongos C57BL/6 sobre a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos **(A)** e nos braços fechados **(B)** do labirinto em cruz elevado.* p<0,05 em relação ao grupo veículo-1, # p<0,01 em relação ao grupo veículo-1, dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo

5.2 EXPERIMENTO 2 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 E 1,0 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-1 SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA DE CAMUNDONGOS TOMADOS 10, 45 e 90 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO

Cento e Vinte camundongos foram separados ao acaso em 4 grupos iguais: um grupo Salina, um grupo Veículo-1 e dois grupos experimentais. O experimento foi realizado no mesmo período do dia (entre as 7h e 9h). Os animais dos grupos experimentais foram tratados pela via intraperitoneal com duas doses de AEA, a saber: 0,1, 1,0 mg/kg. Os animais dos grupos controle receberam volume idêntico (0,1 mL/10g) de solução salina 0,9% ou de veículo-1 da AEA. Dez, quarenta e cinco, e noventa minutos após os tratamentos coletaram-se amostras de sangue para dosagem de corticosterona conforme descrito no item 4.5.

RESULTADOS

A **tabela 4** mostra os efeitos da administração de duas doses de AEA sobre os níveis séricos de corticosterona tomados em diferentes tempos após o tratamento com as duas doses de AEA e, também, aquelas provenientes dos animais dos grupos controle. A análise dos dados mostrou um aumento discreto nos níveis de corticosterona dos animais tratados com AEA 1,0 mg/kg ($F(3,35)=6,278$; $p<0,001$) 10

minutos após a administração. Após 45 minutos da administração foi observado um aumento acentuado nos níveis de corticosterona nos grupos veículo-1, AEA 0,1 e 1,0 mg/kg ($F(3,32)=41,925$; $p<0,001$) quando comparados ao grupo salina; verificou-se, também, que os níveis de corticosterona estavam aumentados nos grupos experimentais ($F(3,32)=41,925$; $p<0,001$) quando comparados com o grupo veículo-1. Após 90 minutos da administração foi observado que os níveis de corticosterona permaneceram aumentados nos grupos veículo-1, AEA 0,1 e 1,0 mg/kg ($F(3,34)=34,842$; $p<0,001$) quando comparados com o grupo salina; no entanto, aos 90 minutos, somente no grupo AEA 0,1 mg/kg foi verificado um aumento de corticosterona em relação ao grupo veículo 1 ($F(3,34)=34,842$; $p<0,001$). A **figura 12** ilustra esses resultados.

Tabela 4 **-** Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 e 1.0 mg/kg) diluída no veículo-1 sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos C57BL/6 aos 10, 45 e 90 minutos após a administração

	Grupos			
Tempos	**Salina**	**Veículo-1**	**0.1mg/kg**	**1.0mg/kg**
10 minutos	217,34±40,92	256,05±28,54	253,31±27,12	282,85±36,59$^{\#}$
45 minutos	229,89±57,21	448,87±147,86$^{\#}$	635,89±38,79*	664,37±86,65$^{\#**}$
90 minutos	124,29±44,52	454,96±116,78$^{\#}$	710,76±135,72$^{\#**}$	551,93±202,34$^{\#}$

Os dados representam a média±DP (desvio padrão) em ng/mL. # $p<0,001$ em relação ao grupo salina, *$p<0,01$ em relação ao grupo veículo-1, **$p<0.001$ em relação ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo.

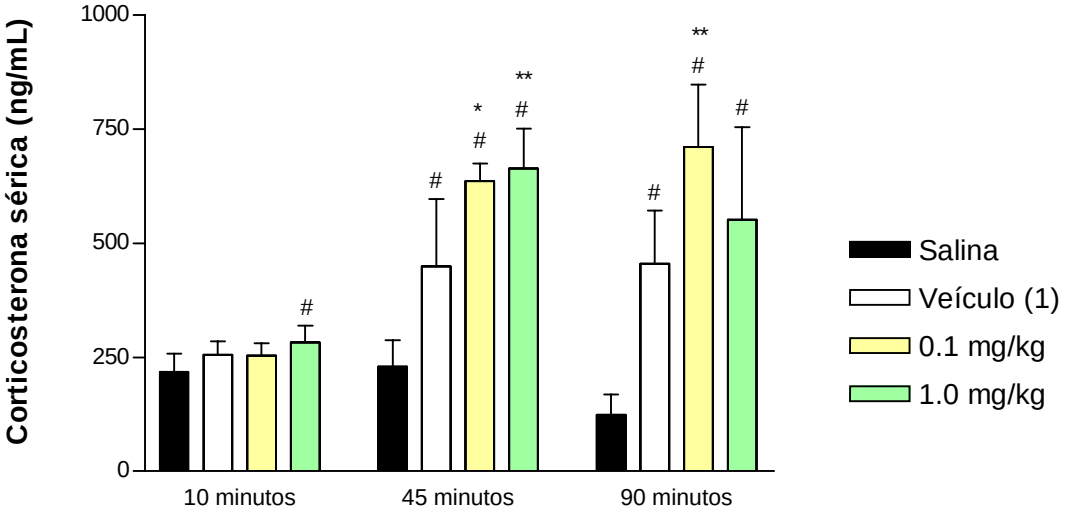

Figura 12 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 e 1.0 mg/kg) diluída no veículo-1 sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos C57BL/6 10, 45 e 90 minutos após a administração. # p<0,001 em relação ao grupo salina, *p<0,01 em relação ao grupo veículo-1, **p<0.001 em relação ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo

5.3 EXPERIMENTO 3 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-1 SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA (DTH)

Vinte e sete camundongos foram separados ao acaso em 3 grupos iguais: um grupo Salina, um grupo Veículo-1 e um grupo experimental. Os animais do grupo experimental foram tratados pela via intraperitoneal com AEA 0,1 mg/kg; os animais dos grupos controle receberam volume idêntico (0,1 mL/10g) de solução salina 0,9% e do veículo-1 da AEA. Noventa minutos após os tratamentos, os animais receberam por via subcutânea uma dose de 50μg/animal de OVA. Após sete dias, os animais foram desafiados com uma injeção de OVA agregada a 4% no coxim plantar da pata esquerda. O tamanho da pata (cm) foi medido imediatamente antes do desafio, sendo usado como parâmetro de comparação para as medições feitas posteriormente 1, 6 e 24 horas para verificação do processo inflamatório inicial e do estabelecimento da DTH conforme descrito no item 4.6.

RESULTADOS

A **tabela 5** mostra os efeitos da administração de AEA 0,1 mg/kg diluída no veículo-1, previamente a um desafio imunológico com OVA, sobre o aumento do tamanho da pata de animais posteriormente desafiados com o mesmo antígeno no

teste de DTH. A análise dos dados mostrou ausência de diferenças entre os dados dos grupos avaliados (1h - F(2,24)=1,924; 6h – F(2,24)=0,0729; 24h – F(2,24)=2,793). Animais de ambos os grupos apresentaram uma reação inflamatória inicial de intensidade semelhante até 6 horas após o desafio antigênico, sendo esta controlada após 24 horas. A **figura 13** ilustra esses resultados.

Tabela 5 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-1 sobre o aumento do tamanho da pata de camundongos C57BL/6 no teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)

	Grupos		
Tempos	**Salina**	**Veículo-1**	**0.1mg/kg**
1 hora	0,0125±0,0354	0,0444±0,0390	0,0300±0,0250
6 horas	0,1250±0,0598	0,1280±0,0510	0,1350±0,0630
24 horas	0,01875±0,0258	0,0389±0,0330	0,0100±0,0200

Os dados representam a média±DP (desvio padrão) em cm. p>0,05 em relação ao grupo salina e ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo.

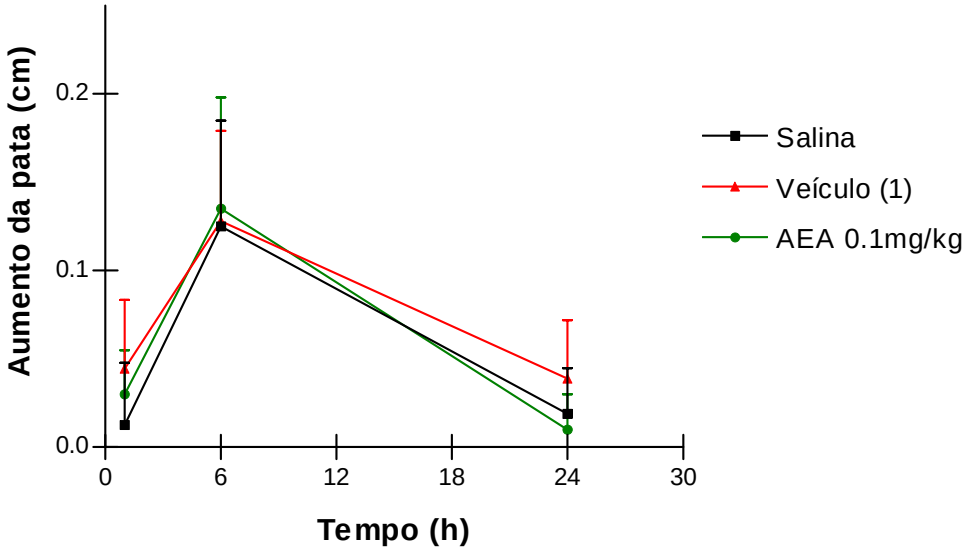

Figura 13 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-1 sobre o aumento do tamanho da pata de camundongos C57BL/6 no teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH). p>0,05 em relação ao grupo salina e ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo

5.4 EXPERIMENTO 4 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-1 SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS ANTÍGENO-ESPECÍFICA

Ao final das 24 horas, os animais utilizados no item 4.6 foram submetidos à eutanásia e seus baços removidos e processados para avaliações *in vitro*, conforme descrito no item 4.7.

RESULTADOS

A **tabela 6** mostra os efeitos da administração de 0,1 mg/kg de AEA sobre a proliferação de linfócitos antígeno-específica de animais submetidos ao teste de DTH. A análise dos dados mostrou um aumento significante na porcentagem de proliferação de linfócitos T CD4+ provenientes animais tratados com AEA 0,1 mg/kg ($F(2,24)=16,937$; $p<0,05$ e 0,001) quando comparados com aqueles dos animais do grupo salina e do grupo veículo-1, respectivamente. Um dado importante que deve ser notado é que os dados do grupo veículo-1 apresentaram-se consideravelmente diminuídos quando comparados com aos do grupo salina ($F(2,24)=16,937$; $p<0,05$). Com relação à proliferação de linfócitos B CD19+, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($F(2,24)=0,6265$). A **figura 14** ilustra esses resultados.

Tabela 6 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-1 sobre a proliferação de células não aderentes do baço de camundongos C57BL/6 submetidos ao teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)

	Grupos		
Fenótipo	**Salina**	**Veículo-1**	**0.1mg/kg**
CD 4+	13,71±5,76	7,42±1,76*	19,60±4,78*#
CD 19+	17,73±9,11	20,86±5,12	22,14±10,60

Os dados representam a média±DP (desvio padrão). *p<0,05 em relação ao grupo salina, # p<0,001 em relação ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo.

