

CAROLINA COSTOLA DE SOUZA PAVANI

Efeitos do 2-AG, através da inibição da monoacilglicerol lipase, em
um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzida por
LPS

São Paulo

2014

CAROLINA COSTOLA DE SOUZA PAVANI

Efeitos do 2-AG, através da inibição da monoacilglicerol lipase, em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. João Palermo Neto

São Paulo
2014

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.3037
FMVZ

Pavani, Carolina Costola de Souza
Efeitos do 2-AG, através da inibição da monoacilglicerol lipase, em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS / Carolina Costola de Souza Pavani. -- 2014. 156 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo Neto.

1. Endocanabinóide. 2. JZL184. 3. Canabinóide. 4. Dano tecidual pulmonar. 6. Lipopolissacarídeo. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Efeitos do 2-AG, através da inibição da monoacilglicerol lipase, em um modelo murino de inflamação aguda pulmonar induzida por LPS”, protocolado sob o nº 2255/2011, utilizando 570 (quinhentos e setenta) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Palermo Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research “Effects of 2-AG, through inhibition of monoacylglycerol lipase, in a murine model of acute lung injury LPS-induced”, protocol number 2255/2011, utilizing 570 (five hundred and seventy) mice, under the responsibility Prof. Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 6/22/2011.

São Paulo, 16 de maio de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente



Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PAVANI, Carolina Costola de Souza

Título: Efeitos do 2-AG, através da inibição da monoacilglicerol lipase, em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Mario e Sonia, e irmã, Flavia, que me apoiaram, incentivaram e ajudaram em todas as etapas da minha formação. Em momentos de dificuldades estivemos juntos e tenho certeza que compartilharemos de muitas alegrias com mais esta conquista! Vocês são meus exemplos e espero um dia poder retribuir tudo o que me proporcionaram e ainda proporcionam. Muito obrigada! Amo muito vocês!

Ao meu amado marido Ulysses. Sempre compreensivo e atencioso; sempre disposto a ajudar. Mais uma etapa concluída com a ajuda desse parceiro! As dificuldades e incertezas sempre foram muitas até agora, mas concluímos com muita cumplicidade e carinho. Espero passar por mais, muito mais certezas e incertezas ao seu lado! Eu te amo pelo que você é! Te amo muito!

Ao querido Mestre, o Professor João Palermo Neto. Por tanta dedicação, esforço e disponibilidade. Por me aceitar como aluna e me ensinar muito! Ser sua aluna foi um imenso e satisfatório prazer! O senhor foi e ainda é uma pessoa muito importante para minha formação. Em toda essa trajetória, o senhor nos mostrou, com seu próprio exemplo, como ser uma pessoa íntegra e um ótímo profissional. Muito obrigada pela oportunidade!

Agradecimentos

À FAPESP pelo apoio ao presente trabalho (2011/10181-7) e ao projeto temático (2009/51886-3).

Ao querido amigo Alison Ribeiro pelas idéias, pela paciência e pelas técnicas ensinadas. Um ótimo profissional a quem só tenho a agradecer!

A minha querida amiga Viviane Ferraz de Paula, por toda ajuda! Por me ensinar, por compartilhar tanto conhecimento! Foram MUITOS experimentos e discussões; muito trabalho sempre acompanhado por muitas risadas e churrascos!

Aos meus amigos Atílio Calefi, Thiago Aloia, João Gimenes, Luana Vitoretti, Beatriz Golega, Bruno Honda, Adriano Zager e Vinicius Izidio que ajudaram em MUITOS trabalhos realizados e repetidos e, também, compartilharam de muitas alegrias e diversões. Tenho certeza que ainda teremos muito contato e trabalhos juntos. Vocês são ótimas pessoas, tanto no trabalhar quanto para levar uma amizade por toda a vida!

Aos amigos Milena Pinheiro, Paula Lima, Daniel Gimenes, Daniel Cohn, Denise Kinoshita, Adriana Tiemi, Wanderley, Eduardo pela excelente cia em congressos, experimentos, reuniões e churrascos.

A todo grupo de Neuroimunomodulação, pelas nossas reuniões semanais; pelas boas criticas e sugestões nos trabalhos discutidos.

Ao Professor Jackson, sempre atencioso e disposto a ajudar. Obrigada pelas aulas de histologia!

Aos Professores Cristina Massoco, Ana Paula Ligeiro de Oliveira, Adriana Lino, Luciano Felício, Frederico Costa Pinto, Wothan Tavares de Lima, Luiz Carlos de Sá

Rocha por aceitarem participar das bancas de qualificação e defesa; por participarem e contribuírem nestes importantes momentos!

Aos professores Malu, Bruno, Paulo e Claudia, pela ajuda com materiais laboratoriais e por compartilharem de seus conhecimentos.

Às professoras Silvana e Helenice por cuidarem muito bem do nosso departamento, por comandarem nossos laboratórios e pela dedicação aos alunos e funcionários da pós-graduação.

Aos técnicos de laboratório Herculano, Vagner, Nicolle, Marguiti, Jô por estarem sempre dispostos e disponíveis a ajudar nos experimentos!

Aos funcionários do biotério Idalina, Luciana, Nelson, Mauro por cuidar tão bem dos nossos animais!

Aos funcionários da secretaria Cris, Milena, Adriana por nos ajudarem no dia-a-dia, por abrirem a porta toda vez que esquecemos a carteirinha!

A todo o departamento de Patologia Experimental e Comparada, pois sem vocês nosso curso não teria alta avaliação.

RESUMO

PAVANI, C. C. S. **Efeitos do 2-AG, através da inibição da monoacilglicerol lipase, em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS.** [Effects of 2-AG, through monoacylglycerol lipase inhibition, in a murine modelo f acute lung injury LPS-induced]. 2014. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A sinalização por endocanabinóides é finalizada por meio de hidrólise enzimática; um processo que para o endocanabinóide 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) é mediado pela lipase monoacilglicerol (MAGL). O JZL184, é um fármaco que apresenta alta seletividade na inibição da MAGL. Assim, o JZL184 aumenta os níveis de 2-AG que, por sua vez, atua sobre os receptores canabinóides CB1 e CB2 produzindo diversos efeitos como, por exemplo, o anti-inflamatório. A inflamação pulmonar aguda (ALI) e a sua forma mais grave, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), em humanos, são doenças pulmonares, caracterizadas por infiltrado pulmonar bilateral com acúmulo de neutrófilos. A sepse é a causa mais comum da ALI/SDRA; aproximadamente 40% de pacientes com sépsis, também apresentam ALI ou ARDS e a ALI/ARDS são síndromes graves associadas com mortalidade superior a 40%. Considerando que não há cura para a ARDS / ALI, foi utilizado um modelo murino de ALI para averiguar se a inibição da MAGL seria capaz de aliviar os sintomas inflamatórios ou, até mesmo, promover a cura do processo. Para isso, foram analisados fatores que promovem a migração de leucócitos para o pulmão e o dano tecidual. Ainda, para avaliar se os LPS e/ou o JZL184 promoveram mudanças no sistema nervoso central, foram avaliados a atividade locomotora no campo aberto (CA), a ansiedade no labirinto (LCE), a capacidade de adaptação em CA e os níveis de glicocorticóides séricos, assim como os níveis hipotalâmicos de citocinas. Assim, o JZL184, foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) e 60 minutos depois o LPS foi instilado por via intranasal. As análises foram realizadas 6, 24 e/ou 48 horas após a indução da ALI. Observou-se que a inibição MAGL diminuiu a migração de leucócitos para os pulmões, bem como a permeabilidade vascular e o dano tecidual. O JZL184 também reduziu os níveis de citocinas e quimiocinas e o extravasamento vascular no lavado bronco alveolar (LBA), a atividade de MPO no tecido pulmonar e a expressão da molécula de adesão no sangue e no LBA. Os receptores CB1 e CB2 foram considerados como envolvidos nos efeitos anti-inflamatórios produzidos pelo JZL184 porque o AM281, um antagonista seletivo do receptor CB1, e o AM630, um

antagonista seletivo do receptor CB2, reduziram ou bloquearam os efeitos anti-inflamatórios para JZL184. O LPS e o JZL184 não promoveram comportamento doentio e tampouco alteraram os parâmetros de ansiedade. Entretanto, o LPS e/ou o JZL184 aumentaram a expressão gênica de citocinas hipotalâmicas. Concluiu-se que a inibição MAGL produziu efeitos anti-inflamatórios no modelo murino de ALI induzida por LPS, uma descoberta que foi considerada uma consequência da ativação dos receptores canabinóide CB1 e CB2. A inibição da MAGL pode ser, no futuro, uma ferramenta terapêutica relevante para o tratamento de inflamações pulmonares.

Palavras-chave: Endocanabinóide. JZL184. Canabinóide. Dano tecidual pulmonar. Lipopolissacarídeo.

ABSTRACT

PAVANI, C. C. S. **Effects of 2-AG, through monoacylglycerol lipase inhibition, in a murine model of acute lung injury LPS-induced.** [Efeitos do 2-AG, através da inibição da monoacilglicerol lipase, em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS]. 2014. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Endocannabinoid signaling is terminated by enzymatic hydrolysis, a process that, for 2-Arachidonoylglycerol (2-AG), is mediated by monoacylglycerol lipase (MAGL). The JZL184, is a drug that inhibits MAGL and presents high potency and selectivity. Thus, JZL184 increases the levels of 2-AG, an endocannabinoid that acts on the CB1 and CB2 cannabinoid receptors, and has shown anti-inflammatory effects. Acute lung injury (ALI) and its most severe form the acute respiratory distress syndrome (ARDS), in humans, are lung diseases, characterized by bilateral pulmonary infiltrate with neutrophils accumulation. The sepsis is the most common cause of ALI / ARDS; approximately 40% of patients with sepsis have also ALI or ARDS. ALI and ARDS are severe syndromes associated with mortality 40% exceeding rates. Considering that there is no cure for ARDS/ALI, we used a ALI murine model to evaluate if the MAGL inhibition was able to alleviating the inflammatory symptoms or even promote the cure. For this, factors that promote migration of leukocytes into the lungs and the tissue damage were analyzed. Still, to assess whether LPS and / or JZL184 promoted changes in the central nervous system, the locomotor activity and ability to adapt were evaluated in the open field and the anxiety in the plus maze. Were also evaluated the glucocorticoid levels in the serum, and the hypothalamic levels of cytokines. Thus, the JZL184 was used intraperitoneally, 60 minutes after LPS was intranasally instilled and 6, 24 and/or 48 hours, after induction of ALI, analyzes were performed. It was observed that the MAGL inhibition decreased the leukocyte migration into the lungs as well as the vascular permeability and the lung damage. JZL184 also reduced the cytokine and chemokine levels and the vascular extravasation in the BAL, the MPO activity in the lungs and adhesion molecule expression in the blood and BAL. The CB1 and CB2 receptors were considered involved in the anti-inflammatory effects of JZL184 because the AM281, a selective CB1 receptor antagonist, and the AM630, a selective CB2 receptor antagonist, reduced or blocked the anti-inflammatory effects previously described for JZL184. The LPS and the JZL184 did not promote unhealthy behavior and did not change the

parameters of anxiety. However, LPS and/or JZL184 increased gene expression of hypothalamic cytokines. It was concluded that MAGL inhibition produced anti-inflammatory effects in a murine model of LPS-induced ALI, a finding that was considered a consequence of the activation of the CB1 and CB2 cannabinoid receptors. The MAGL inhibition in the future may be a therapeutic tool for the pulmonary inflammation treatment.