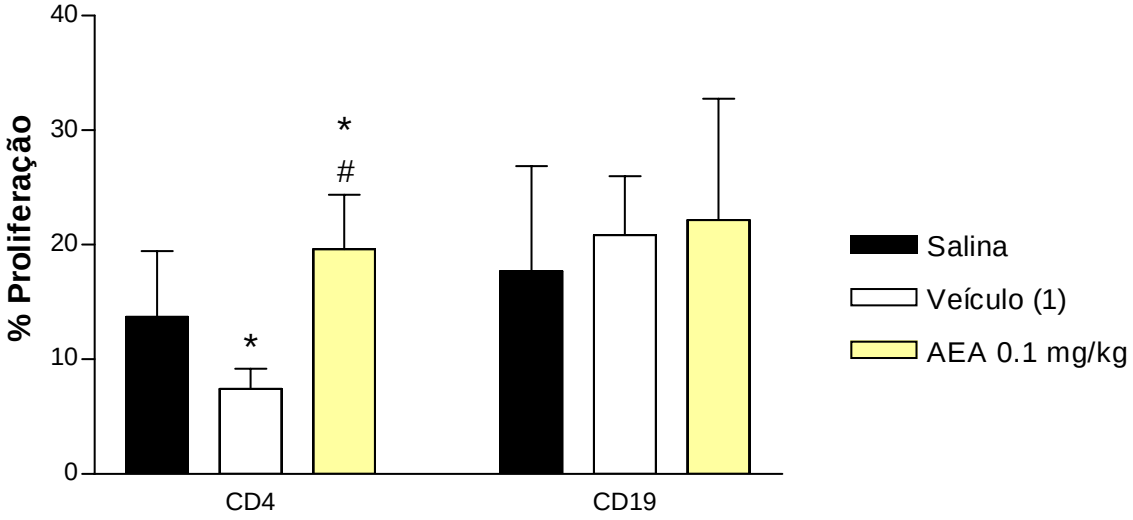

Figura 14 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-1 sobre a proliferação de células não aderentes do baço de camundongos C57BL/6 submetidos ao teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH). *p<0,05 em relação ao grupo salina, # p<0,001 em relação ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo

5.5 EXPERIMENTO 5 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-1 SOBRE O PERFIL DE CITOCINAS PRODUZIDAS NA CO-CULTURA DE CÉLULAS ADERENTES E NÃO-ADERENTES DO BAÇO

Com o intuito de avaliar o perfil de citocinas presentes no sobrenadante das co-culturas descritas no experimento anterior, foram realizadas quantificações de IL-4 e IFN-γ pelo método de ELISA, conforme descrito no item 4.8.

RESULTADOS

A **tabela 7** mostra os efeitos da administração de 0,1 mg/kg de AEA sobre a produção de citocinas coletadas do sobrenadante da co-cultura de células aderentes e não-aderentes do baço de animais submetidos ao teste de DTH. A análise dos dados mostrou ausência de diferenças entre os dados dos diferentes grupos avaliados tanto para IFNγ ($F(2,21)=2,608$) como para IL-4 ($F(2,21)=1,639$).

Tabela 7 - Efeitos da administração aguda de 0.1 mg/kg de AEA diluída no veículo-1 sobre o perfil de citocinas na co-cultura de células aderentes e não aderentes do baço de camundongos C57BL/6 submetidos ao teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)

	Grupos		
Citocinas	**Salina**	**Veículo-1**	**0.1mg/kg**
IFN-γ	46,18±53,64	28,75±22,23	41,20±21,27
IL-4	3,83±0,60	4,12±0,97	3,40±0,72

Os dados representam a média±DP (desvio padrão) em ng/mL. p>0,05 em relação ao grupo salina e ao grupo veículo-1 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo.

5.6 EXPERIMENTO 6 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-2 SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA (DTH)

Repetiu-se a avaliação dos efeitos da AEA sobre a resposta de DTH tendo em vista os efeitos do veículo-1 observados nos experimentos número 2, 3 e 4.

Vinte e sete camundongos foram separados ao acaso em 3 grupos iguais: um grupo Salina, um grupo Veículo-2 e um grupo experimental (E). Os animais do grupo experimental foram tratados pela via intraperitoneal com AEA 0,1 mg/kg diluída em veículo-2; os animais dos grupos controle receberam volume idêntico (0,1 mL/10g) de solução salina 0,9% e de veículo-2 da AEA. Noventa minutos após os tratamentos, os animais receberam por via subcutânea uma dose de 50μg/animal de OVA. Após sete dias, os animais foram desafiados com uma injeção de OVA agregada a 4% no coxim plantar da pata esquerda. O tamanho da pata (cm) foi medido imediatamente antes do desafio, sendo usado como parâmetro de comparação para as medições feitas posteriormente, em 1, 6, 24 e 48 horas para verificação do processo inflamatório inicial e do estabelecimento da DTH conforme descrito no item 4.6.

RESULTADOS

A **tabela 8** mostra os efeitos da administração de 0,1 mg/kg de AEA diluída no veículo-2, previamente a um desafio imunológico com OVA, sobre o aumento do tamanho da pata de animais posteriormente desafiados com o mesmo antígeno no teste de DTH. A análise dos dados mostrou diferenças significantes entre os dados dos diferentes grupos avaliados. Os animais de todos os grupos apresentaram uma reação inflamatória inicial de intensidade semelhante até 6 horas após o desafio antigênico, sendo a reação inflamatória revertida após 24 horas. Após 48 horas, no entanto, foi observado um aumento no tamanho da pata dos animais tratados com AEA 0,1 mg/kg ($F(2,22)=9,652$; $p<0,001$). A **figura 15** ilustra esses resultados.

Tabela 8 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-2 sobre o aumento do tamanho da pata de camundongos C57BL/6 no teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)

	Grupos		
Tempos	**Salina**	**Veículo-2**	**0.1mg/kg**
1 hora	0,1060±0,032	0,0778±0,0667	0,10±0,0354
6 horas	0,1440±0,0496	0,1220±0,05650	0,183±0,0710
24 horas	0,0812±0,0372	0,0778±0,0441	0,0889±0,0330
48 horas	0,0687±0,0259	0,0375±0,0230	0,094±0,0301**

Os dados representam a média±DP (desvio padrão) em cm. **p<0,001 em relação ao grupo veículo-2 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo.

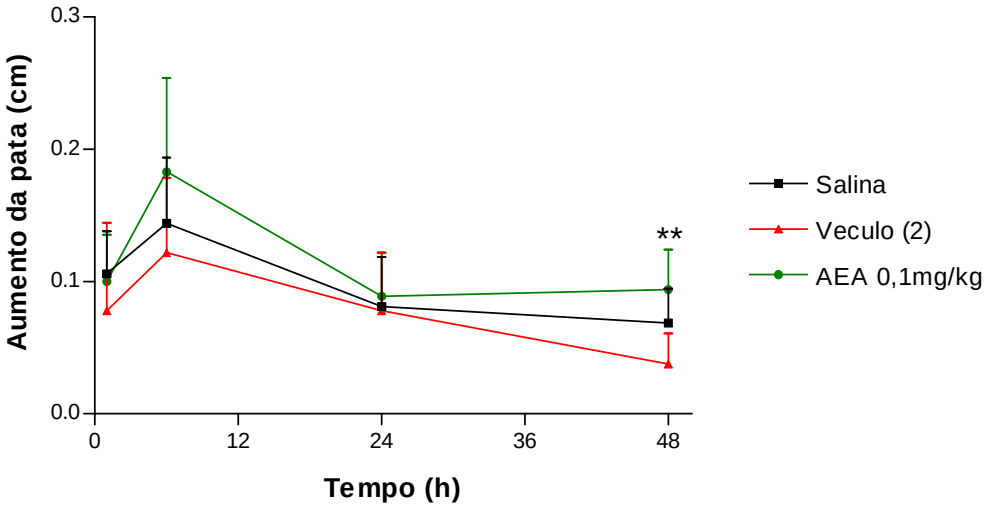

Figura 15 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-2 sobre o aumento do tamanho da pata de camundongos C57BL/6 no teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH). **p<0,001 em relação ao grupo veículo-2 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo

5.7 EXPERIMENTO 7 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-2 SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS ANTÍGENO-ESPECÍFICA

Repetiu-se a avaliação dos efeitos da AEA sobre a Proliferação de Linfócitos tendo em vista os efeitos do veículo-1 observados nos experimentos número 2, 3 e 4.

Ao final das 48 horas, os animais utilizados no item 4.6 foram submetidos à eutanásia e seus baços removidos e processados para avaliações *in vitro*, conforme descrito no item 4.7.

RESULTADOS

A **tabela 9** mostra os efeitos da administração de 0,1 mg/kg de AEA diluída no veículo-2 sobre a proliferação de linfócitos antígeno-específica de animais submetidos ao teste de DTH. A análise dos dados mostrou um aumento significante na porcentagem de proliferação de linfócitos T CD4+ provenientes de animais tratados com 0,1 mg/kg de AEA ($F(2,21)=8,661$; $p<0,01$) quando comparados aos do grupo salina e do grupo veículo-2. Um dado importante e que deve ser notado é que utilizando-se o novo veículo-2 não se observaram diferenças estatísticas entre os dados dos animais tratados com o mesmo e aqueles do grupo salina. Com relação à

proliferação de linfócitos B CD19+, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (F(2,19)=0,4492). A **figura 16** ilustra esses resultados.

Tabela 9 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-2 sobre a proliferação de células não aderentes do baço de camundongos C57BL/6 submetidos ao teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)

	Grupos		
Fenótipo	**Salina**	**Veículo-2**	**0.1mg/kg**
CD 4+	34,72±3,39	36,97±7,80	45,72±3,43*
CD 19+	36,77±7,25	41,17±8,38	39,63±10,33

Os dados representam a média±DP (desvio padrão). *p<0,01 em relação ao grupo salina e ao grupo veículo-2 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo.

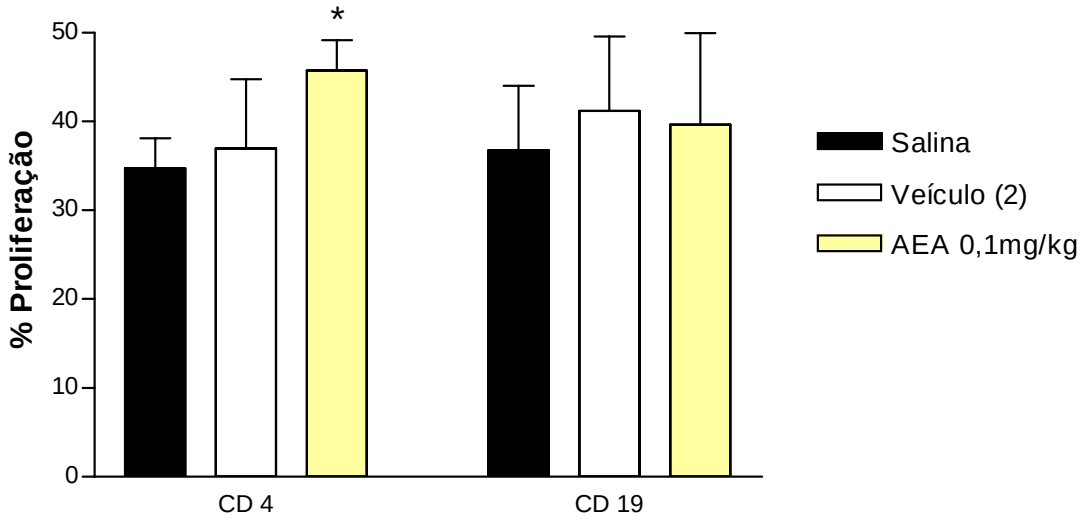

Figura 16 - Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-2 sobre a proliferação de células não aderentes do baço de camundongos C57BL/6 submetidos ao teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH). *p<0,01 em relação ao grupo salina e ao grupo veículo-2 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo

5.8 EXPERIMENTO 8 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-2 SOBRE O PERFIL DE CITOCINAS PRODUZIDAS NA CO-CULTURA DE CÉLULAS ADERENTES E NÃO-ADERENTES DO BAÇO

Repetiu-se a avaliação dos efeitos da AEA sobre o perfil de citocinas presentes no sobrenadante da co-cultura de células aderentes e não aderentes do baço, tendo em vista os efeitos do veículo-1 observados nos experimentos número 2, 3 e 4.

Com o intuito de avaliar o perfil de citocinas presentes no sobrenadante das co-culturas descritas acima, foram realizadas as quantificações de IL-4 e IFN-γ pelo método de ELISA, conforme descrito no item 4.8.

RESULTADOS

A **tabela 10** mostra os efeitos da administração de 0,1 mg/kg de AEA sobre a produção de citocinas coletadas do sobrenadante da co-cultura de células aderentes e não-aderentes do baço de animais submetidos ao teste de DTH. A análise dos dados mostrou ausência de diferenças entre os dados dos diferentes grupos avaliados.

Tabela 10- Efeitos da administração aguda de AEA (0.1 mg/kg) diluída no veículo-2 sobre o perfil de citocinas na co-cultura de células aderentes e não aderentes do baço de camundongos C57BL/6 submetidos ao teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)

	Grupos		
Citocinas	**Salina**	**Veículo-2**	**0.1mg/kg**
IFN-γ	25,92±6,64	22,96±8,44	22,07±3,53
IL-4	5,00±0,89	5,64±1,49	6,33±2,64

Os dados representam a média±DP (desvio padrão) em ng/mL. p>0,05 em relação ao grupo salina e ao grupo veículo-2 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo.

5.9 EXPERIMENTO 9 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 0,1 MG/KG DE AEA DILUÍDA NO VEÍCULO-2 SOBRE O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS AVALIADOS 90 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO

Vinte e sete camundongos foram separados ao acaso em 3 grupos iguais: um grupo Salina, um grupo Veículo-2 e um grupo experimental (E). Os animais do grupo experimental foram tratados pela via intraperitoneal com 0,1 mg/kg de AEA e os animais dos grupos controle receberam volume idêntico (0,1 mL/10g) de solução salina 0,9% e do veículo-2 da AEA. Noventa minutos após as administrações, os animais foram colocados individualmente no centro da arena do campo aberto para a medida da atividade geral conforme item 4.4.1. Após 5 minutos de observação no campo aberto, os animais foram retirados e colocados no labirinto em cruz elevado para avaliação dos níveis de ansiedade, por mais 5 minutos conforme descrito no item 4.4.2.

RESULTADOS

A **tabela 11** mostra os efeitos da administração aguda de 0,1 mg/kg de AEA diluída no veículo-2 sobre a distância total percorrida (média), o tempo em movimento na arena, a distância movida e o tempo gasto nas zonas periférica (tigmotáxica + externa) e central (média + interna) do campo aberto. A análise dos resultados mostrou um aumento significante do tempo em movimento na zona periférica ($F(2,21)=4,843$; $p<0,05$) e uma diminuição significante no tempo em

movimento na zona central (F(2,21)=5,630; p<0,01) do aparelho. Não foram observadas diferenças significantes para os outros parâmetros. A **figura 17** ilustra esses resultados.

Tabela 11 - Efeitos da administração aguda de AEA 0,1 mg/kg diluída no veículo-2 sobre a atividade locomotora de camundongos C57BL/6 observados no campo aberto

	Grupos		
Parâmetros[A]	**Salina**	**Veículo-2**	**0.1mg/kg**
DT **(cm)**	0,948±0,292	1,153±0,361	1,086±0,261
DZP (cm)	0,931±0,284	1,070±0,332	1,011±0,239
DZC (cm)	1,024±0,373	1,398±0,522	1,392±0,454
TM (s)	237,60±33,34	250,26±26,62	244,99±22,42
TZP (s)	140,86±24,63	176,09±38,90	195,38±35,40*
TZC (s)	85,65±34,83	74,17±16,55	46,69±7,71**

Os dados representam a média±DP (desvio padrão). * p<0,05 em relação ao grupo salina, ** p<0,01 em relação ao grupo salina; dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n= 9 animais/grupo.

[A]DT=distância total movida na arena, DZP=distância movida na zona periférica, DZC=distância movida na zona central, TM=tempo em movimento na arena, TZP=tempo em movimento na zona periférica, TZC=tempo em movimento na zona central.

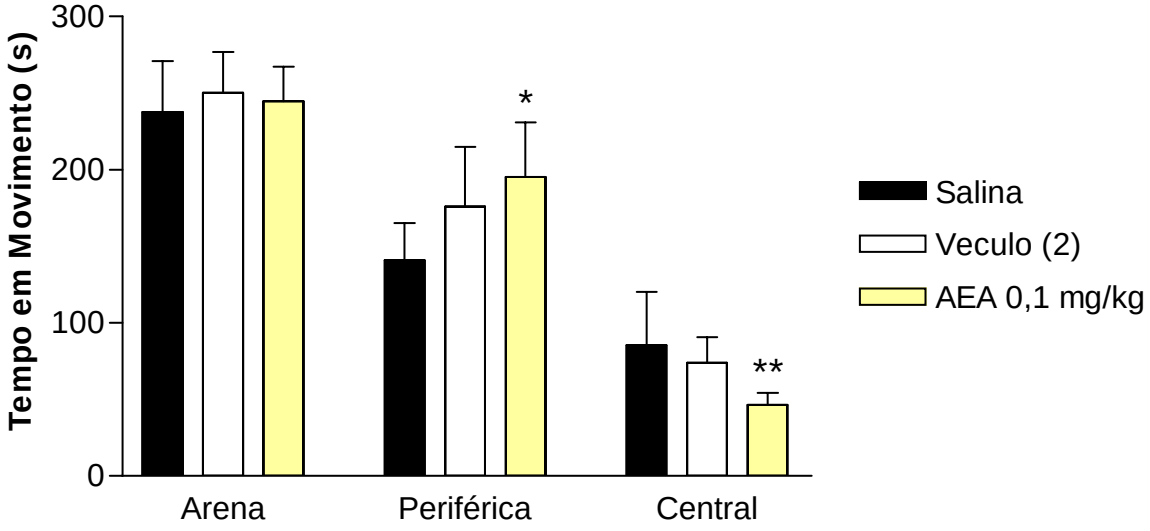

Figura 17 – Efeitos da administração aguda de AEA 0,1 mg/kg diluída no veículo-2 sobre a atividade locomotora de camundongos C57BL/6 observados no campo aberto. * p<0,05 em relação ao grupo salina, ** p<0,01 em relação ao grupo salina; dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações n=9 animais/grupo

A **tabela 12** mostra os efeitos da administração aguda de 0,1 mg/kg de AEA diluída no veículo-2 sobre a velocidade média, freqüência de levantar e o número de *grooming* de camundongos C57BL/6 observados no campo aberto. A análise dos dados não mostrou diferenças entre os dados dos grupos avaliados (VM – F(2,22)=1,040; FL – F(2,22)=1,262; NG – F(2,21)=0,4755).

Tabela 12 - Efeitos da administração aguda de AEA 0,1 mg/kg diluída no veículo-2 sobre a velocidade média, freqüência de levantar e o número de *grooming* de camundongos C57BL/6 observados no campo aberto

	Grupos		
Parâmetros[A]	**Salina**	**Veículo-2**	**0.1mg/kg**
VM (cm/s)	5,686±1,76	6,920±2,17	6,166±1,24
FL (n)	22,14±8,39	27,89±10,31	30,56±12,28
NG (n)	2,249±1,81	1,875±0,83	2,667±2,12

Os dados representam a média±DP (desvio padrão). p>0,05 em relação ao grupo salina e ao grupo veículo-2 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n= 9 animais/grupo.

[A]VM=velocidade média da locomoção na arena, FL=freqüência de levantar, NG=número de *grooming*.

A **tabela 13** mostra os efeitos da administração aguda de 0,1 mg/kg de AEA diluída no veículo-2 sobre a porcentagem de entradas e a porcentagem de tempo de permanência de camundongos C57BL/6 nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado. A análise dos dados não mostrou diferenças entre os dados dos grupos avaliados (%EBA – F(2,20)=0,3351; %EBF – F(2,21)=0,1694; %TBA – F(2,16)=0,4893; %TBF – F(2,16)=0,4893).

Tabela 13 - Efeitos da administração aguda de AEA 0,1 mg/kg diluída no veículo-2 sobre a porcentagem de entradas e a porcentagem de tempo de permanência de camundongos C57BL/6 nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado

	Grupos		
Parâmetros[A]	**Salina**	**Veículo-2**	**0.1mg/kg**
%EBA	29,909±19,31	26,499±4,83	32,454±13,15
%EBF	70,093±19,31	73,50±4,83	69,566±13,71
%TBA	8,625±6,92	8,475±6,98	11,964±7,75
%TBF	91,375±6,92	91,525±6,98	88,036±7,75

Os dados representam a média±DP (desvio padrão). p>0,05 em relação ao grupo salina e ao grupo veículo-2 dentro do mesmo parâmetro, ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n= 9 animais/grupo.

[A]%EBA=porcentagem de entradas nos braços abertos, %EBF=porcentagem de entradas nos braços fechados, %TBA=porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos, %TBF=porcentagem de tempo de permanência nos braços fechados.

6 DISCUSSÃO

De forma muito similar ao que ocorre com outros canabinóides, os efeitos comportamentais da AEA foram dependentes da dose administrada. Nossos resultados mostraram, no campo aberto, e 10 minutos após a administração de AEA na dose de 0,01 mg/kg (1) um aumento da distância movida e um aumento no tempo gasto em movimento na arena, em especial, na zona central do aparelho, e um aumento da freqüência de levantar. Após as doses de 1,0 e 10,0 mg/kg de AEA observou-se (2) uma diminuição da distância movida na zona periférica e (3) um aumento da distância movida na zona central do aparelho, respectivamente. A dose 0,1 mg/kg de AEA produziu (4) um aumento da distância movida e um aumento do tempo gasto em movimento na zona central do aparelho. No labirinto em cruz elevado, nossos resultados mostraram que a administração de 0,1 e 10,0 mg/kg de AEA produziu 10 minutos após (5) um aumento da porcentagem de tempo e da porcentagem de entradas nos braços abertos e (6) uma diminuição da porcentagem de tempo e da porcentagem de entradas nos braços fechados do aparelho.