Keywords: Endocannabinoids. JZL184. Cannabinoids. Lung damage. Lipopolysaccharide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Efeitos do estresse sobre o Sistema Nervoso Central e o Sistema Imune	32
Figura 2 – Diagrama esquemático do eixo HPA	32
Figura 3 – Efeitos do estresse sobre o eixo HPA e o Sistema Nervoso Simpático	34
Figura 4 – Efeitos da inflamação pulmonar aguda induzida pelo LPS	47
Figura 5 – Produção, liberação e degradação dos endocanabinóides	50
Figura 6 – Estrutura química do fármaco JZL184	51
Figura 7 - Delineamento experimental empregado no experimento piloto para caracterização das doses e dos efeitos do JZL184	71
Figura 8 - Efeitos do tratamento com JZL184 na contagem de leucócitos em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda (ALI)	72
Figura 9 - Efeitos do tratamento com JZL184 nos níveis de TNF- α em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda (ALI)	73
Figura 10 - Delineamento experimental empregado no experimento piloto para verificação de possíveis efeitos do veículo do JZL184	74
Figura 11 - Efeitos do veículo do JZL184 sobre o número de leucócitos no LBA em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda (ALI)	75
Figura 12 - Delineamento experimental empregado nos experimentos 1, 2 e 6	76
Figura 13 – Efeitos da inibição da MAGL na migração de leucócitos para os pulmões	78
Figura 14 - Efeitos da inibição da MAGL na migração de leucócitos para o Sangue	79
Figura 15 - Efeitos da inibição da MAGL na porcentagem de granulócitos na medula óssea	80
Figura 16 – Efeitos da inibição da MAGL na arquitetura pulmonar no dano tecidual causado pelo LPS	81
Figura 17 – Efeitos da inibição da MAGL no dano tecidual causado pelo LPS	82

Figura 18 – Efeitos da inibição da MAGL na expressão de moléculas de adesão no modelo de ALI induzida por LPS	84
Figura 19 – Efeitos da inibição da MAGL sobre a concentração de albumina no LBA	85
Figura 20 – Efeitos da inibição da MAGL sobre a atividade de MPO no pulmão em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzido por LPS	86
Figura 21 – Efeitos da inibição da MAGL sobre a concentração de citocinas / quimiocinas no LBA	87
Figura 22 – Delineamento experimental empregado no experimento 3	89
Figura 23 – Participação dos receptores CB1 e CB2 na migração de leucócitos para os pulmões	90
Figura 24 – Participação dos receptores CB1 e CB2 na prevenção do dano tecidual induzido pelo LPS	91
Figura 25 – Participação dos receptores CB1 e CB2 na expressão de moléculas de adesão no modelo murino de ALI induzida por LPS	92
Figura 26 – Participação dos receptores CB1 e CB2 na concentração de albumina do LBA	92
Figura 27 – Participação dos receptores CB1 e CB2 na atividade de MPO do pulmão	93
Figura 28 – Participação dos receptores CB1 e CB2 nas concentrações de citocinas / quimiocinas do LBA	94
Figura 29 - Delineamento experimental empregado no experimento 4	95
Figura 30 - Avaliação da atividade locomotora (CA) de animais tratados ou não com inibidor da MAGL em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzido por LPS	96
Figura 31 – Avaliação da ansiedade (LCE) de animais tratados ou não com inibidor da MAGL em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzido por LPS 48 horas após ALI	97
Figura 32 – Delineamento experimental empregado no experimento 5	98
Figura 33 – Avaliação da capacidade de adaptação, no CA, de animais tratados ou não com inibidor da MAGL em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzido por LPS	99

Figura 34 – Efeitos da inibição da MAGL sobre a concentração de corticosterona sérica em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzido por LPS	100
Figura 35 – Efeitos da inibição da MAGL sobre a porcentagem da expressão de RNAm de citocinas hipotalâmicas	101
Figura 36 – Delineamento experimental empregado no experimento com tratamento terapêutico com JZL184 (experimento 7)	102
Figura 37 – Efeitos do bloqueio da MAGL com JZL184 administrado de forma “terapêutica” sobre o número de neutrófilos e na concentração de TNF- α no LBA de um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzido por LPS	103
Quadro 1 – Ensaio da empresa <i>Applied Biosystems</i> utilizados para análise da expressão gênica por PCR em tempo real	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dose e efeito do tratamento com JZL184 na contagem de leucócitos em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda (ALI)	72
Tabela 2 - Efeitos do tratamento com JZL184 nos níveis de TNF- α em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda (ALI)	73
Tabela 3 – Efeitos do veículo do JZL184 sobre o número de leucócitos no LBA em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda (ALI)	75
Tabela 4 – Efeitos da inibição da MAGL na expressão de PECAM no LBA e sangue de camundongos 6, 24 e/ou 48 horas após ALI induzida por LPS	84
Tabela 5 – Efeitos da inibição da MAGL sobre a concentração de citocinas e quimiocina no LBA 6, 24 e/ou 48 horas após ALI induzida por LPS	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µL	microlitro
2-AG	2-araquidonilglicerol
5HIAA	Ácido 5-Hidroxiindolacético
5HT	serotonina
ACTH	hormônio adrenocorticotrópico
AEA	anandamida
ALI	inflamação / injúria pulmonar aguda
AM281	1-(2,4-Diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-4-morfolinil-1H-pirazol-3-carboxamida
AM630	6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-il](4-metoxifenil)metanon
APC	<i>allophycocyanin</i>
Arc	núcleo arqueado do hipotálamo
AVP	vasopressina
C	uma cisteína na porção amino-terminal
CA	campo aberto
CB1	receptor canabinoide do tipo 1
CB2	receptor canabinoide do tipo 2
CC	duas cisteínas ligadas diretamente
CCL2/ MCP-1	proteína quimioatraente de monócitos-1
CD18	β2-integrina
CD31	PECAM
CD62L	L-selectina
CINC-1/CXCL1	<i>cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1</i>

CR3	receptor para complement tipo 3
CRF	fator liberador de corticotrofina
CRH	hormônio liberador das corticotrofinas
CX3C	duas cisteínas separadas por três resíduos de cisteína
CXC	duas cisteínas separadas por um resíduo de aminoácido
CXCL1	interleucina-8
CXCL2/ MIP-2	proteína inflamatória de macrófago-2
DA	dopamina
DAGL	diacilglicerol lipase sn-1 seletivo
DHBA	3,4-Dihidroxibenzilamina
DM	núcleo dorsomedial do hipotálamo
DMSO	dimetilsulfóxido
DOPAC	ácido 3,4-Dihidroxifenilacetico
EBA	entradas nos braços abertos
EBF	entradas nos braços fechados
EC	endocanabinóide
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>e.g.</i>	silga em inglês para a palavra “exemplo”
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	transportador de membrana
FAAH	<i>fatty acid amide hydrolise</i>
FC	frequência cardíaca
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FR	frequência respiratória
g	gramas

H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio / água oxigenada
H.E.	coloração com hematoxilina-eosina
HF	formação hipocampal
HPA	hipotálamo-hipófise-adrenal
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HTAB	bromidrato de hexadeciltrimetilamonia
HVA	ácido homovanílico
i-NOS	óxido nítrico sintase induzida
ICAM-1	molécula de adesão intercelular 1
i.c.v.	intracérebro-ventricular
i.p.	intraperitoneal
IFN	intérferon
IL	interleucina
JZL184	4-nitrophenyl-4-(dibenzo[d][1,3]dioxol-5-yl(hydroxy)methyl) piperidine-1-carboxylate
KC/CXCL1	<i>keratinocyte- derived chemokine</i>
kD	kilodalton
kg	quilograma
LCE	labirinto em cruz elevado
LFA-1	integrina
LBA	lavado bronco alveolar
LPS	lipopolissacarídeo
LS	septo lateral
MAGL	monoacilglicerol lipase
MCP-1	proteína quimioatraente de monócitos-1

mg	miligrama
MHPG	3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol
mL	mililitro
MIP-2	proteína inflamatória de macrófago-2
MPO	mieloperoxidase
NaCl	cloreto de sódio
NAPE-PDL	N-acil fosfatidil etanolamin fosfolipase D específico
NAT	N-aciltransferase (NAT)
NK	<i>natural killer</i>
NLRs	<i>nod-like receptors</i>
NOR	noradrenalina
PE	ficoeritrina
PECAM	molécula de adesão plaqueta-endotélio celular
PEG	polietilenoglicol
PFC	córtex pré-frontal
PLC	fosfolipase C
PNS	Sistema Nervoso Periférico
PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo
RLRs	<i>retinoic acid-inducible-gene-1 (RIG-I)-like receptors</i>
SE	sistema endocanabinóide
PBS	salina tamponada com fosfato
RGs	receptor para glicocorticóides
RMs	receptor para mineralcorticóides
SDRA	síndrome do desconforto respiratório agudo
SI	Sistema Imune

SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNAS	Sistema Nervoso Autônomo Simpático
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistema Nervoso Simpático
TBA	tempo de permanência nos braços abertos
TBF	tempo de permanência nos braços fechados
Th1	células <i>T-helper</i> 1
Th2	células <i>T-helper</i> 2
TLRs	<i>toll-like receptors</i>
TNF	fator de necrose tumoral
UTI	unidade de tratamento intensivo
VMA	Ácido vanilmandelico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	NEUROIMUNOMODULAÇÃO.....	27
2.2	O SISTEMA NERVOSO CENTRAL, O SISTEMA IMUNE IMUNE E O ESTRESSE.....	28
2.3	NEUTRÓFILOS E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	37
2.4	INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS.....	44
2.5	SISTEMA ENDOCANABINÓIDE.....	48
3	OBJETIVOS	54
3.1	OBJETIVO GERAL.....	54
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4	MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1	ANIMAIS	56
4.2	FÁRMACOS	56
4.3	MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA.....	57
4.4	COLETA DE MATERIAL	58
4.4.1	Sangue	58
4.4.2	Lavado Bronco-Alveolar (LBA)	59
4.4.3	Medula óssea	59
4.4.4	Pulmão.....	60
4.4.5	Hipotálamo.....	60
4.5	ANÁLISES HISTLÓGICAS DO TECIDO PULMONAR.....	60
4.6	DOSAGEM DE CITOCINAS/QUIMIOCINAS.....	61
4.7	ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	62
4.8	AVALIAÇÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO DO SANGUE E LBA.....	62
4.9	EXTRAVASAMENTO VASCULAR: QUANTIFICAÇÃO DE ALBUMINA NO LBA.....	63
4.10	COLETA DE DADOS COMPORTAMENTAIS.....	63
4.10.1	Campo aberto e medida da atividade locomotora	63
4.10.2	Medida de ansiedade por meio do labirinto em cruz elevado	64
4.11	DOSAGEM DE CORTICOSTERONA	66
4.12	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA HIPOTALÂMICA POR RT-PCR	66
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	69

5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS.....	70
5.1	EXPERIMENTO PILOTO: DOSES E EFEITOS DA INIBIÇÃO DA MAGL E AVALIAÇÃO DE POSSÍVEL ATIVIDADE DO VEÍCULO DO JZL184 EM UM MODELO MURINO DE ALI	70
5.2	EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO BLOQUEIO DA MAGL SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS NO PULMÃO, NO LBA, NO SANGUE E NA MEDULA ÓSSEA EM UM MODELO MURINO DE ALI.....	76
5.3	EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO JZL184 SOBRE A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO, A PERMEABILIDADE VASCULAR, ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS E A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS/ QUIMIOCIAS MEDIDA EM UM MODELO MURINO DE ALI	83
5.4	EXPERIMENTO 3: A PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES CB1 E CB2 NOS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DO TRATAMENTO COM JZL184	89
5.5	EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM CAMPO ABERTO (CA) E NÍVEIS DE ANSIEDADE NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE) EM UM MODELO MURINO DE ALI	95
5.6	EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ADAPTAÇÃO EM CAMPO ABERTO EM UM MODELO MURINO DE ALI.....	98
5.7	EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA SÉRICA E EXPRESSÃO DE CITOCINAS HIPOTALÂMICAS EM UM MODELO MURINO DE ALI.....	100
5.8	EXPERIMENTO 7: TRATAMENTO “TERAPÊUTICO” COM JZL184 EM UM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS	102
6	DISCUSSÃO	104
7	CONCLUSÕES	117
7.1	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	117
7.2	CONCLUSÃO GERAL.....	118
	REFERÊNCIAS.....	119
	APÊNDICE	142

1 INTRODUÇÃO

Segundo Ader (ADER, 2000), neuroimunomodulação é a ciência que estuda as relações entre o comportamento, as funções neurais e endócrinas e os processos imunes; segundo este autor, a complexidade da imunorregulação não pode ser entendida sem que se leve em consideração o organismo como um todo e suas interações.

Estudos têm indicado a importância do sistema endocanabinóide (SE) em diferentes processos fisiopatológicos; em especial, relata-se ter ele um importante papel na regulação da secreção hormonal, através de uma ação primária que exerce no hipotálamo e/ou direta na hipófise (DI MARZO; BIFULCO; DE PETROCELLIS, 2004); mostrou-se serem os endocanabinóides capazes de modular a resposta imune e inflamatória dentre vários outros efeitos (COTA et al., 2003).

O papel do SE como um sistema de sinalização endógeno, começou a ser estudado a partir da caracterização dos receptores CB1 (DEVANE et al., 1988; MATSUDA et al., 1990) e CB2 (SCHATZ et al., 1997), expressos em várias células do organismo de mamíferos (GALIÈGUE et al., 1995; HASHIMOTODANI; OHNO-SHOSAKU; KANO, 2007). A descoberta destes receptores levou, naturalmente, à procura por endocanabinóides, sendo eles a anandamida (AEA) e a 2-araquidonilglicerol (2-AG).

Estes endocanabinóides são metabolizados por enzimas intracelulares. A AEA é hidrolisada pela *fatty acid amide hydrolase* (FAAH). Embora a 2-AG possa ser hidrolisada também pela FAAH (DI MARZO et al., 1998; BISOGNO; LIGRESTI; DI MARZO, 2005) uma enzima distinta, a monoacilglicerol lípase (MAGL), desempenha papel predominante na hidrólise deste endocanabinóide (HASHIMOTODANI; OHNO-SHOSAKU; KANO, 2007; CABRAL; GRIFFIN-THOMAS, 2009).

Considerando estes fatos, o emprego do JZL184 (4-nitrophenyl-4-(dibenzo[d][1,3]dioxol-5-yl (hydroxy)methyl)piperidine-1-carboxylate), um inibidor da degradação do 2-AG, tem se mostrado uma importante ferramenta farmacológica, para investigar as funções da 2-AG em respostas inflamatórias e imunes através do bloqueio da sua degradação pela MAGL, pois amplifica suas ações intrínsecas. Pareceu-nos, assim, relevante abordar os efeitos da inibição da MAGL dentro de

uma perspectiva neuroimune no modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO

A neuroimunomodulação foi conceituada, inicialmente, como a área de estudo que avaliava as influências exercidas pelo sistema nervoso sobre a resposta imune (REICHLIN, 1993). Graças à evolução dos conhecimentos sobre este campo da ciência, a neuroimunomodulação atualmente é definida como a área que estuda as inter-relações existentes entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Imune (SI) (COSTA-PINTO et al., 2009; ALVES; RIBEIRO; PALERMO-NETO, 2012; ZAGER et al., 2013). O termo inter-relações foi aqui empregado porque sabe-se hoje serem estas relações bidirecionais, ou seja, o SNC direciona fatores internos, como a ativação do sistema endócrino, e externos, como traumas, produtos tóxicos e microrganismos, que modificam a atividade do SI (MADDEN; FELTEN, 1995); em contrapartida, o SI, através da secreção de produtos como interleucinas e prostaglandinas modula a atividade do SNC (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; GOEHLER; LYTE; GAYKEMA, 2007; KIRSTEN et al., 2012).

Destaque-se, a esse respeito, que as primeiras constatações da existência de comunicação entre os dois super-sistemas foram feitas de forma pioneira por Hans Selye (SELYE, 1998). Selye 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 (HPA) após a administração de uma endotoxina bacteriana, modulando o SI e, conseqüentemente, o SNC (SI modula o SNC) (WEXLER; DOLGIN; TRYCZYNSKI, 1957).

Uma das descobertas mais notáveis da biologia foi a caracterização do compartilhamento bioquímico entre os sistemas nervoso e o imune; caracterizavam-se, assim, as bases moleculares da interação imune-neuro-endócrina (BLALOCK; SMITH, 1980). 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 para seus ligantes, em células do SI; mostrou-se, também, que citocinas produzidas por células do SNC estimulavam e modulavam a comunicação neuronal (SMITH; BLALOCK, 1988). De fato, sabe-se hoje que produtos do SI e do eixo neuro-endócrino coexistem em tecidos linfóide, endócrino e neural. Hormônios, neurotransmissores e neuropeptídeos afetam o SI, assim como produtos de células imunes e outros originados de processos inflamatórios, como interleucinas e prostaglandinas, afetam mecanismos neuro-endócrinos (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996).

Blalock (1984) propôs que o SI, além de sua função na defesa do organismo, atuaria como um tipo de função sensorial; serviria neste caso para detectar estímulos que não poderiam ser ouvidos, vistos, cheirados, degustados ou sentidos (BLALOCK, 1984). Especificamente, ele sugeriu que o SI poderia funcionar como um “Sexto Sentido” capaz de detectar e levar o organismo a responder a organismos invasores tais como patógenos ou presença de tumores ou 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 seus fundamentos 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).

2.2 O SISTEMA NERVOSO CENTRAL, O SISTEMA IMUNE IMUNE E O ESTRESSE

Estresse é um termo de amplo uso diário, conhecido como uma das mais importantes enfermidades, possivelmente devido ao ritmo e ao estilo de vida acelerados pelo ser humano da atualidade. O estresse assumiu uma posição complexa como imunomodulador em uma ampla variedade de respostas biológicas. Sabe-se que a resposta do organismo varia de acordo com o estressor e com o tempo que o indivíduo foi exposto (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). A crescente investigação na área do estresse deve-se ao fato de ser a exposição a

estressores capaz de influir no aparecimento de diversas enfermidades (CHROUSOS; GOLD, 1992).

No início do século XX, o fisiologista Walter Cannon utilizou o conceito de “Milieu interieur”, proposto por Claude Bernard, para afirmar que os organismos eram capazes de manter o equilíbrio fisiológico (homeostase) na vigência de perturbações causadas por mudanças nos ambientes externos (GOLDSTEIN; MCEWEN, 2002). Em suas pesquisas, Cannon destacou o Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) como elemento chave para a manutenção da homeostase, ao observar que este sistema reagia frente a diferentes situações de emergência como dor, hemorragia ou frio. Cannon também introduziu o conceito de luta ou fuga ou reação de alarme à reação apresentada pelos animais frente a situações ameaçadoras. Cabe destacar de seus trabalhos que, dentre a gama de situações adversas, incluíam-se estímulos físicos, como o calor e a hipotensão mas, também, os estímulos psicológicos (aspecto fundamental da atual definição de estresse) (PACÁK; PALKOVITS, 2001).

Dentro de uma perspectiva histórica, a verdadeira origem do que conhecemos hoje como estresse surgiu com os trabalhos do endocrinólogo Hans Seyle. A partir do ano de 1936, Seyle desenvolveu e popularizou o conceito de estresse como “a resposta específica do organismo frente a qualquer demanda”.

Nos primeiros trabalhos de Seyle, o termo “estresse” era empregado tanto ao estímulo que causava as alterações fisiológicas como à resposta do organismo a este estímulo. Por isso, anos mais tarde, Seyle definiu o termo estressor para o agente, ou estímulo estressante que dá lugar à perturbação, diferenciando-o de estresse, isto é, da resposta inespecífica do organismo frente ao desequilíbrio. Atualmente, a terminologia mais adequada é: estímulo estressante (estressor), estresse (estado do organismo) e resposta ao estresse (ARMARIO, 2006).