Corroborando com dados da literatura, observou-se em nosso trabalho (7) um aumento dos níveis séricos de corticosterona nos animais tratados com AEA nas doses de 0,1 e 1,0 mg/kg quando comparados com o grupo veículo-1 e com o grupo salina; no entanto, constatou-se em nossos experimento um aumento destes níveis nos animais do grupo veículo-1 em relação aos do grupo tratados com salina, 45 minutos após a administração. Noventa minutos após a administração de AEA na dose de 0,1 mg/kg observou-se (8) um aumento ainda maior dos níveis séricos de corticosterona quando comparados aos obtidos nos animais dos grupos veículo-1 e

salina; observou-se, também, que não havia diferenças entre os dados provenientes dos animais administrados com AEA 1,0 mg/kg quando comparados com o grupo veículo-1, estando os dados de ambos os grupos aumentados em relação aos do grupo salina.

A partir da dosagem dos níveis séricos de corticosterona, padronizou-se a dose (AEA 0,1 mg/kg) e o tempo (90 minutos) para os experimentos posteriores. Assim, observou-se nestas condições (9) um aumento da proliferação de linfócitos T CD4, provenientes do baço de animais tratados com AEA 0,1 mg/kg antes de uma imunização com OVA, quando comparados com os grupos veículo-1 e salina. É importante observar que o veículo-1 *per se* diminuiu de forma significante a proliferação de linfócitos quando comparada com aquela do grupo salina, o que nos levou a repetir os experimentos com outra proporção dos componentes do veículo-1 (vide justificativa no item 4.2). Após a repetição do ensaio observou-se, novamente, (10) um aumento da proliferação de linfócitos T CD4 nos animais tratados com 0,1 mg/kg de AEA , injetada 90 minutos antes da imunização. Observou-se, também, (11) um aumento da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) nos animais tratados com 0,1 mg/kg de AEA, quando comparados com os grupos veículo-2 e salina. De fato, com a utilização do veículo-2 não foram observadas diferenças entre os animais tratados com o veículo-2 quando comparados aos do grupo salina.

Por fim, pareceu-nos necessária uma avaliação no campo aberto e no labirinto em cruz elevado dos efeitos da administração da AEA na dose de 0,1 mg/kg diluída no veículo-2 feita também 90 minutos após a administração. Nossos resultados mostraram, no campo aberto, (13) um aumento do tempo gasto em movimento na zona periférica e uma diminuição do mesmo na zona central do aparelho, quando comparado aos animais tratados com veículo-2 e salina.

No contexto da presente discussão, é importante ressaltar que a avaliação comportamental dos animais foi realizada em uma sala fracamente iluminada e sem ruídos, e que os dados foram adquiridos por meio de uma câmera de vídeo instalada dentro da sala. Desta forma, a presença do observador não interferiu com a manifestação do comportamento dos animais. Assim, como as observações no campo aberto foram realizadas na vigência de baixos níveis de estimulação ambiental, pode-se dizer que representaram muito mais os efeitos da AEA do que as respostas emocionais comumente analisadas neste aparelho em condições de alta estimulação ambiental (PARE; GLAVIN, 1993). Neste sentido, infere-se a existência de níveis elevados de emocionalidade e/ou ansiedade no campo aberto pela preferência dos animais em mover-se na área periférica (externa + tigmotáxica) do aparelho (BARNETT, 1958; GROSSEN; KELLEY, 1972; BERNARDI; 1978) e/ou pela diminuição da atividade exploratória (LISTER, 1987).

Os efeitos bifásicos da ação de canabinóides em relação à dose usada começaram a ser sugeridos há mais de três décadas. No entanto, poucos trabalhos examinaram os efeitos da AEA sobre a atividade geral dos animais avaliada no campo aberto e sobre os níveis de ansiedade medida no labirinto em cruz elevado, feitas tanto em separado como seqüencialmente. Nossos resultados obtidos no campo aberto mostraram que doses mais baixas de AEA (0,01mg/kg) aumentaram a atividade exploratória dos animais, como caracterizado por um aumento da distância movida e do tempo gasto em movimento na arena e, também, por um aumento da freqüência de levantar (exploração vertical). É importante observar que a administração de AEA na dose 0,1 mg/kg aumentou a distância percorrida e o tempo gasto em movimento na zona central do aparelho, o que sugere uma diminuição dos níveis de ansiedade destes animais. Deve-se notar, neste sentido, que os resultados

que obtivemos neste aparelho mostraram um perfil dependente da dose usada do canabinóide revelando-se, no final do experimento, um padrão de curva em U invertido. Entretanto, a dose mais alta de AEA utilizada em nosso trabalho (10,0 mg/kg) não diminuiu a atividade exploratória dos animais, tendo efeito muito similar à do veículo-1, exceto pelo aumento observado na distância movida na zona central do campo aberto.

Corroborando com nossos achados Sulcova, Mechoulam e Fride (1998) mostraram, empregando uma dose de AEA semelhante a uma das utilizadas neste trabalho (0,01mg/kg), um aumento da atividade locomotora e também da freqüência de levantar dos animais; já quando usaram doses mais elevadas (10 e 100 mg/kg) observaram exatamente o oposto (SULCOVA; MECHOULAM; FRIDE, 1998). Desta forma, assim como em nosso trabalho, a ação dos canabinóides manifestou-se de uma forma dependente da dose em um padrão de curva em U invertido. Destaque-se ter sido esse o único trabalho encontrado na literatura que avaliou as ações da AEA no campo aberto.

Alguns trabalhos vêm mostrando efeitos de agonistas canabinóides, inibidores da recaptura e da degradação de AEA sobre os níveis de ansiedade medida no labirinto em cruz elevado (ONAIVI et al., 1990; CHAKRABARTI; EKUTA; ONAIVI, 1998; BORTOLATO et al., 2006; PATEL; HILLARD, 2006; MOREIRA; AGUIAR; GUIMARÂES, 2007; MOREIRA et al., 2007[2]). Neste contexto, resultados contraditórios vêm sendo observados em relação aos efeitos destes fármacos sobre a ansiedade. Especificamente, estes efeitos parecem depender das propriedades farmacológicas e da seletividade dos ligantes utilizados, da dose, da espécie e da

[2]MOREIRA, F. A.; KAISER, N.; MONORY, K.; LUTZ, B. Reduced anxiety-like behavior induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors, **Neuropharmacology** (2007), doi:10.1016/j.neuropharm.2007.07.005

linhagem, da exposição a um estímulo estressor ou do estado basal de atividade do SNC, entre várias outras variáveis (VIVEROS; MARCO; FILE, 2005).

Nossos resultados no LCE, mostraram em animais expostos previamente ao campo aberto e, 10 minutos após as doses de 0,1 e 10,0 mg/kg de AEA, uma diminuição na porcentagem de tempo de permanência e na porcentagem de entradas nos braços fechados; mostraram, também, um aumento produzido por essas doses de AEA na porcentagem de tempo de permanência e na porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE. Desta forma, é possível inferir que estas doses de AEA produziram um efeito semelhante àqueles dos benzodiazepínicos no LCE. Corroborando com nossos resultados, um trabalho mais recente mostrou que a AEA e um análogo mais potente dela, quando injetados na área cinzenta periaqueductal produzem 10 minutos após, um aumento da porcentagem de tempo de permanência e da porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE. Mostrou-se, também, que a administração previa de um inibidor da recaptura de AEA (AM404) potencializou e que a administração previa de um antagonista canabinóide de receptor CB1 (AM251) preveniu os efeitos da AEA no LCE (MOREIRA; AGUIAR; GUIMARÂES, 2007). Assim, nossos resultados, juntamente com os da literatura, sugerem que AEA produza um efeito ansiolítico, o que nos leva a crer que este fármaco administrado pela via i.p., nas doses supracitadas, seja, de fato, o responsável pelos efeitos comportamentais que observamos. Nesse sentido, o efeito se daria, principalmente, através da ligação da AEA com receptores CB1. No entanto, é importante observar que dados de outro trabalho mostraram ser a administração de AEA nas doses de 1,0 e 10mg/kg incapaz de produzir efeitos diferenciais no número de entradas e no tempo gasto nos braços fechados do labirinto em cruz elevado 10 minutos após a administração; esse trabalho mostrou,

no entanto, uma tendência de redução do número de entradas e do tempo gasto por esses animais na exploração dos braços abertos desse aparelho, o que indicaria um efeito ansiogênico da AEA (CHAKRABARTI; EKUTA; ONAIVI, 1998).

Parece-nos, desta forma, interessante que se compare também nossos achados com dados de literatura mais recentes e que foram obtidos com inibidores da recaptura e da degradação da AEA no SNC, que permitem que os níveis de AEA estejam aumentados nas sinapses cerebrais em áreas principalmente relacionadas aos comportamentos emocionais (FEGLEY et al., 2005; BORTOLATO et al., 2006). Em um experimento mostrou-se a ação de um inibidor da recaptura de AEA (AM404) sobre o comportamento dos animais no LCE, no teste de esquiva defensiva e em parâmetros de vocalização ultra-sônica. A análise dos dados mostrou no LCE um aumento da porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, no teste de esquiva defensiva um maior tempo na parte aberta e um menor tempo de latência para acessar a parte aberta do aparato, e uma menor emissão de vocalização ultra-sônicas nos animais tratados com AM404. Todos estes efeitos foram prevenidos, parcial ou totalmente, pelo uso de um antagonista de receptor CB1 (SR141716) (BORTOLATO et al., 2006). Finalmente, em outro trabalho mostrou-se que animais *knockout* para a enzima de degradação dos endocanabinóides a FAAH (*Fatty acid amide hydrolise*) são menos ansiosos que os animais “selvagens”, sendo isto caracterizado por uma maior porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos do LCE, além de uma maior porcentagem de tempo gasto no lado claro da caixa claro-escuro; todos estes efeitos foram prevenidos pelo uso de um antagonista canabinóide (SR141716). Mostrou-se, também, um efeito ansiolítico de um inibidor da FAAH (URB597) caracterizado pelo aumento da porcentagem de tempo gasto e

do número de entradas nos braços abertos do LCE, sendo este efeito prevenido pelo uso de SR141716 (MOREIRA et al., 2007).

Neste sentido, avaliamos os efeitos da dose 0,1 mg/kg de AEA sobre parâmetros comportamentais no campo aberto e no LCE após 90 minutos da administração. Empregamos esse intervalo de tempo para a avaliação devido a resultados preliminares relativos aos efeitos aos efeitos dessa droga sobre os níveis de corticosterona. Desta forma, observamos que para a maioria dos parâmetros avaliados não se encontraram diferenças marcantes entre os grupos testados ou não com AEA, uma vez que somente observamos um aumento do tempo gasto em movimento na zona periférica e uma diminuição daquele gasto em movimento na zona central do aparelho. Estes resultados, de certa forma, caracterizariam um efeito ansiogênico do fármaco, 90 minutos após a sua administração, nos animais uma vez que eles preferiram mover-se mais na zona periférica que na zona central. Uma hipótese explicativa para estes achados envolveria a atividade do eixo HHA, em especial, dos níveis de aumentados corticosterona (GENTSCH; LICHTSTEINER; FEER, 1981) e não uma ligação da AEA aos seus receptores no SNC, já que a meia vida desta substância foi especificada como sendo de aproximadamente 10 minutos (FRIDE; MECHOULAM, 1993). No entanto, é necessário lembrar que a modulação induzida por ela em um sistema de neurotransmissão ligado à expressão comportamental de ansiedade possa ter permanecido, revelando efeitos mensuráveis mesmo após sua remoção do plasma (VIVEROS; MARCO; FILE, 2005).