Em seus trabalhos, Seyle observou que animais expostos a diferentes situações adversas de caráter físico apresentavam uma resposta fisiológica estereotipada comum caracterizada por perda de peso, hipertrofia das adrenais, formação de úlceras gastrointestinais e redução do tamanho e peso do timo e dos nódulos linfáticos. Independente do agente estressor utilizado, este quadro foi definido como “síndrome geral de adaptação” compreendida em: (1) a “reação de alarme”, caracterizada por uma descarga imediata de adrenalina pelo sistema nervoso autônomo simpático (SNAS); (2) a “etapa de adaptação”, onde ocorreriam

importantes mudanças na fisiologia do estressado e (3) a “etapa de esgotamento”, que apareceria quando o estressor persistisse ultrapassando os mecanismos adaptativos e provocando a morte do organismo.

Seyle mostrou, ainda, que as mudanças fisiológicas mais relevantes induzidas pelo estresse estavam associadas à liberação de glicocorticoides pelo córtex das adrenais, que contribuía para a homeostase do organismo frente a situações adversas podendo, ainda, ser responsável pelo desenvolvimento de doenças em casos de desequilíbrio. Desta maneira, Seyle propôs que o principal sistema efetor da resposta do organismo frente aos agentes nocivos e perigosos (estressores) era o eixo hipotálamo-pituitária-adrenais (HPA).

Tomados em seu conjunto, os dados de Cannon e Seyle mostram que a exposição a situações de estresse, em vertebrados, implica principalmente na ativação de dois grandes sistemas: (i) o sistema nervoso autônomo (SNA), especialmente o ramo simpático (SNAS) com a liberação de adrenalina e noradrenalina (NA); e (ii) o eixo HPA, responsável pela liberação de glicocorticoides.

No geral, o organismo se prepara para uma situação de alarme e para isto precisa mobilizar energia de forma rápida para favorecer os comportamentos ativos. O eixo HPA e o caminho noradrenérgico/ autônomo do *locus ceruleus* atuam de forma sinérgica sendo os principais componentes desta resposta as catecolaminas e os glicocorticóides. Ambos, catecolaminas e glicocorticóides, ajudam a manter a homeostase frente às alterações deflagradas pelo estresse (MUNCK; GUYRE; HOLBROOK, 1984; MCEWEN, 1998).

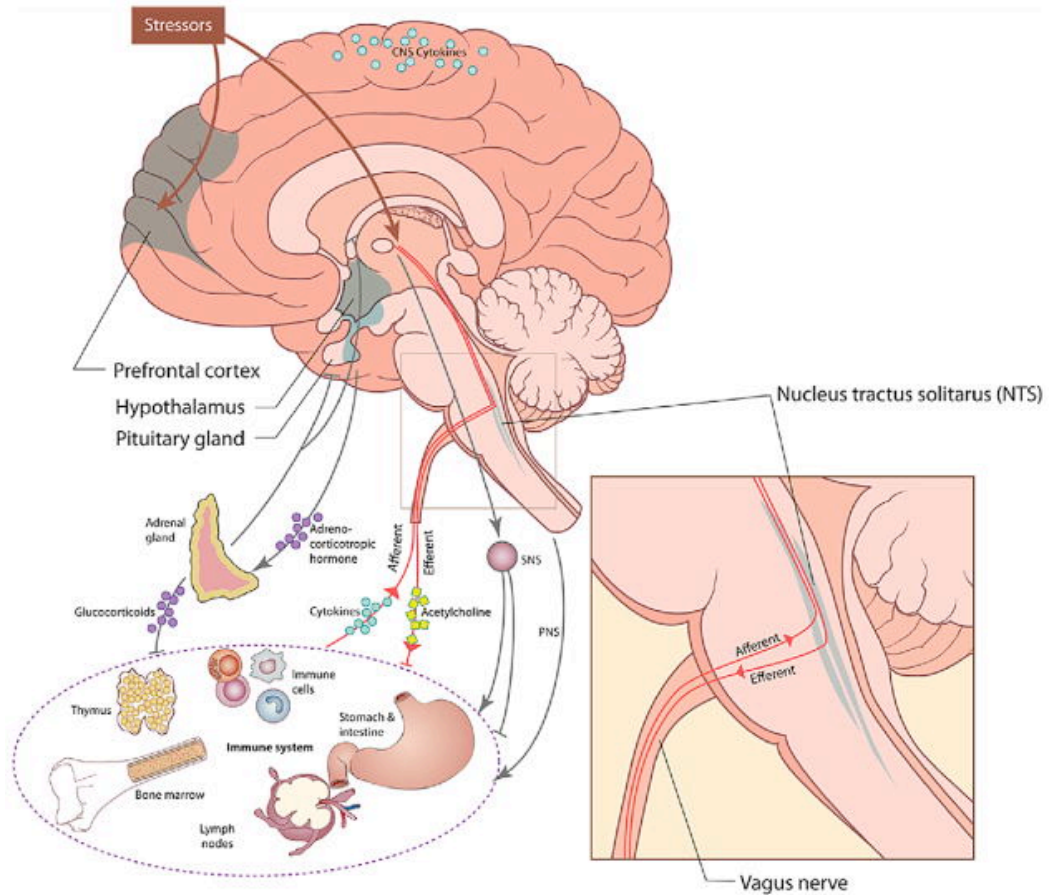
O Sistema Imune (SI) pode ser afetado pelo estresse através da inervação simpática de órgãos linfoides primários e secundários, liberando neuropeptídeos e neurotransmissores (STEVENS-FELTEN; BELLINGER, 1997; MIYAN; BROOME; AFAN, 1998), que atuam em receptores específicos para fatores neuroendócrinos presentes em células imunocompetentes (TURNBULL; RIVIER, 1999). A modulação direta ou indireta da atividade dessas células por fatores como ACTH, hormônios esteroides, adrenalina, NA, serotonina (5HT), dopamina (DA), opióides endógenos, entre outros, constitui uma importante via através da qual o sistema neuroendócrino influencia as respostas imunes (BESEDOVSKY; DEL REY; SORKIN, 1985; BLALOCK, 1994; JØRGENSEN et al., 2002).

Trabalhos realizados em nossos laboratórios relacionaram o estresse a alterações no sistema imune e comportamento. Neste contexto, camundongos, filhos

de mães tratadas com o estressor LPS em período gestacional, apresentaram, quando jovens ou adultos, níveis de adrenalina e de corticosterona aumentados (ZAGER et al., 2013). A exposição de ratas gestantes ao LPS bloqueou o sistema dopaminérgico envolvido com a função motora da prole em sua vida adulta e a resposta desta prole a um desafio com LPS resultou em comportamento doentio (Kirsten et al. 2010). Estudos mostraram ainda que o estresse afetou a distribuição e a migração de leucócitos, a produção de citocinas e a relação entre células TCD4/TCD8, além de inibir a produção de anticorpos e a atividade de macrófagos e de células “natural killer”(NK) (PALERMO NETO; MASSOCO; FÁVARE, 2001; FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010).

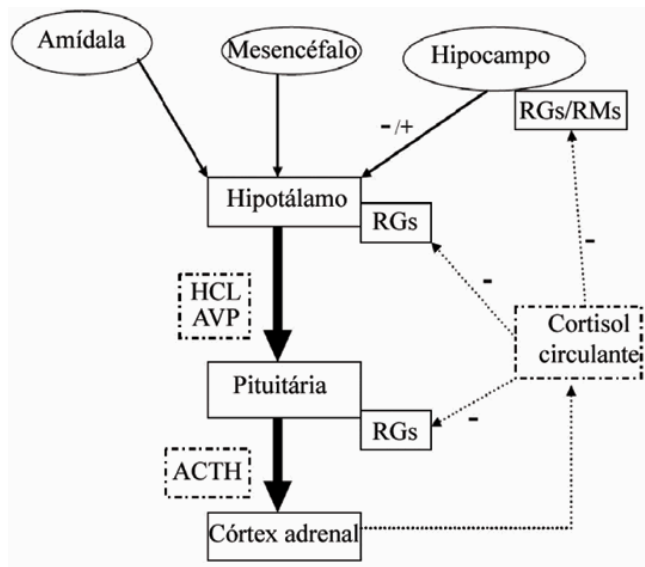
O principal regulador do efeito dos glicocorticoides sobre o sistema imune é o eixo HPA, tendo como seus principais componentes o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), a glândula hipófise e a glândula adrenal, que levam à liberação de glicocorticoides na circulação (Figura 1) e por *feedback* a inibição de sua produção (Figura 2) (WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002). O funcionamento do eixo HPA é dependente do controle de outras porções do cérebro como o hipocampo e o sistema límbico. A ativação do eixo HPA em resposta a estressores é o resultado da atuação do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). A ativação do PVN segue um caminho que pode envolver muitas estruturas encefálicas superiores como o córtex pré-frontal (PFC), a formação hipocampal (HF), o septo lateral (LS), sub-regiões da amígdala, o núcleo estriado e um conjunto de núcleos hipotalâmicos. A projeção das fibras catecolaminérgicas diretamente em neurônios do PVN alcança a adenohipófise onde estimula a síntese e a liberação de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) na circulação. Em seguida, o ACTH atua sobre o córtex da adrenal estimulando a síntese e secreção de glicocorticoides (principalmente cortisol em humanos e corticosterona em roedores) (Figura 1).

Figura 1 – Efeitos do estresse sobre o Sistema Nervoso Central e o Sistema Imune



Legenda: Sistema Nervoso Simpático (SNS); Sistema Nervoso Periférico (PNS)
 Fonte: (THAYER; STERNBERG, 2010)

Figura 2 – Diagrama esquemático do eixo HPA



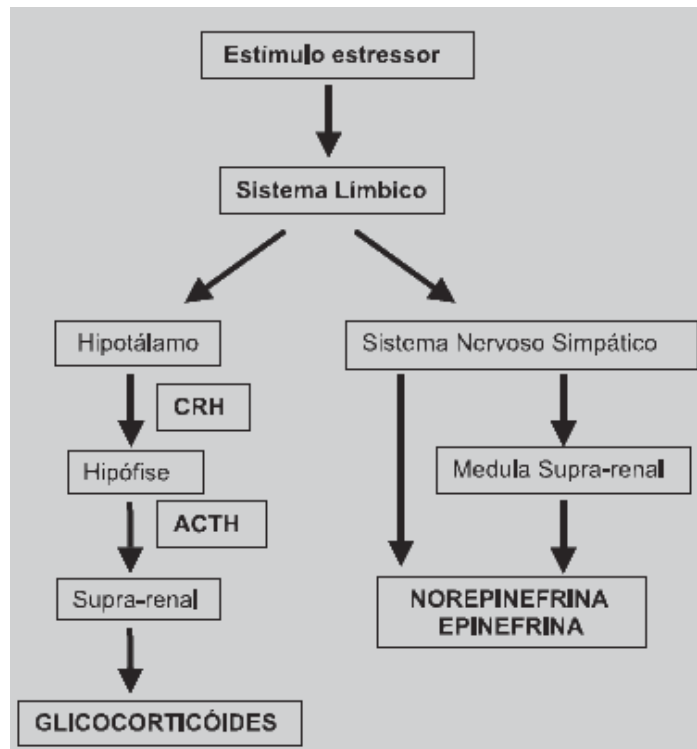
Legenda: Descrição da regulação (+) e do *feedback* negativo (-) do cortisol via sinalização pelos receptores para glicocorticoides (RGs) e para mineralcorticóides (RMs). Hormônio liberador de corticotropina (HCL); vasopressina (AVP); hormônio adrenocorticotrópico (ACTH)
 Fonte: (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004)