Neste sentido, os canabinóides têm a capacidade de modificar a liberação de uma série de hormônios hipofisários. Destaque-se, neste contexto, ações sobre os hormônios do eixo HHA: CRH, ACTH e corticosterona. Os canabinóides, de maneira

geral, têm a capacidade de ativar o eixo HHA e, conseqüentemente, de aumentar os níveis periféricos de corticosterona e de ACTH. Nossos resultados mostraram, 45 minutos após a administração, um aumento substancial dos níveis séricos de corticosterona em animais tratados com 0,1 e 1,0 mg/kg de AEA e, também, um aumento dos níveis de corticosterona dos animais tratados com o veículo-1 quando comparados com os animais tratados com salina. Neste sentido, os níveis de corticosterona dos animais tratados com AEA na dose de 0,1 mg/kg continuaram a aumentar e aqueles provenientes dos animais tratados com 1,0 mg/kg de AEA diminuíram, equiparando-se aos níveis medidos nos animais tratados com o veículo-1; todavia, esses valores ainda continuavam aumentados em relação aos animais do grupo salina.

Corroborando com nossos resultados, mostrou-se através de técnicas de imunohistoquímica que ratos tratados com AEA por via i.p apresentavam algumas das células da parte parvocelular do PVN do hipotálamo ativadas após 45 minutos do tratamento, como caracterizado por um aumento da expressão de *c-Fos* nesse núcleo; o pico de expressão dessa proteína neste trabalho foi observado aos 90 minutos. Também foi relatado que os níveis séricos de ACTH e de corticosterona estavam aumentados após o tratamento, com pico de atividade aos 90 minutos. Por fim, demonstraram que esses efeitos eram prevenidos quando da administração de um antagonista de receptor CB1 (WENGER et al., 1997). Em contraste, mostrou-se que a administração de AEA aumentou os níveis de corticosterona e de ACTH em animais “selvagens” e em animais *knockout* para receptores CB1; todavia, o aumento desses níveis aconteceu com uma magnitude menor que aquela observada nos animais “selvagens”. Quando os animais “selvagens” foram previamente tratados com SR 141716 e com capsazepina (antagonistas do receptor CB1 e do

receptor vanilóide (VR) tipo 1, respectivamente), não se evitou o aumento dos níveis dos hormônios estudados (WENGER; LEDENT; TRAMU, 2003). Estes resultados apóiam fortemente a noção de que a ativação do eixo HHA produzida pela AEA, e também por outros canabinóides, ocorra possivelmente pela ligação destas moléculas com um possível receptor canabinóide desconhecido e presente no PVN.

A partir dessas observações e daquelas agora obtidas que mostram os efeitos da AEA no SNC e dos conhecimentos sobre neuroimunomodulação, resolvemos buscar por efeitos decorrentes da administração desta substância sobre parâmetros ligados à imunidade adquirida, mais especificamente sobre o desenvolvimento e estabelecimento de uma resposta imune celular (Th1). Para isso, tratamos os animais com 0,1mg/kg de AEA, aguardamos 90 minutos e imunizamos os animais com OVA por via s.c. Parece-nos importante ressaltar estas informações, pois os fatos ligados à hipótese explicativa dos nossos achados deveriam coincidir temporalmente com aqueles que ocorreram no momento da exposição antigênica. Nossos resultados mostraram (utilizando-se primeiramente o veículo-1 como controle), um aumento da proliferação linfocitária dos animais tratados com 0,1mg/kg de AEA em relação aos do grupo salina e do grupo veículo. No entanto, observou-se um efeito indesejado do veículo-1, pois a proliferação estava diminuída nos animais tratados com ele em relação aos do grupo salina. Não se observou qualquer efeito da administração de AEA no teste de DTH e, tampouco, se observou qualquer mudança no perfil de citocinas presentes no sobrenadante da co-cultura de células aderentes e não aderentes. Desta forma, estes resultados preliminares serviram para nortear o experimento seguinte no qual repetimos o ensaio de DTH, de proliferação de linfócitos e de citocinas, utilizando-se agora do veículo-2 para a diluição da AEA. É importante notar que observamos ausência de diferenças

significantes entre os dados provenientes do veículo-2 em relação aos do grupo salina. A análise dos dados mostrou um aumento no tamanho da pata dos animais tratados com 0,1mg/kg de AEA no ensaio de DTH (48h após o desafio antigênico). Observamos, também, um aumento da proliferação antígeno-específica de células T CD4+. Entretanto, não se verificou qualquer mudança no perfil de citocinas no sobrenadante da co-cultura. Estes resultados indicam que os animais tratados com a AEA, previamente à imunização, tiveram provavelmente um aumento de resposta Th1 quando comparados aos dos grupos controle (veículo-2 e salina).

Uma análise inicial dos dados de literatura mostra que os efeitos por nós observados com relação a este aumento da resposta Th1 dos animais tratados com AEA são de alguma forma contraditórios com aqueles obtidos em outros trabalhos que utilizaram outros agonistas canabinóides (NEWTON; KLEIN; FRIEDMAN, 1994; KLEIN et al., 2000; YUAN et al., 2002; NEWTON et al., 2004). Assim, um trabalho mostrou ocorrência uma supressão da imunidade Th1 causada pelo THC. Neste trabalho, os autores utilizaram um modelo muito similar ao aqui utilizado, pois trataram os animais com uma dose de THC, aguardaram 24h e imunizaram os animais com *Legionella pneumophila* (Lp); após um período de 3 semanas todos os animais foram desafiados com Lp sendo que os tratados com THC apresentaram um aumento da mortalidade, uma diminuição dos níveis de IgG2a e um aumento daqueles de IgG1, sendo cada anticorpo característico de um perfil de resposta Th1 e Th2, respectivamente. Observaram, ainda, que o THC produziu uma diminuição da proliferação de linfócitos antígeno-específica e uma diminuição da produção de IFN-γ e um aumento da produção de IL-4 coletadas do sobrenadante de uma cultura de esplenócitos estimulados *in vitro* por mitógeno (NEWTON; KLEIN; FRIEDMAN, 1994). Em um trabalho subseqüente, Klein et al. (2000) mostraram uma diminuição

das concentrações séricas de IL-12 e de IFN-γ, e um aumento daquela de IL-4 em uma cultura de esplenócitos; mostraram, também, que esses efeitos ocorreram em animais *knockout* para IL-4, o que apoiaria a noção de que o aumento de IL-4 que observaram não era o responsável pela diminuição dos níveis de IL-12 e de IFN-γ. Esses autores observaram ainda, que a administração de THC foi capaz de diminuir a expressão de receptores para IL-12 em células esplênicas e que a administração prévia de antagonistas CB1 e CB2 era capaz de prevenir a diminuição das concentrações séricas de IL-12 e de IFN-γ (KLEIN et al., 2000).

Buscou-se, ainda, por efeitos indiretos do THC sobre a polarização da resposta de Th1 para Th2. Neste sentido, os glicocorticóides são conhecidos por favorecer a resposta Th2 em detrimento a resposta Th1 (VISSER et al., 1998; ELENKOV; CHROUSOS, 1999). Desta forma, sabendo-se que (1) o THC ativa o eixo HHA (WEINDENFELD; FELDMAN; MECHOULAM, 1994), que (2) os glicocorticóides modulam o micro-ambiente de citocinas, de pró-inflamatório (Th1) para anti-inflamatório (Th2) (ELENKOV; CHROUSOS, 1999), e (3) que os glicocorticóides diminuem a expressão de receptores para IL-12 em células mononucleares do sangue periférico (WU et al., 1998), os autores buscaram por um possível envolvimento da corticosterona com os efeitos dos canabinóides sobre a polarização desta resposta imune. Mostraram que o THC aumentava os níveis de corticosterona com pico de atividade ao redor dos 180 minutos; mostraram, também, que o pré-tratamento com RU-486 (um antagonista de receptores dos glicocorticóides) não atenuava os efeitos do THC sobre a diminuição das concentrações séricas de IL-12 e de IFN-γ (NEWTON et al., 2004), o que sugere que os efeitos observados seriam decorrente de uma ação direta do THC sobre receptores presentes nas células imunes, descartando-se, assim, uma possível ação indireta por uma via neuroimune.

No entanto, parece-nos relevante criticar o uso do RU-486 previamente à injeção de THC já que os animais somente foram expostos à Lp 18h após a injeção do fármaco e, neste momento, a concentração sérica de corticosterona já deveria ter voltado aos seus níveis basais.

Os dados obtidos em nosso trabalho, com relação aos efeitos imunes, são contraditórios quando comparados aos acima descritos. Conforme dito anteriormente, a análise de nossos resultados mostrou um aumento da resposta de DTH e um aumento da proliferação de linfócitos antígeno-específica em animais tratados com a AEA na dose de 0,1mg;kg (após 90 minutos) previamente a uma imunização com OVA, o que poderia sugerir um aumento da resposta Th1. Mostramos, ainda, que após 90 minutos da administração de 0,1mg/kg de AEA os níveis de corticosterona estavam acentuadamente aumentados nesses animais. Uma hipótese explicativa para nossos achados poderia advir da análise crítica de dados da literatura que mostraram que níveis aumentados de glicocorticóides (oriundos de manipulações farmacológicas agudas ou de estímulos estressores), previamente a uma exposição antigênica, são capazes de aumentar e não de diminuir a resposta imune celular (DHABHAR; MCEWEN, 1997; DHABHAR; MCEWEN, 1999; DHABHAR; VISWANATHAN, 2005; VISWANATHAN; DAUGHERTY; DHABHAR, 2005; BOWERS et al., 2007[3]).

Neste sentido, alguns trabalhos vêm mostrando, através da aplicação de estímulos estressores (principalmente do estresse por imobilização), um aumento da resposta Th1 em animais de laboratório. Um trabalho encontrado na literatura mostrou que o estresse agudo (imobilização por duas horas) aumentava, enquanto que o estresse prolongado (imobilização por 6 horas durante 3, 4, e 5 semanas)

[3]BOWERS, S. L.; BILBO, S. D.; DHABHAR, F. S.; NELSON, R. J. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. **Brain, Behavior, and Immunity** (2007) doi:10.1016/j.bbi.2007.07.012

diminuia a resposta imune celular (Th1), quando aplicados imediatamente antes da sensibilização antigênica. Esta afirmação tem por base a observação do aumento da resposta de DTH no grupo dos animais estressados agudamente e, também, a constatação da ocorrência de um aumento do tráfego de leucócitos para a pele onde os animais receberam o desafio antigênico. Os autores do trabalho propuseram que esta redistribuição de leucócitos serviria para aumentar a função imune em alguns compartimentos orgânicos (pele, linfonodos, baço, medula óssea) onde os leucócitos se instalariam durante o estresse (DHABHAR; MCEWEN, 1997). Neste sentido, em um trabalho subseqüente Dhabhar e McEwen (1999) mostraram, através de adrenalectomia, que a corticosterona e, também, que a adrenalina eram responsáveis pelo aumento da resposta de DTH e pelo aumento do tráfego de leucócitos a outros compartimentos corporais. Observaram que animais adrenalectomizados não apresentavam um aumento da resposta de DTH mesmo quando estressados previamente à sensibilização antigênica e que a aplicação de baixas doses de corticosterona (5mg/kg), previamente à sensibilização, aumentava a resposta de DTH. Já a administração de adrenalina (0,5mg/kg) era, também, capaz de aumentar a resposta de DTH; todavia o fazia com magnitude diferente daquela da corticosterona. Nesse sentido, a administração concomitante dos dois hormônios nesse trabalho aumentou de forma bastante significante a resposta de DTH. Finalmente, mostrou-se que a adrenalina *per se* aumentou o tráfego de linfócitos para o linfonodo proximal à sensibilização antigênica em torno de duas vezes e que a corticosterona *per se* foi capaz de aumentar esse tráfego em pouco menos de seis vezes (DHABHAR; MCEWEN, 1999).

Neste contexto, alguns trabalhos mais recentes mostraram que componentes importantes das respostas imune inata (células dendríticas e macrófagos) e imune

adquirida (células T de memória) são mediadores do aumento da imunidade induzida por um estressor previamente a uma imunização primária (DHABHAR; VISWANATHAN, 2005; VISWANATHAN; DAUGHERTY; DHABHAR, 2005). Um trabalho mostrou um aumento nas células T de memória (CD45RA- CD62L+) e efetoras ($CD62L^{low}$ $CD44^{high}$) presentes no linfonodo escapular de camundongos 72 horas após a sensibilização antigênica em animais submetidos a um estresse agudo previamente à imunização. Mostrou-se, ainda, um aumento do número de macrófagos e linfócitos no sitio da aplicação do desafio antigênio, além de um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no mesmo sítio (TNF-α, IFN-γ e IL-2) (DHABHAR; VISWANATHAN, 2005). Aparentemente, o aumento da migração dos leucócitos ocorreu devido a uma maior expressão de quimiocinas (MIP3a e MCP-1) (VISWANATHAN; DAUGHERTY; DHABHAR, 2005).

Nossos achados mostram que AEA foi capaz de alterar diferentes parâmetros comportamentais de atividade geral e ansiedade, avaliados no campo aberto e no LCE e que o fez de forma dependente de dose e, também, do tempo após a administração. Neste contexto, pelo menos 90 minutos após sua administração a AEA na dose de 0,1 mg/kg poderia ser considerada como tendo atividade semelhante àquela de um estressor químico, pois aumentou a liberação de corticosterona e produziu um efeito ansiogênico no campo aberto, como caracterizado pelo aumento do tempo gasto na zona periférica e pela diminuição do tempo gasto na zona central do aparelho. Desta forma, possivelmente, os níveis aumentados de corticosterona no momento da sensibilização antigênica poderiam ter sido responsáveis pelo aumento da resposta imune celular (Th1), caracterizada pelo aumento da resposta de DTH e pelo aumento da proliferação linfocitária antígeno-específica agora relatadas. Não descartamos, mas achamos improvável

que tenha havido alguma contribuição do SNAS para os efeitos observados e agora relatados para a resposta imune celular, pois há trabalhos na literatura que mostram a ocorrência de uma diminuição do tônus simpático após a administração de agonistas canabinóides, como evidenciado pelo aparecimento de hipotensão, bradicardia e diminuição das concentrações plasmáticas de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) (NIEDERHOFFER et al., 2001; SZABO; NORDHEIM; NIEDERHOFFER, 2001; PFITZER; NIEDERHOFFER; SZABO, 2005). Finalmente, parece-nos que uma ação direta da AEA em células imunes possa, também, ter ocorrido. Futuros experimentos poderão responder a essas questões.

7 CONCLUSÃO

7.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

As conclusões específicas serão apresentadas em grupos.

COMPORTAMENTAIS:

Mostrou-se que a AEA produziu 10 minutos após a administração i.p.:

- ✓ Aumento da distância movida, do tempo total de movimento, do tempo gasto em movimento na zona central e da freqüência de levantar na arena do campo aberto após a dose de 0,01mg/kg.
- ✓ Aumento da distância total movida e do tempo gasto em movimento na zona central do campo aberto após a dose de 0,1mg/kg.
- ✓ Aumento da distância movida na zona central do campo aberto após a dose de 10,0mg/kg.
- ✓ Aumento nas porcentagens de entradas e do tempo gasto no LCE após as doses de 0,1 e 10,0 mg/kg.
- ✓ Diminuição nas porcentagens de entradas e de tempo gasto no LCE após as doses de 0,1 e 10,0 mg/kg.

Observamos, ainda, que a administração de 0,1mg/kg de AEA produziu 90 minutos após a administração i.p.:

✓ Aumento do tempo gasto em movimento na zona periférica e diminuição do tempo gasto em movimento na zona central do campo aberto.

ENDÓCRINOS:

A administração i.p. de 0,1 e 1,0 mg/kg de AEA :

✓ Aumento nos níveis séricos de corticosterona 45 minutos após a administração de AEA nas doses de 0,1 e 1,0 mg/kg com relação aos grupos veículo-1 e salina.

✓ Aumento nos níveis séricos de corticosterona 90 minutos após a administração de AEA na dose de 0,1mg/kg com relação aos grupos veículo-1 e salina.

IMUNIDADE ADQUIRIDA:

A administração de 0,1mg/kg de AEA 90 minutos antes da sensibilização antigênica produziu:

- ✓ Aumento da porcentagem de proliferação antígeno-específica de linfócitos T CD4+ do baço com relação aos grupos veículo-1 e salina. No entanto, a porcentagem de proliferação do grupo veículo-1 estava diminuída com relação ao grupo salina.
- ✓ Aumento da resposta de DTH com relação aos grupos veículo-2 e salina.
- ✓ Aumento da porcentagem de proliferação antígeno-específica de linfócitos T CD4+ do baço com relação aos grupos veículo-2 e salina

7.2 CONCLUSÃO GERAL

Tomados em seu conjunto, esses achados sugerem de forma pioneira que a AEA tenha produzido alterações comportamentais, endócrinas e imunológicas, muito provavelmente por modificar a atividade do eixo neuroimune, atuando assim de forma análoga a um estressor químico. Desta perspectiva, os efeitos da AEA sobre o aumento da resposta imune celular seriam decorrentes de uma ação indireta via ativação do eixo HHA e aumento dos níveis de corticosterona, uma vez que no momento da sensibilização antigênica as concentrações plasmáticas de AEA seriam inexistentes. No entanto, não se pode descartar totalmente uma ação direta da AEA nos receptores CB2 presentes nas células imunes.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, S. K.; MARSHALL Jr, G. D.. Dexamethasone promotes type 2 cytokine production primarily through inhibition of type 1 cytokines. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 21, n. 3, p. 147-155, 2001.

ARÉVALO, C.; DE MIGUEL, R.; HERNÁNDEZ-TRISTÁN, R. Cannabinoid effects on anxiety-related behaviours and hypothalamic neurotransmitters. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 70, n. 1, p. 123-131, 2001.

BARNETT, S. A. Behaviour of wild rats in the laboratory. **Medicine and Biology Illustrate,** v. 6, n. 2, p.104-111, 1956.

BARNETT, S. A. Exploratory behaviour. **British Journal of Psychology,** v. 49, n. 4, p. 289-310, 1958.

BASSO, A. S.; COSTA-PINTO, F. A.; GIORGETTI, B. L. R.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Neural pathways involved in food allergy signaling in the mouse brain: role of capsaicin-sensitive afferents. **Brain Research,** v. 1009, n. 1-2, p. 181 – 188, 2004.

BASSO, A. .S.; COSTA-PINTO, F. A.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R. G.; SÁ-ROCHA, L. C.; PALERMO NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology,** v.140, p.69-77, 2003.

BEINFELD, M. C.; CONNOLLY, K. Activation of CB1 cannabinoid receptors in rat hippocampal slices inhibits potassium-evoked cholecystokinin release, a possible mechanism contributing to the spatial memory defects produced by cannabinoids. **Neuroscience Letters**, v. 301, n. 1, p. 69-71, 2001.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavior Brain Research,** v. 125, n. 1-2, p.141-149, 2001.

BERNARDI, M.M. **Haloperidol e Atividade Geral.** 1978. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciecnicas Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1978.

BERRENDERO, F.; MALDONADO, R. Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta (9)-tetrahydrocannabinol. **Psychopharmacology**, v. 163, n. 1, p. 111-117, 2002.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Physiology of psychoneuroimmunology: A personal view. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 1, p. 34-44, 2007.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-Neuro-Endocrine Interactions: Facts and Hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 1, p. 64-102, 1996.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DINARELLO, C. A. Immunoregulatoru feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, v. 233, n. 4764, p. 652-654, 1986.

BESEDOVSKY, H. O.; SORKIN, E. Network of immune-neuroendocrine interactions. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 1986.

BESEDOVSKY, H. O.; SORKIN, E.; FELIX, D.; HASS, H. Hypothalamic changes the during immune response. **European Journal of Immunology,** v. 7, n. 5, p. 323-325, 1977.

BLALOCK, J. E. The immune system as a sensory organ. **Journal of Immunology**, v. 132, n. 3, p. 1067-1070, 1984.

BLALOCK, J. E. The immune system as the sixth sense. **Journal of Internal Medicine**, v. 257, n. 2, p. 126-138, 2005.

BLALOCK, J. E.; SMITH, E. M. Human leukocyte interferon: structural and biological relatedness to adrenocorticotropic hormone and endorphins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of América**, v. 77, n. 10, p. 5972-5974, 1980.

BLUTHE, R. M.; MICHAUD, B.; POLI, V.; DANTZER, R. Role of IL-6 in cytokine-induced sickness behavior: a study with IL-6 deficient mice. **Physiology and Behavior**, v. 70, n. 3-4, p. 367-373, 2000.

BORTOLATO, M.; CAMPOLONGO, P.; MANGIERI, R. A.; SCATTONI, M. L.; FRAU, R.; TREZZA, V.; LA RANA, G.; RUSSO, R.; CALIGNANO, A.; GESSA, G. L.; CUOMO, V.; PIOMELLI, D. Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. **Neuropsychopharmacology**, n. 31, n. 12, p. 2652-2659, 2006.

BRADLEY L. M.; MISHELL, R. I. Differential effects of glucocorticosteroids on the functions of helper and suppressor T lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of América**, v. 78, n. 5, p. 3155-3159, 1981.

BREIVOGEL, C. S.; CHILDERS, S. R. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. **Neurobiology of Diseases**, v. 5, n. 6, p. 417-431, 1998.

CABRAL, G. A.; STAAB, A. Effects on immune system. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 168, 385-423, 2005.

CHAKRABARTI, A.; EKUTA, J.; ONAIVI, E. S. Neurobehavioral effects of anandamide and cannabinoid receptor gene expression in mice. **Brain Research Bulletin**, v. 45, n. 1, p. 67-74, 1998.

CHUCHAWANKUL, S.; SHIMA, M.; BUCKLEY, N. E.; HARTMANN, C. B.; MCCOY, K. L. Role of cannabinoid receptors in inhibiting macrophage costimulatory activity. International Immunopharmacology, v. 4, n. 2, p. 265-278, 2004.

COHEN, S.; HERBERT, T. B. Health psychology: Psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. **Annual Reviews of Psychology**, v. 47, p. 113-142, 1996.