Em altas doses, os glicocorticóides têm efeito imunossupressor e foi por essa característica que estes hormônios ficaram conhecidos (FELSZEZGHY; GÁSPÁR; NYAKAS, 1996; MCEWEN et al., 1997). Inicialmente, acreditava-se que as alterações imunológicas imunossupressoras apresentadas por roedores ou humanos, em resposta a agentes estressores, ocorriam devido a ações dos glicocorticóides liberados pela adrenal. Entretanto, mais tarde, Kass et al. (1991) mostraram que a administração exógena de corticosterona era importante na recuperação de infecções em animais adrenalectomizados (KASS et al., 1991). Mostrou-se, ainda, que animais adrenalectomizados apresentavam uma imunossupressão induzida pelo estresse, comprovando-se a participação de outros sistemas além da ativação do eixo HPA e da liberação de glicocorticóides, (KELLER et al., 1983). Em seguida, observou-se que o SNAS também participava da resposta ao estresse e da modulação da atividade imune (FRIEDMAN; IRWIN, 1997) (Figura 3). As catecolaminas têm sido descritas, nos últimos 30 anos, como importantes imunomoduladores, após exposição a um estímulo estressor, por atuarem em adrenoreceptores α e β . A ligação das catecolamonas muito especialmente nos β_2 adrenoreceptores induzem o aumento ou supressão da atividade de células imunes, incluindo-se aqui a proliferação celular, produção de citocinas e de anticorpos, atividade lítica e migração celular (KOHM; SANDERS, 2000). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a noradrenalina pode inibir ou estimular uma resposta imune dependendo de inúmeras variáveis, como o tipo de receptor adrenérgico envolvido, a dose de agonista empregada, o tipo de antígeno para iniciar a resposta imune e os subtipos de células afetadas (DEL REY; BESEDOVSKY, 2008). Estudos têm mostrado, ainda, uma redução da resposta do eixo HPA após lesões seletivas por 6-hidroxidopamina de vias catecolaminérgicas (RITTER et al., 2003). Exemplificando, lesões em neurônios noradrenérgicos e adrenérgicos que inervam o PVN, diminuem a liberação de corticosterona após privação de glicose (RITTER et al., 2003).

Sabe-se, hoje, que a secreção exacerbada de glicocorticóides representa uma ameaça ao bem-estar do organismo (LUPIEN; MCEWEN, 1997; ELENKOV; CHROUSOS, 1999); assim, por exemplo, mostrou-se envolvimento dos mesmos na patogênese da asma, na hipertensão e na vigência de alterações cardiovasculares (PLOTSKY; CUNNINGHAM; WIDMAIER, 1989; MCEWEN; STELLAR, 1993), na depressão, nas desordens pós-traumáticas (TAGAY et al., 2005), na neurodegeneração (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000) na doença de

Alzheimer (LANDFIELD et al., 1991), nas alterações do comportamento alimentar, nos transtornos do estado de humor e ansiedade (ZHU et al., 2014), nos transtornos psicóticos, como a esquizofrenia (WALKER; MITTAL; TESSNER, 2008) e na propensão ao consumo de drogas (PIAZZA; LE MOAL, 1997). Todos estes transtornos têm um impacto significativo na resposta imune (BERCZI, 1998). Por outro lado, como mostra figura 2, os glicocorticoides são capazes de regular a atividade do eixo HPA mediante retroinibição exercida principalmente no hipocampo, hipotálamo e hipófise (ARMARIO, 2006).

Figura 3 – Efeitos do estresse sobre o eixo HPA e o Sistema Nervoso Simpático



Legenda: Hormônio liberador de corticotrofina (CRH); hormônio adrenocorticotrópico (ACTH); adrenalina (epinefrina); noradrenalina (norepinefrina)

Fonte: (TANNO; MARCONDES, 2002)

O eixo HPA não é o único responsável pelo controle da resposta ao estresse. O hipocampo também é uma área atuante na regulação da resposta orgânica aos estressores. Receptores para glicocorticoides estão presentes no hipocampo, que por sua vez, modula a liberação deste hormônio através de seus efeitos inibitórios sobre o eixo HPA. A formação hipocampal está associada aos aspectos cognitivos da resposta ao estresse (MCEWEN; SAPOLSKY, 1995) e ao aprendizado e à

memória (MORGADO, 2005). Neste sentido, o aumento de forma aguda dos níveis de catecolaminas e de corticóides facilitam a formação de memórias relacionadas a eventos considerados emotivos (ROOZENDAAL, 2000). Já a manutenção de forma crônica dos níveis elevados de hormônios relacionados ao estresse, principalmente dos glicocorticóides, contribui para prejudicar as funções cognitivas e promover lesões no hipocampo (MCEWEN; SAPOLSKY, 1995; LUPIEN; MCEWEN, 1997).

O LPS pode ser considerado como um estressor pois ativa preferencialmente macrófagos e linfócitos B, induzindo a produção de citocinas que, por sua vez, estimulam o eixo HPA liberando glicocorticóides. Estados de medo, ansiedade e depressão, que também estão ligados a um aumento da atividade do eixo HPA, 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 linfócitos T citotóxicos, da atividade e número de células *natural killer* (NK) e da atividade de macrófagos (PALERMO NETO; MASSOCO; FÁVARE, 2001; PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003; SÁ-ROCHA; SÁ-ROCHA; PALERMO-NETO, 2006). Os glicocorticóides ligam-se a receptores citoplasmáticos específicos presentes em linfócitos T e B e em macrófagos, inibindo a proliferação de células T estimuladas por mitógenos e por aloantígenos (*in vitro*) (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 da atividade de células T mediada pelos glicocorticóides (MADDEN; FELTEN, 1995).

Neste sentido, sabe-se que 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)- α , resultando em uma diferenciação de macrófagos, de células NK e de 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 anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-10 e IL-13, resultando na diferenciação de eosinófilos, mastócitos e células B, que leva a uma defesa de antígenos mediada por anticorpos (WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002). Assim, acredita-se que

a mudança de perfil de citocinas induzida pelos glicocorticóides seja consequência de uma regulação negativa das citocinas Th1, permitindo, assim, a expressão dominante de citocinas Th2 (FRANCHIMONT et al., 2000; AGARWAL; MARSHALL, 2001).

Células da micróglia, astrócitos e certos neurônios podem produzir citocinas como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α (ROTHWELL; HOPKINS, 1995). Inicialmente, acreditava-se que essas citocinas eram produzidas e liberadas durante processos inflamatórios, infecciosos e autoimunes em associação com a migração de células imunes para o cérebro. Mais tarde, mostrou-se que tanto a administração periférica de LPS (GATTI; BARTFAI, 1993; LAYÉ et al., 1994) como o estresse por imobilização (MINAMI et al., 1991) induziam a expressão de citocinas no SNC. Estes efeitos foram tido como decorrentes do rompimento da barreira hematoencefálica pelo LPS (LUSTIG et al., 1992). No entanto, observou-se que a administração periférica de baixas doses de LPS (<20 μ g/kg) (que não ultrapassavam a barreira hematoencefálica e que não causavam alterações evidentes em roedores) também resultavam na indução da expressão de citocinas no SNC, mais especificamente, encontrou-se alta expressão de IL-1 β e IL-6 no hipotálamo e no hipocampo de camundongos enquanto que a expressão de TNF- α foi mais acentuada no tálamo-estriado, sugerindo estes fatos que a estimulação do sistema imune pela via periférica é capaz de promover aumento na expressão de citocinas no SNC (PITOSI et al., 1997). Neste sentido, existem evidências de que células neurais são capazes de produzir citocinas (ROTHWELL; HOPKINS, 1995; BESEDOVSKY; DEL REY, 1996), sendo assim é possível inferir que estas citocinas afetem funções cerebrais.

Em resumo, os glicocorticóides parecem ser o elo comum entre os efeitos do estresse sobre a imunidade; de fato, muitos dos efeitos de estressores sobre leucócitos circulantes podem ser atribuídos ao aumento dos níveis deste hormônio (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). No entanto, durante o estresse, há casos em que se observa a imunidade alterada na ausência de níveis de corticosterona alterados, apontando para um possível papel do SNAS e das catecolaminas (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010).

Portanto, diante da importância da atuação de glicocorticóides e citocinas sobre o SNC, pareceu-nos relevante abordar de forma mais profunda os efeitos da administração de LPS intranasal e do bloqueio da enzima degradadora do

endocanabinóide 2-araquidonilglicerol (2-AG), a monoacilglicerol lipase (MAGL), sobre a imunidade e o comportamento de camundongos em um modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS (modelo experimental da ALI) previamente tratados ou não com o fármaco JZL184.

2.3 NEUTRÓFILOS E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

No modelo de inflamação pulmonar aguda, o macrófago alveolar residente de roedores, assim como o de outras espécies animais como o homem, é uma das principais células efetoras da imunidade celular; suas principais características são: a capacidade de fagocitar células estranhas como as lipoproteínas plasmáticas e eritrócitos envelhecidos, a eliminação de microorganismos e células tumorais, a capacidade de sequestrar materiais não metabolizáveis e de secretar citocinas (Gordon, 1986; Shevach, 1984). Após o contato dos macrófagos com agentes estranhos, ele passa de um estado dormente para outro, estimulado. Se o estímulo continua, os macrófagos espõem integrinas em suas membranas que participam do processo de ativação, como os receptores CR3, LFA-1 e ICAM-1. As integrinas, por sua vez, reconhecem outras moléculas e matrizes extra-celulares, aumentando as atividades metabólicas e funcionais dos mesmos, resultando no aumento da capacidade de espraiamento, fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e secreção de citocinas. Quando isto ocorre, diz-se que os macrófagos passam do estado estimulado para o estado ativado (ADAMS; HAMILTON, 1984; JORENS et al., 1992; NEWSHOLME et al., 1999).

A resposta imune se desenvolve por meio de uma sucessão de mecanismos que objetivam a proteção do organismo contra patógenos que incluem vírus, fungos, bactérias e protozoários. O sistema imune detecta e elimina estes microorganismos ao discriminar as substâncias próprias (*self*) das estranhas (*non-self*) ao organismo (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003).

O reconhecimento do patógeno ou produtos derivados de patógenos em diferentes compartimentos celulares, tais como membrana plasmática, endossomo ou citoplasma depende de receptores que incluem as famílias dos *toll-like receptors* (TLRs), dos *retinoic acid-inducible-gene-1 (RIG-I)-like receptors* (RLRs) e dos *nod-*

like receptors (NLRs). Os TLRs são proteínas transmembranas caracterizadas por sequências extracelulares repetidas ricas em leucina específicas para cada TLR, capazes de reconhecer um amplo grupo de patógenos associados a padrões moleculares (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) de diferentes tipos de microorganismos (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009). A pouca variedade entre os PAMPs permite que um pequeno número de TLRs reconheçam diferentes patógenos (ZHANG et al., 2007).

Após esse reconhecimento, há regulação da expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras que eliminam esses agentes (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). O NF- κ B, em células de mamíferos, corresponde a uma família de proteínas que regula a expressão de mais de 400 genes envolvidos em diferentes funções, tais como expressão de imunorreceptores, expressão de quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão, proliferação celular, transformação, apoptose, angiogênese, estresse oxidativo e metástase (BAEUERLE; HENKEL, 1994; LEE; BURCKART, 1998; BATRA; DOYLE; O'NEILL, 2006; KIM; HAWKE; BALDWIN, 2006; BALAMAYOORAN; SAHOO, 2011).

Dentre os diversos genes regulados pelo NF- κ B, destacam-se as citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), as quimiocinas, como interleucina-8 (IL-8/CXCL1), proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2/CXCL2), proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1/CCL2), além de enzimas como a óxido nítrico sintase induzida (i-NOS) (DRISCOLL et al., 1995; SANCÉAU et al., 1995; HARANT et al., 1996; KLEINERT et al., 1996; IVASHKIV, 2011; LIEDTKE; TRAUTWEIN, 2012; PEDRUZZI et al., 2012; BRASIER; ZHAO, 2014).

As citocinas e quimiocinas têm papel crucial no recrutamento e ativação das células do sistema imune para o foco inflamatório. Nesse contexto, os neutrófilos destacam-se por sua rápida migração (LEE; DOWNEY, 2001; REUTERSHAN; LEY, 2004; RIBEIRO et al., 2012; COSTOLA-DE-SOUZA et al., 2013).

Os neutrófilos são leucócitos granulócitos produzidos na medula óssea a partir de células precursoras denominadas mieloblastos. Quando maduras, estas células são liberadas na corrente sanguínea. Por dia, cerca de $5-10 \times 10^{10}$ neutrófilos são formados na medula óssea de humanos, (SADIK; KIM; LUSTER, 2011). Os neutrófilos são granulocíticos polimorfonucleares e constituem aproximadamente 40-50% da população de leucócitos na corrente sanguínea de humanos adultos e que

circulam por cerca de seis horas. Após este período, as células entram em apoptose e são removidas (KOVACH; STANDIFORD, 2012).

Os neutrófilos maduros diferenciam-se morfologicamente dos demais granulócitos por apresentarem núcleos segmentados em 3 a 5 lóbulos. Em seus grânulos citoplasmáticos os neutrófilos possuem enzimas proteolíticas capazes de lisar praticamente todos os componentes de grande parte dos microorganismos; apresentam em seu citoplasma quatro tipos de grânulos: azurófilos (primários), específicos (secundários), terciários e vesículas secretoras. Os grânulos azurófilos, ou primários, contêm, em geral, muitos componentes antimicrobianos e estão ligados à sua atividade fagocitária, destacando-se a enzima mieloperoxidase (MPO), proteína catalizadora de produtos do *burst* respiratório (clorito e peróxido de hidrogênio). Ainda nos grânulos específicos encontram-se, além de componentes relacionados à fagocitose, receptores de membrana importantes para o desempenho das funções celulares da resposta imune inata. Os grânulos terciários, assim como nos secundários, são caracterizados pela ausência de MPO em seu interior e constituem importante fonte de proteínas, que degradam a matriz extracelular, e de receptores de membrana, necessários para o processo de extravasamento e diapedese dos neutrófilos (SEGAL, 2005).

Quando ocorre inflamação, os neutrófilos são os primeiros leucócitos a serem recrutados para o local da injúria; migram rapidamente da medula óssea para a corrente sanguínea e do sangue e para o foco inflamatório em quatro fases distintas: mobilização da medula óssea, marginação e rolamento sobre o endotélio de microvasos, aderência e transmigração do vaso para o tecido inflamado ou infectado (ALVES-FILHO; SPILLER; CUNHA, 2010; KOVACH; STANDIFORD, 2012). Para esses processos de interação leucócito-endotélio, uma série de moléculas de adesão são importantes, especialmente aquelas pertencentes à família das integrinas, imunoglobulinas, selectinas e caderinas (LANGER; CHAVAKIS, 2009). A β 2-integrina e a L-selectina são conhecidas por facilitarem a adesão leucocitária ao endotélio lesado (KISHIMOTO et al., 1989b; SIMON et al., 1992). Estudos sorológicos em roedores demonstraram que, no curso da inflamação, a β 2-integrina e a L-selectina expressam-se de forma inversa, ou seja, a β 2-integrina é regulada positivamente enquanto a L-selectina é reprimida (KISHIMOTO et al., 1989b; SIMON et al., 1992). Especula-se que esta relação inversa é necessária para permitir a adesão dos neutrófilos no tecido de interesse (ROCHON; FROJMOVIC,

1992).

Atualmente, sabe-se que durante a inflamação, células residentes produzem e secretam citocinas e quimiocinas, fagócitos migram para o local inflamado, produzindo também diversas citocinas e mediadores lipídicos que modulam sua própria função e aquela de outras células como linfócitos e células endoteliais. Os neutrófilos produzem menor quantidade de citocinas e quimiocinas por célula em relação aos macrófagos, quando considerado o processo inflamatório agudo; entretanto essas células são importantes fontes desses mediadores (CASSATELLA, 1995).

Citocinas são pequenos polipeptídeos (cerca de 25 kD) produzidos em resposta a estímulos como lesão tecidual e infecção. São as citocinas que regulam e determinam a natureza de processos como crescimento e diferenciação celular, o processo inflamatório, a resposta imunológica e o reparo tecidual (NICOD, 1993; HEEG; DALPKE, 2003). A concentração sérica de citocinas é baixa em indivíduos saudáveis, entretanto, na presença de patógenos são sintetizadas e liberadas a partir de células residentes e migratórias aumentando sua concentração local e na corrente sanguínea (DINARELLO, 2000).

A primeira interleucina (IL) a ser descrita encontra-se dentre as mais potentes moléculas que compõem o sistema imune: a IL-1. A IL-1 é composta por uma família de 11 membros: IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33 e IL-1F5 - IL-1F10 (SIMS; SMITH, 2010). Os subtipos IL-1 α e IL-1 β são os mais estudados, apresentam atividades biológicas semelhantes e atuam sobre o mesmo receptor. A IL-1 β é uma citocina que tem ação sistêmica, sendo produzida principalmente pelos monócitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e células endoteliais, frente a estímulos, tais como produtos bacterianos (e.g. LPS) e outras citocinas (e.g. TNF- α). A IL-1 β age principalmente no recrutamento de neutrófilos induzindo a formação de moléculas de adesão endotelial (DINARELLO, 1996; DINARELLO, 2011). Em baixas concentrações, a IL-1 β tem ação nas células endoteliais, promovendo o aumento no número de moléculas de superfície para a adesão leucocitária; em contrapartida, concentrações mais altas de IL-1 β promovem efeito sistêmico, como febre e produção de proteínas hepáticas de fase aguda, como o fibrinogênio e a proteína sérica amilóide A. No caso de níveis elevados persistentes, a interleucina pode causar perda de células musculares e adiposas até a caquexia. Adicionalmente, a atuação concomitante de IL-1 β e TNF- α é fenômeno comum na inflamação aguda e

podem apresentar correlação positiva tanto entre seus níveis quanto com a gravidade da doença (DINARELLO, 2000).

O TNF- α é considerado um dos principais mediadores da resposta inflamatória aguda. Foi inicialmente identificado como um fator plasmático capaz de induzir necrose hemorrágica de tumores de camundongos transplantados, possui citotoxicidade seletiva para células neoplásicas cars (CARSWELL et al., 1975); anos depois, foi denominado caquexina, isto é uma proteína relacionada à caquexia (KAWAKAMI; CERAMI, 1981). Entretanto, em 1985 passou a ser conhecido como TNF- α (BEUTLER; MILSARK; CERAMI, 1985).

O TNF- α é uma citocina produzida principalmente por fagócitos mononucleares; recruta e ativa neutrófilos, macrófagos e células endoteliais e induz liberação de mediadores como IL-6, IL-1 β e IL-8 (FACCIOLI et al., 1990). O TNF- α é liberado rapidamente após um estímulo inflamatório e tem importante papel na adesão de leucócitos ao endotélio (KSONTINI; MACKAY; MOLDAWER, 1998; FAFFE et al., 2000). Sua relevância em doenças foi demonstrada em diversos estudos, como na síndrome do desconforto respiratório agudo, artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal (SCHÜTTE et al., 1996; CANETTI et al., 2001; HAMACHER et al., 2002).

A IL-6 é outro importante mediador inflamatório. É produzida e secretada principalmente por macrófagos/monócitos, linfócitos T e B, células dendríticas, neutrófilos, mastócitos, células endoteliais e epiteliais, fibroblastos e astrócitos em resposta à estimulação por LPS, IL-1 β e TNF- α (BHATIA; MOOCHHALA, 2004; RINCON; IRVIN, 2012). Esta citocina é conhecida por participar de processos imunológicos, hematopoiéticos e inflamatórios, participando especialmente do aumento do número de neutrófilos produzidos pela medula óssea; é, também, importante indutora da síntese de proteínas na fase aguda da inflamação nos hepatócitos (e.g. proteína amilóide A e fibrinogênio). A IL-6 é considerada como marcador de gravidade da SDRA desencadeada por diferentes etiologias como sepse (REMICK et al., 2005) e pancreatite aguda (LESER et al., 1991). Esta citocina apresenta correlação positiva com mortalidade tanto em modelos animais como em pacientes com sepse (BLACKWELL; CHRISTMAN, 1996).