CONNOR, T. J.; MCNAMARA, M. G.; FINN, D.; CURRID, A.; O´MALLEY, M.; REDMOND, A. M.; KELLY, J. P.; LEONARD, B. E. Acute 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) administration produces a rapid and sustained suppression of immune function in the rat. **Immunopharmacology**, v. 38, n. 3, p. 253-260, 1998.

CONTI, A. Oncology in neuroimmunomodulation: what progress has been made? **Annals New York Academy of Science**, v. 917, p. 68-83, 2000.

COSTA-PINTO, F. A.; BASSO, A. S.; BRITTO, L. R.; MALUCELLI, B. E.; RUSSO, M. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 19, n. 1, p. 52-60, 2005.

COSTA-PINTO, F. A.; BASSO, A. S.; DE SÁ-ROCHA, L. C.; BRITTO, L. R.; RUSSO, M.; PALERMO-NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated allergy. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1088, p. 116-131, 2006.

CRADOCK, J. C.; DAVIGNON, J. P.; LITTERST, C. L.; GUARINO, A. M. An intravenous formulation of 9-tetrahydrocannabinol using a non-ionic surfactant. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 25, n. 4, p. 345, 1973.

CROXFORD, J. L.; YAMAMURA, T. Cannabinoids and the immune system: Potential for the treatment of inflammatory diseases? **Journal of Neuroimmunology**, v. 166, n. 1-2, p. 3-18, 2005.

DEVANE, W. A.; DYSARZ, F. A. I.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; HOWLETT, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 34, n. 5, p. 605-613, 1988.

DEVANE, W. A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R. G.; STEVENSON, L. A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-1949, 1992.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 11, n. 4, p. 286-306. 1997.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 96, n. 3, p. 1059-1064, 1999.

DHABHAR, F. S.; VISWANATHAN, K. Short-term stress experienced at time of immunization induces a long-lasting increase in immunologic memory. **American Journal of Physiology**, v. 289, n. 3, p. R738-R744, 2005.

DI, S.; MALCHER-LOPES, R.; HALMOS, K. C.; TASKER, J. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 4850-4857, 2003.

DOMINGUES-JUNIOR, M.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; PALERMO-NETO, J. Effects of treatment with amphetamine and diazepam on Mycobacterium bovis-induced infection in hamsters. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 22, n. 3, p.555-574. 2000.

ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 10, n. 9, p. 359-368, 1999.

ELENKOV, I. J.; PAPANICOLAOU, D. A.; WILDER, R. L.; CHROUSOS, G. P. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. **Proceedings of the Association of Americam Physicians**, v. 108, n. 5, p. 374-381, 1996.

FELTEN, D. L.; FELTEN, S. Y.; CARLSON, S. L. OLSCHOWKA, J. A.; LIVNAT, S. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. **Journal of Immunology**, v. 135, n. 2, p. 755-765, 1985.

FELTEN, D. L.; FELTEN, S. Y.; CARLSON, S. L.; OLSCHOWKA, J. A.; LIVNAT, S. FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; ANDREWS, N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT1A receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 15, p. 4810-4815, 1996.

FERRAZ DE PAULA, V. **Avaliação dos efeitos do N-metil-3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA-*Ecstasy*) sobre parâmetros comportamentais, neuroendócrinos e de atividade de neutrófilos em camundongos.** 152p, 2007**.** Dissertação (Mestrado em Ciências)-Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

FEGLEY, D.; GAETANI, S.; DURANTI, A.; TONTINI, A.; MOR, M.; TARZIA, G.; PIOMELLI, D. Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 1, p. 352-358, 2005.

FRANCHIMONT, D.; GALON, J.; GADINA, M.; VISCONTI, R.; ZHOU, Y-J.; ARINGER, M.; FRUCHT, D. M.; CHROUSOS, G. P.; O´SHEA, J. J. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibitis IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 4, p. 1768-1774, 2000.

FREUND, T. F.; KATONA, I.; PIOMELLI, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, 1017-1066, 2003.

FRIDE, E.; MECHOULAM, R. Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. **European Journal of Pharmacology**, v. 231, n. 2, p. 313-314, 1993.

FRIEDMAN, H.; NEWTON, C.; KLEIN. T. W. Microbial infections, immunomodulation, and drugs of abuse. **Clinical Microbiology Reviews**. v.16, n. 2, p. 209-219, 2003.

GAETANI, S.; CUOMO, V.; PIOMELLI, D. Anandamide hydrolysis: a new target for anti-anxiety drugs? **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 11, p. 474-478, 2003.

GALIÈGUE, S.; MARY, S.; MARCHAND, J.; DUSSOSSOY, D.; CARRIÈRE, D.; CARAVON, P.; BOUABOULA, M.; SHIRE, D.; LE FUR, G.; CASELLAS, P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. **European Journal of Biochemistry**, v. 232, n. 1, p. 54-61, 1995.

GENN, R. F.; TUCCI, S.; PARIKH, S.; FILE S. E. Unconditioned and conditioned anxiogenic effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in the social interaction test. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 77, n. 3, p. 567-573, 2004.

GENTSCH, C.; LICHTSTEINER, M.; FEER, H. Locomotor activity, defecation score and corticosterone levels during an openfield exposure: a comparison among individually and group-housed rats, and genetically selected rat lines. **Physiology & Behavior**, v. 27, n. 1, p. 183-186, 1981.

GLASS, M.; GRAGUNOW, M.; FAULL, R. L. M. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. **Neuroscience**, v. 77, n. 2, p. 299-318, 1997.

GOEHLER, L; E.; LYTE, M.; GAYKEMA, R. P. Infection-induced viscerosensory signals from the gut enhance anxiety: implications for psychoneuroimmunology. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 6, p. 721-726, 2007.

GROSSEN, N. E.; KELLEY, M. J. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. **Journal Comparative and Physiologycal Psychology,** v. 81, n. 2, p. 307-310, 1972.

HALLER, J.; BAKOS, N.; SZIRMAY, M.; LEDENT, C.; FREUND, T. F. The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. **The European Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 7, p. 1395-1398, 2002.

HASHIMOTODANI, Y.; OHNO-SHOSAKU, T.; KANO, M. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. **Neuroscientist**, v. 13, n. 2, p. 127-137, 2007.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; DE COSTA, B. R.; RICE, K. C. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. **The Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 2, p.563-583, 1991.

HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB1 receptor HU-210 following chronic stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 499, n. 3, p. 291-295, 2004.

IGNATOWSKI, T. A.; GALLANT, S.; SPLENGER, R. N. Temporal regulation by a adrenergic receptor stimulation of macrophages (m phi)-derived tumor necrosis factor (TNF) production post LPS challenge. **Journal of Neuroimmunology**, v. 65, n. 2, p. 107-117, 1996.

KATONA, I.; RANCZ, E. A.; ACSADY, L.; LEDENT, C.; MACKIE, K.; HAJOS, N.; FREUND, T. F. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 23, p. 9506-9518, 2001.

KLEIN, T. W.; NEWTON, C.; LARSEN, K.; LU, L.; PERKINS, I.; NONG, L.; FRIEDMAN, H. The cannabinoid system and immune modulation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 4, p. 486-496, 2003.

KLEIN, T. W.; NEWTON, C. A.; NAKACHI, N.; FRIEDMAN, H. Δ9-tetrahydrocannabinol treatment suppresses immunity and early IFN-γ, IL-12, and IL-12 receptor β2 responses to *Legionella pneumophila* infection. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6461-6466, 2000.

LAU, R. J.; TUBERGEN, D. G.; BARR, M.; DOMINO, E. F.; BENOWITZ, N.; JONES, R. T. Phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation in humans receiving delta9-tetrahydrocannabinol. **Science**, 1976, v. 192, n. 4241, p. 805-807, 1976.

LIGEIRO-OLIVEIRA, A. P.; FIALHO DE ARAÚJO, A. M.; LAZZARINI, R.; SILVA, Z. L.; DE NUCCI, G.; MUSCARÁ, M. N.; TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Effects of amphetamine on immune-mediated lung inflamatory response in rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, n. 3, p. 181-190, 2004.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology,** v. 92, p. 180-185, 1987.

LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, n. 1-2, p. 147-154, 2000.

MADDEN, K. S.; FELTEN, D. L. Experimental basis for neural-immune interactions. **Physiological Reviews**, v.75, n. 1, p. 77-106, 1995.

MAILLEUX, P.; VANDERHAEGHEN, J. J. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. **Neuroscience**, v. 48, n. 3, p. 655-668, 1992.

MALDONADO, R.; VALVERDE, O. Participation of the opioid system in cannabinoid-induced antinociception and emotional-like responses. **European Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 6, p. 401-410, 2003.

MARCO, E. M.; PEREZ-ALVAREZ, L.; BORCEL, E.; RUBIO, M.; GUAZA, C.; AMBROSIO, E.; FILE, S. E.; VIVEROS, M. P. Involvement of 5-HT1A receptors in behavioural effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in male rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 15, n. 1, p. 21-27, 2004.

MARÍN, S.; MARCO, E.; BISCAIA, M.; FERNANDEZ, B.; RUBIO, M.; GUAZA, C.; SCHMIDHAMMER, H; VIVEROS, M. P. Involvement of the kappa-opioid receptor in the anxiogenic-like effect of CP 55,940 in male rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 74, n. 3, p. 649-656, 2003.

MARTIN, M.; LEDENT, C.; PARMENTIER, M.; MALDONADO, R.; VALVERDE, O. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. **Psychopharmacology**, v. 159, n. 4, p. 379-387, 2002.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J.; YOUNG, A. L.; BONNER, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561-564, 1990.

MCKALLIP, R. J.; LOMBARD, C.; MARTIN, B. R.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. S. Δ9-Tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in the thymus and spleen as a mechanism of immunosuppression in vitro and in vivo. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, n. 2, p. 451-465, 2002.

MECHOULAM, R.; BEM-SHABAR, S.; HANUS, L.; LIGUMSKY, M.; KAMINSKI, N. E.; SCHATZ, A. R.; GOPHER, A.; ALMOG, S.; MARTIN, B. M.; COMPTON, D. R.; PERTWEE, R. G.; GRIFFIN, G.; BAYEWITCH, M.; BARG, J.; VOGEL, Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 83-90, 1995.

MELLON, R. D.; BAYER, B. M.; Role of central opioid receptor subtypes in morphine-induced alterations in peripheral lymphocyte activity. **Brain Research**, v. 789, n. 1, p. 56-67, 1998.

MELTZER, J. C.; MACNEIL, B. J.; SANDERS, V.; PYLYPAS, S.; JANSEN, A. H.; GREENBERG, A. H.; NANCE, D. M. Stress-induced suppression of in vivo splenic cytokine production in the rat by neural and hormonal mechanisms. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 18, n. 3, p. 262-273, 2004.

MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S.; Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 3, p. 958-965, 2007.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61-65, 1993.

NAHAS, G. G.; MORISHIMA, A.; DESOIZE, B. Effects of cannabinoids on macromolecular synthesis and replication of cultured lymphocytes. **Federation Proceedings**, v. 36, n. 5, p. 1748-1752, 1977.

NAHAS, G. G.; SUCIU-FOCA, N.; ARMAND, J. P.; MORISHIMA; A. Inhibition of cellular mediated immunity in marihuana smokers. **Science**, v.183, n. 123, p. 419-420, 1974.