Durante a resposta inflamatória que se desenvolve em uma infecção, as interações entre as células ocorrem principalmente pelo intermédio das citocinas, como o intérferon- γ (IFN- γ). O IFN- γ regula a migração e a ativação das células

fagocíticas e a de células NK. Um fator produzido pelas células fagocíticas infectadas e responsável por induzir a produção do IFN- γ é a interleucina-12 (IL-12). A citocina IL-12 é um potente indutor da produção de citocinas (TNF- α , OM-CSF, M-CSF, IL-3, IL-5, IL-2 e principalmente IFN- γ) em células T e NK, um fator de crescimento para as células T e NK pré-ativado e um potenciador da atividade citotóxica em ambas as células T CD8⁺ e células NK (SCHOENHAUT et al., 1992). A interleucina-12 (IL-12) é uma citocina heterodimérica produzida principalmente por células fagocíticas, em resposta a bactérias, produtos bacterianos, e parasitas intracelulares e, em algum grau, por linfócitos B (TRINCHIERI, 1995).

A magnitude da resposta inflamatória é fundamental para que o organismo mantenha suas funções vitais e a homeostase. Nesse sentido, a IL-10 é uma importante citocina imunoregulatória anti-inflamatória. A IL-10 foi descoberta em 1989 sendo inicialmente denominada *cytokine-synthesis inhibitory factor* (CSIF), por ser produzida por células *T-helper 2* (Th2) que inibe a produção de citocinas geradas pelas células *T-helper 1* (Th1) (HEDRICH; BREAM, 2010). Diversas células têm sido relatadas como produtoras de IL-10, incluindo-se aqui os monócitos, macrófagos, células NK, células dendríticas (*dendritic cells* - DCs), eosinófilos, células B, células T regulatórias (Treg) e células Th17 (O'GARRA; VIEIRA, 2007). Sabe-se que a IL-10 inibe a síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, MCP-1 e MIP-2 e que atenua o recrutamento de neutrófilos (MALLAT et al., 1999).

As quimiocinas são constituintes da grande família das citocinas; elas têm papel relevante na inflamação. Esta denominação, proposta por Lindley et al. (1993), refere-se à moléculas com função quimiotáticas, isto é, pequenas proteínas quimioatraentes (8-12kD) produzidas por vários tipos celulares que são consideradas moléculas chaves na regulação e na migração de leucócitos para os focos de inflamação. A classificação das quimiocinas é feita com base na presença e localização de resíduos de aminoácidos intercalados entre as cisteínas amino-terminais: CXC (duas cisteínas separadas por um resíduo de aminoácido), CC (duas cisteínas ligadas diretamente), C (apenas uma cisteína na porção amino-terminal) e CX3C (duas cisteínas separadas por três resíduos de cisteína) (MOSER et al., 2004). As quimiocinas da família CC (MCP-1) e CXC (IL-8 e MIP-2) são importantes mediadores na inflamação e infecção e as pertencentes ao grupo CXC são potentes quimioatraentes para neutrófilos (PLIYEV, 2008).

A IL-8 é uma quimiocina purificada e molecularmente clonada como um fator quimiotático de neutrófilos originado do sobrenadante de células mononucleares estimuladas com LPS (YOSHIMURA et al., 1987). Esta quimiocina foi encontrada em humanos, sendo considerada como protótipo de quimiotaxia e ativação de neutrófilos (BAGGIOLINI; DEWALD; MOSER, 1997; MUL et al., 2000), e em várias espécies de animais como coelhos e cães; entretanto, não foi encontrada em roedores (ratos e camundongos). A *cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1* (CINC-1/CXCL1) em ratos e a *keratinocyte-derived chemokine* (KC/CXCL1) e MIP-2 em camundongos, apresentam acentuada homologia com a IL-8 humana apresentando potente atividade quimiotática (LAING; SECOMBES, 2004). A síntese e secreção da IL-8 pode ser induzida por estímulos como o LPS ou por citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF- α . A quimiocina IL-8 é produzida por diferentes tipos celulares, incluindo-se monócitos, neutrófilos, células T, células NK, células endoteliais, fibroblastos e células epiteliais (BAGGIOLINI, 1998). Níveis elevados de IL-8 foram relatados em diversos processos inflamatórios das vias respiratórias (KOLAHIAN et al., 2014; LOONEY et al., 2014).

A MCP-1 é uma quimiocina produzida por diferentes tipos celulares como as células endoteliais, células musculares lisas, monócitos, células T, células NK que pode apresentar-se em níveis elevados em resposta às citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (SICA et al., 1990; LUSTER, 1998). A função da MCP-1 é atrair células mononucleares, principalmente monócitos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos e linfócitos (MAURER; VON STEBUT, 2004).

Portanto, diante da importância da atuação dos neutrófilos e de mediadores inflamatórios no curso da inflamação pulmonar aguda, pareceu-nos relevante abordar de forma mais profunda os efeitos do LPS intranasal e do bloqueio da enzima degradadora do endocanabinóide 2-araquidonilglicerol (2-AG), a monoacilglicerol lipase (MAGL), sobre o comportamento e imunidade em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS (modelo experimental da ALI) previamente tratados ou não com o fármaco JZL184.

2.4 INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS

Sabe-se que o lipopolissacarídeo (LPS - *lipopolysaccharide*), também conhecido por endotoxina, pode ser classificado como um dos principais PAMPs, sendo parte constituinte da parede de bactérias Gram-negativas. O LPS é formado por um domínio hidrofóbico altamente conservado, conhecido como lipídio A, responsável por sua atividade biológica e por um polissacarídeo hidrofílico (Antígeno-O) variável.

A endotoxina foi descoberta no século XIX, por observações empíricas de que a febre seria um sinal de doença. Duas teorias evoluíram a respeito da febre: 1) que seria um das consequências deletérias de doença e 2) que seria um mecanismo de defesa do organismo contra doenças. Naquele tempo, pesquisas haviam demonstrado que tecidos em putrefação injetados intravenosamente (i.v.) no organismo induziam febre, o que argumentava ser a febre benéfica ao organismo. No século seguinte, mostrou-se que extratos em ácido tricloroacético de bactérias gram-negativas também produziam febre. Nesse contexto, Richard Pfeiffer, postulou as endotoxinas como sendo causadoras da atividade pirogênica (do grego *pyros*=fogo) dos extratos (HITCHCOCK et al., 1986). A partir de 1935, caracterizou-se a endotoxina como um complexo macromolecular de membrana externa de bactérias gram-negativas, composto por polissacarídeo, lipídeo e proteína. Duas décadas depois, Westphal e Lüderitz (1954) e Hitchcock et al. (1986) identificaram o LPS, purificado, livre de proteínas e demais substâncias; também mostraram que o LPS, composto somente por lipídeo e carboidrato, possuía todas as atividades biológicas da endotoxina. Avanços científicos posteriores culminaram na descoberta do lipídio A, isolado do LPS, o responsável pelos efeitos pirógenos e tóxicos do mesmo. Mais recentemente, o lipídio A foi sintetizado, tendo-se mostrado ter ele atividade biológica semelhante ao endógeno (GALANOS et al., 1984; KOTANI et al., 1985).

O mecanismo de ação do LPS inicia-se com sua ligação a uma proteína sérica denominada LBP (*lipopolysaccharide binding protein*). Este complexo se acopla aos receptores CD14, os quais são proteínas localizadas na membrana de células do sistema imune fundamentais no reconhecimento do LPS (LEVAN et al., 2001). É interessante notar que o CD14 não possui domínio intracelular e, portanto,

não pode induzir ativação celular sem que um receptor de sinal de membrana seja acionado. Nesse contexto, estudos mostraram que o TLR4 (*Toll like receptor 4*) desempenha esta função. O TLR4, juntamente com a proteína MD-2 (*myeloid differentiation protein-2*), aumenta a resposta celular ao LPS (SHIMAZU et al., 1999). A partir da ativação do TLR4 (pelo complexo LPS + LBP + CD14 + TLR4 + MD2) inicia-se uma cascata de sinalização que vai desencadear a ativação de um indutor da inflamação denominado fator de transcrição NF- κ B (*nuclear factor κ B*) e consequentemente, a liberação de citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF (KAWAI et al., 1999; DENG et al., 2000; MOGENSEN, 2009).

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) foi descrita em 1967 por Ashbaugh et al. (1967); foram estudados 12 pacientes com quadro agudo de dispnéia, taquipnéia, cianose refratária à oxigenioterapia, diminuição da complacência pulmonar e infiltrado alveolar difuso na radiografia de tórax (ASHBAUGH et al., 2005). A Conferência Americana e Europeia de Consenso em SDRA (AECC) definiu critérios de diagnósticos tanto para SDRA como para a inflamação pulmonar aguda (ALI) como publicado em 1994 (BERNARD et al., 1994; DUSHIANTHAN et al., 2011). A ALI e, sua forma mais severa, SDRA, em humanos; ambos são doenças pulmonares de início agudo, caracterizadas por infiltrado pulmonar bilateral com acúmulo de neutrófilos (TSUSHIMA et al., 2009; GROMMES; SOEHNLEIN, 2011). A ALI e a SDRA diferenciam-se apenas no que se refere à gravidade da hipoxemia, sendo a relação entre pressão arterial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio (PaO₂/FiO₂) inferior ou igual a 300 mmHg na ALI, enquanto que na SDRA esta relação é mais severa, menor ou igual a 200 mmHg (TSUSHIMA et al., 2009).

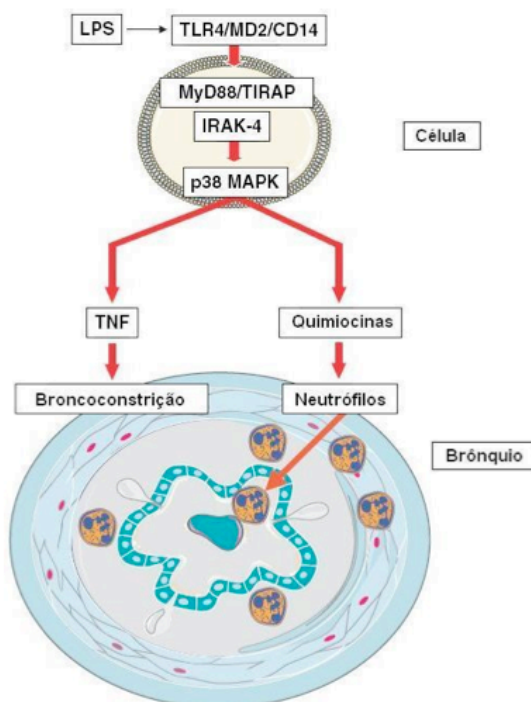
O mecanismo fisiopatológico da SDRA é complexo, multifatorial e não é homogêneo; pode ser desencadeado por fatores diretos ou primários (como infecção pulmonar, pneumonia, aspiração de conteúdo gástrico), ou fatores indiretos ou secundários (como decorrente da sepse, politraumatismos, pancreatites) (ROCCO; PELOSI, 2008). A causa mais comum da ALI/SDRA é a sepse, embora a seqüência exata de como isso ocorre não esteja muito bem elucidada. A sepse é uma condição clínica, definida pela Sociedade de Terapia Intensiva Americana, como uma resposta sistêmica à infecção manifestada por dois ou mais sintomas, tais como: 1) alteração da temperatura corporal (acima de 38 °C ou abaixo de 36 °C), 2) aumento da frequência cardíaca (FC) acima de 90 batimentos por minuto, 3) aumento da

frequência respiratória (FR) acima de 20 respirações por minuto ou PaCO₂ menor que 32 mmHg e/ou 4) número de leucócitos no sangue acima de 12.000/mm³(leucocitose) ou menor que 4.000/mm³(leucopenia) (ABRAHAM et al., 2000). De modo geral, aproximadamente 40% dos pacientes com sepse apresentam também a SDRA (HUDSON et al., 1995).