NANCE, D. M.; SANDERS, V. M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 6, p. 736-745, 2007.

NAVARRO, M.; HERNÁNDEZ, E.; MUÑOZ, R. M.; DEL ARCO, I.; VILLANÚA, M. A.; CARRERA, M. R.; RODRÍGUEZ DE FONSECA, R. Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. **Neuroreport**, v. 8, n. 2, p. 491-496, 1997.

NEWTON, C. A.; KLEIN, T. W.; FRIEDMAN, H. Secundary immunity to *Legionella pneumophila* and Th1 activity are suppressed by delta-9-tetrahydrocannabinol injection. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 9, p. 4015-4020, 1994.

NEWTON, C. A.; LU, T.; NAZIAN, S. J.; PERKINS, I.; FRIEDMAN, H.; KLEIN, T. W. The THC-induced suppression of Th1 polarization in response to Legionella pneumophila infection is not mediated by increases in corticosterone and PGE2. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 76, n. 4, p. 854-861, 2004.

NIEDERHOFFER, N.; HANSEN, H. H.; FERNANDEZ-RUIZ, J. J.; SZABO, B. Effects of cannabinoids on adrenaline release from adrenal medullary cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 6, p. 1319-1327, 2001.

ONAIVI, E. S.; GREEN, M. R.; MARTÍN, B. R. Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 253, n. 3, p. 1002-1009, 1990.

PALERMO-NETO, J.; GUIMARÃES, R. Pavlovian conditioning of a lung anaphilatic response. **Life Sciences**, v. 68, n. 6, p. 611-623, 2000.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C. O.; FÁVARE, R. C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 23, n. 5 , p. 497-507, 2001.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C. O.; ROBESPIERRE DE SOUZA, W. R. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, n. 1, p. 43-54, 2003.

PARÉ. W. P.; GLAVIN, G. B. Animal models of stress in pharmacology. In: **Methods in behavioral pharmacology.** Edited by: VAN HAAREN, F. Elsevier Science Publishers, p. 413-441, 1993.

PATEL, S.; HILLARD, C. J.; Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 318, n. 1, p. 304-311, 2006.

PATEL, S.; ROELKE, C. T.; RADEMACHER, D. J.; CULLINAN, W. E.; HILLARD, C. J. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5431-5438, 2004.

PATEL, S.; WOHLFEIL, E. R.; RADEMACHER, D. J.; CARRIER, E. J.; PERRY, L. J.; KUNDU, A.; FALCK, J. R.; NITHIPATIKOM, K.; CAMPBELL, W. B.; HILLARD, C. J. The general anesthetic propofol increases brain N-arachidonylethanolamine (anandamide) content and inhibits fatty acid amide hydrolase. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 5, p. 1005-1013, 2003.

PATRINI, G.; SACERDOTE, P.; FUZIO, D.; MANFREDI, B.; PAROLARO, D. Regulation of immune functions in rat splenocytes after acute and chronic in vivo treatment with CP-55,940, a synthetic cannabinoid compound. **Journal of Neuroimmunology**, v. 80, n. 1-2, p. 143-148, 1997.

PELLEGRINO, T.; BAYER, B. M. In vivo effects of cocaine on immune cell function. **Journal of Neuroimmunology**, v. 83, n. 1-2, p. 139-147, 1998.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods,** v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PERTWEE, R. G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 74, n. 2, p. 129-180, 1997.

PFITZER, T.; NIEDERHOFFER, N.; SZABO, B. Search for an endogenous cannabinoid-mediated effect in the sympathetic nervous system. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 371, n. 1, p. 9-17, 2005.

QUAN, N.; BANKS, W. A. Brain-immune communication pathways. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 6, p. 727-735, 2007.

REICHLIN, S. Neuroendocrine-immune interactions. **The New England Journal of Medicine,** v. 329, n. 17, p. 1246-1253, 1993.

RIGHI, D. A.; PALERMO-NETO, J. Behavioral effects of type II pyrethroid cyhalothrin in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 191, n. 2, p. 167-176, 2003.

RIGHI, D. A.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on Mycobacterium bovis-induced infection in hamsters. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 9, p. 1145-1153, 1999.

RODRÍGUEZ DE FONSECA, F.; DEL ARCO, I.; BERMUDEZ-SILVA, F. J.; BILBAO, A.; CIPPITELLI, A.; NAVARRO, M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. **Alcohol & Alcoholism**, v. 40, n. 1, p. 2-14, 2005.

RODRÍGUEZ DE FONSECA, F.; RUBIO, P.; MENZAGHI, F.; MERLO-PICH, E.; RIVIER, J.; KOOB, G. F.; NAVARRO, M. Corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist [D-Phe12,Nle21,38,C alpha MeLeu37]CRF attenuates the acute actions of the highly potent cannabinoid receptor agonist HU-210 on defensive-withdrawal behavior in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 276, n. 1, p. 56-64, 1996.

ROTZINGER, S.; VACCARINO, F. J. Cholecystokinin receptor subtypes: role in the modulation of anxiety-related and reward-related behaviours in animal models. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 28, n. 3, p. 171-181, 2003.

SÁ-ROCHA, V. M.; SÁ-ROCHA, L. M.; PALERMO-NETO, J. Variations in behavior, innate immunity and host resistance to B16F10 melanoma growth in mice that present social stable hierarchical ranks. **Physiology & Behavior**, v. 88, n. 1-2, p. 108-115, 2006.

SACERDOTE, P.; MARTUCCI, C.; VACCANI, A.; BARISELLI, F.; PANERAI, A. E.; COLOMBO, A.; PAROLARO, D.; MASSI, P. The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both in vivo and in vitro. **Journal of Neuroimmunology**, v. 159, n. 1-2, p. 97-105, 2005.

SCHATZ, A. R.; LEE, M.; CONDIE, R. B.; PULASKI, J. T.; KAMINSKI, N. E. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 278-287, 1997.

SCHWARZ, H.; BLANCO, F. J.; LOTZ, M. Anandamide, an endogenous cannabinoid receptor agonist inhibits lymphocyte proliferation and induces apoptosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 55, n. 1, p. 107-115, 1994.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, p. 32. 1936.

SILVA F. R.; LAZZARINI, R.; DE SA-ROCHA, L .C; MORGULIS, M. S.; de OLIVEIRA MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of acute and long-term diazepam administrations on neutrophil activity: a flow cytometric study. **European Journal of Pharmacology** v. 478, n. 2-3, p. 97-104, 2003.

SKAPER, S. D.; BURIANI, A.; DAL TOSO, R.; PETRELLI, L.; ROMANELLO, S.; FACCI, L.; LEON, A. The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 93, n. 9, p. 3984-3989, 1996.

SMITH, E. M.; BLALOCK, J. E. A molecular basis for interactions between the immune and neuroendocrine systems. **The International Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 3-4, p. 455-464, 1988.

SULCOVA, E.; MECHOULAM, R.; FRIDE, E. Biphasic effects of anandamide. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 59, n. 2, p. 347-352, 1998.

SZABO, B.; NORDHEIM, U.; NIEDERHOFFER, N. Effects of cannabinoids on sympathetic and parasympathetic neuroeffector transmission in the rabbit heart. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 2, p. 819-826, 2001.

TOURNIER, M.; SORBARA, F.; GINDRE, C.; SWENDSEN, J. D.; VERDOUX, H. Cannabis use and anxiety in daily life: a naturalistic investigation in a non-clinical population. **Psychiatry research**, v. 118, n. 1, p. 1-8, 2003.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853-859, 2002.

TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 2, p. 289-296, 2007.

URIGÜEN, L.; PÉREZ-RIAL, S.; LEDENT, C.; PALOMO, T.; MANZANARES, J. Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. **Neuropharmacology**, v. 46, n. 7, p. 966-973, 2004.

VALVERDE, O.; NOBLE, F.; BESLOT, F.; DAUGÉ, V.; FOURNIÉ-ZALUSKI, M. C.; ROQUES, B. P. Delta9-tetrahydrocannabinol releases and facilitates the effects of endogenous enkephalins: reduction in morphine withdrawal syndrome without change in rewarding effect. **The European Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 1816-1824, 2001.

VAN SICKLE, M. D.; DUNCAN, M.; KINGSLEY, P. J.; MOUIHATE, A.; MACKIE, K.; STELLA, N.; MAKRIYANNIS, A.; PIOMELLI, D.; DAVISON, J. S.; MARNETT, L. J.; DI MARZO, V.; PITTMAN, Q. J.; PATEL, K. D.; SHARKEY, K. A. Identification and

functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. **Science**, v. 310, n. 5746, p. 329-332, 2005.

VISSER, J.; VAN BOXEL-DEZAIRE, A.; METHORST, D.; BRUNT, T.; KLOET, E. R.; NAGERKERKEN, L. Differential regulation of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by glucocorticoids in vitro. **Blood**, v. 91, n. 11, p. 4255-4264, 1998.

VISWANATHAN, K.; DAUGHERTY, C.; DHABHAR, F. S. Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 8, p. 1059-1069, 2005.

VIVEROS, M. P.; MARCO, E. M.; FILE, S. E. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 81, n. 2, p. 331-342, 2005.

WACHTEL, S. R.; ELSOHLY, M. A.; ROSS, S. A.; AMBRE, J.; DE WIT, H. Comparison of the subjective effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and marijuana in humans. **Psychopharmacology**, v. 161, n. 4, p. 331-339, 2002.

WEBSTER, J. I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E. M. Neuroendocrine regulation of immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 125-163, 2002.

WEIDENFELD, J.; FELDMAN, S.; MECHOULAM, R. Effect of the brain constituent anandamide, a canabinoid receptor agonist, on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 59, n. 2, p. 110-112, 1994.

WENGER, T.; JAMALI, K. A.; JUANÉDA, C.; LÉONARDELLI, J.; TRAMU, G. Arachidonyl ethanolamide (anandamide) activates the parvocellular part of hypothalamic paraventricular nucleus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 237, n. 3, p. 724-728, 1997.

WENGER, T.; LEDENT, C.; TRAMU, G. The endogenous cannabinoid, anandamide, activates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. **Neuroendocrinology**, v. 78, n. 6, p. 294-300, 2003.

WEXLER, B. C.; DOLGIN, A. E.; TRYCZYNSKI, E. W. Effects of a bacterial polysaccharide (Piromen) on the pituitary-adrenal axis: adrenal ascorbic acid, cholesterol and histologic alterations. **Endocrinology**, v. 61, n. 3, p. 300-308, 1957

WU, C. Y.; WANG, K.; MCDYER, J. F.; SEDER, R. A. Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 6, p. 2723-2730, 1998.

YU, Q.; ZHANG, D.; WALSTON, M.; ZHANG, J.; LIU, Y.; WATSON, R. R. Chronic methamphetamine exposure alters immune function in normal and retrovirus-infected mice. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 7, p. 951-962, 2002.

YUAN M.; KIERTSCHER, S. M.; CHENG, Q.; ZOUMALAN, R.; TASHKIN, D. P.; ROTH, M. D. Delta 9-Tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells. **Journal of Neuroimmunology**, v. 133, n. 1-2, p. 124-131, 2002.

ZUARDI, A. W.; SHIRAKAWA, I.; FINKELFARH, E.; KARNIOL, I. G. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. **Psychopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 245-250, 1982.