Sugeriu-se que a SDRA/ALI induzida pela sepsis decorreria de um acúmulo de neutrófilos nos pulmões com consequente aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8, desencadeando-se o processo inflamatório e suas consequências (D'ALESSIO et al., 2009) (Figura 4). Os mecanismos subjacentes à inflamação pulmonar aguda decorrentes da inflamação sistêmica podem ser investigados experimentalmente, por exemplo, pela administração de LPS por via sistêmica a animais de laboratório (BRIGHAM; MEYRICK, 1986), pela perfuração de alça intestinal (RIOS-SANTOS et al., 2003) ou por meio de trauma (e/ou choque) hemorrágico (CATANIA; CHAUDRY, 1999). Em todos esses modelos observam-se os sinais apresentados na inflamação pulmonar aguda. Esses modelos evoluem para lesão inflamatória principalmente por infiltração neutrofílica pulmonar e sendo potencializados por diversas citocinas, dentre as quais destacam-se IL-1 β , KC (corresponde a IL-8 em humanos) e TNF- α . Ocorre, também, aumento da pressão arterial pulmonar, hipoxemia e edema alveolar e intestinal (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008). Estes efeitos observados nos modelos experimentais de SDRA e ALI são similares aos sinais apresentados por pacientes quando acometidos da SDRA.

Estudo epidemiológico Europeu envolvendo 10 países avaliou 6.522 pacientes internados em 78 Unidades de Terapia Intensiva (UTIs); 6,1% dos internados apresentavam SDRA (BRUN-BUISSON et al., 2004). Outro estudo realizado em 21 UTIs de três estados Australianos mostrou incidência de 28 casos de SDRA para cada 100.000 habitantes (BERSTEN et al., 2002). A SDRA é uma síndrome grave, associada a índices de mortalidade superiores a 40%; o número de mortes por ano somente nos Estados Unidos da América (USA) chega a 80.000 (LEWANDOWSKI; LEWANDOWSKI, 2006).

Figura 4 – Efeitos da inflamação pulmonar aguda induzida pelo LPS



Fonte: (TOGBE et al., 2007 traduzido por PAVANI, 2014)

No Brasil, uma pesquisa realizada no Centro de Tratamento Intensivo da Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto mostrou incidência da SDRA em 6,3% de 524 admissões no período de maio de 2001 a abril de 2002 (OLIVEIRA; BASILLE FILHO, 2006). Outro estudo no Hospital das Clínicas de Porto Alegre revelou uma incidência de SDRA de 2,3% em 1.301 pacientes de UTI (FIALKOW et al., 2002).

Neste contexto, o uso do modelo murino da inflamação pulmonar aguda (ALI) pareceu-nos interessante, pois as inflamações pulmonares induzidas são caracterizadas por acúmulo de neutrófilos, edema, destruição da integridade epitelial e extravasamento de proteínas para o espaço alveolar (ZARBOCK et al., 2009). Sabe-se serem os processos inflamatórios detectados pelo SNC capazes de produzir uma resposta, entre outros, através de alterações comportamentais como redução ou aumento da atividade motora, redução da ingestão de alimentos, etc. Desta forma, pareceu-nos relevante estudar mais profundamente e dentro de uma perspectiva neuroimunológica, os efeitos do JZL184 em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda

2.5 SISTEMA ENDOCANABINÓIDE

A distribuição ubíqua de receptores e seus ligantes são de vital importância para o estabelecimento da comunicação bidirecional entre os sistemas SNC e SI. Desta forma, o Sistema Endocanabinóide (SE) parece se encaixar perfeitamente no contexto das bases moleculares da interação imune-neuro-endócrina. Vem sendo demonstrado que 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 e CB2) em áreas vitais do SNC (RODRÍGUEZ DE FONSECA et al., 2005). 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 e a secreção neuroendócrina (CROXFORD; YAMAMURA, 2005). Além disso, já foi descrita a presença de ligantes de receptores canabinóides (CB2 e CB1) em leucócitos e tecidos linfóides e, desta forma, vem sendo demonstrado que os (endo)canabinóides são capazes de modular a atividade do sistema imune (KLEIN et al., 2003).

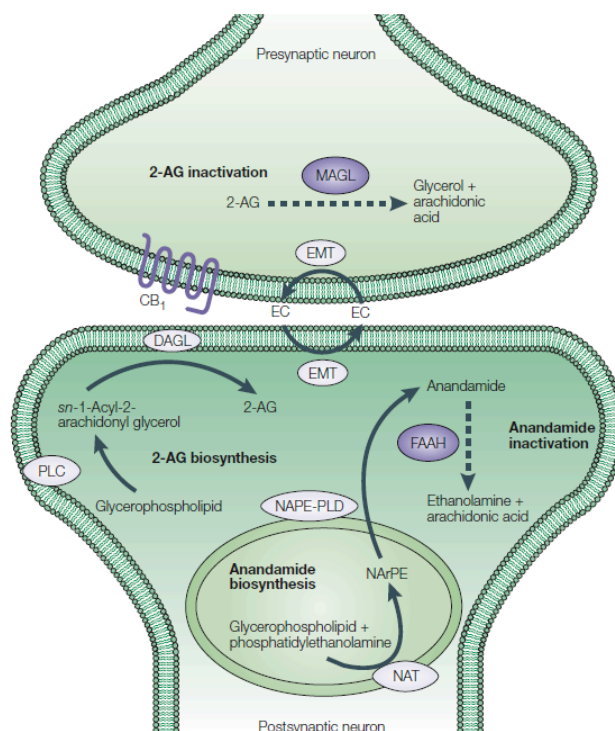
Os receptores mais bem caracterizados do SE são os receptores CB1 e CB2. A caracterização da presença do receptor CB1 no cérebro de ratos praticamente determinou a descoberta da existência do SE, que começou a ser melhor compreendido a partir de então (DEVANE et al., 1988; MATSUDA et al., 1990). Mostrou-se que esse receptor está amplamente distribuído no SNC, sendo o subtipo de receptor com a maior expressão entre todos os receptores ligados à proteína G (HERKENHAM et al., 1991; MAILLEUX; VANDERHAEGHEN, 1992; GLASS; DRAGUNOW; FAULL, 1997). O receptor CB1 está distribuído em todas as regiões do SNC incluindo-se o neocórtex, hipocampo, cerebelo e gânglios de base, amígdala, tronco encefálico, hipotálamo e hipófise (HASHIMOTODANI; OHNO-SHOSAKU; KANO, 2007). Fora do SNC o receptor CB1 também está expresso em órgãos da periferia como o coração, fígado, rins, baço, células imunes, intestino, testículos e ovários (PERTWEE, 1997). Devido à expressão dominante no SNC, o CB1 é considerado como sendo um receptor canabinóide cerebral (BREIVOGEL; CHILDERS, 1998).

Schatz et al. (1997) mostraram que a expressão do receptor canabinóide CB2 acontece predominantemente em células do SI, como células B, células T e macrófagos, assim como no baço e 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, sendo: células B > células NK > células T > monócitos > neutrófilos > células T CD8 > células T CD4 (GALIÈGUE et al., 1995).

A descoberta destes receptores levou, naturalmente, à procura por endocanabinóides no organismo. O primeiro endocanabinóide identificado foi a N-araquidoniletanolamida, descoberto em cérebros de suínos; verificou-se ser essa molécula capaz de deslocar a ligação específica de um agonista canabinóide exógeno de seu receptor, sendo ela denominada anandamida (AEA) (DEVANE et al., 1992). A AEA é encontrada no cérebro, em células do SI, no plasma, em órgãos linfóides secundários como o baço e em tecidos periféricos como o coração (RODRÍGUEZ DE FONSECA et al., 2005). Um segundo endocanabinóide é o 2-araquidonilglicerol (2-AG), que primordialmente, foi isolado do cérebro de ratos (SUGIURA et al., 1995) e também a partir do intestino de cães (MECHOULAM et al., 1995). O 2-AG, um derivado monoglicerídico do ácido araquidônico esterificado na posição sn-2, é reconhecido como o mais abundante e eficaz endocanabinóide (COMELLI et al., 2007); ele atua como agonista nos receptores canabinóides CB1 e CB2 (STELLA; SCHWEITZER; PIOMELLI, 1997; SUGIURA et al., 1999; GONSIORREK et al., 2000; SUGIURA et al., 2000; SAVINAINEN et al., 2001). Esse endocanabinóide é produzido por vários tipos de células incluindo-se aqui células endoteliais, adipócitos, células da glia, macrófagos e células de Purkinje. No cérebro, o 2-AG é mais ativo e abundante do que a AEA, e tanto a AEA quanto o 2-AG são transportados através da membrana plasmática neuronal antes de serem degradados (CABRAL; GRIFFIN-THOMAS, 2009).

Estes endocanabinóides são metabolizados por enzimas intracelulares. A AEA é hidrolisada pela *fatty acid amide hydrolase* (FAAH) e embora a 2-AG possa ser hidrolisada pela FAAH (DI MARZO et al., 1998; BISOGNO; LIGRESTI; DI MARZO, 2005) uma enzima distinta, a monoacilglicerol lipase (MAGL), desempenha papel predominante na hidrólise deste endocanabinóide (Figura 5) (HASHIMOTODANI; OHNO-SHOSAKU; KANO, 2007; CABRAL; GRIFFIN-THOMAS, 2009).

Figura 5 – Produção, liberação e degradação dos endocanabinóides



Legenda: 2-araquidonilglicerol (2-AG); monoacilglicerol lipase (MAGL); *fatty acid amide hydrolise* (FAAH); transportador de membrana (EMT); endocanabinóide (EC); receptor canabinóide 1 (CB1); fosfolipase C (PLC); diacilglicerol lipase *sn*-1 seletivo (DAGL); N-aciltransferase (NAT); N-acil fosfatidil etanolamin fosfolipase D específico (NAPE-PLD)

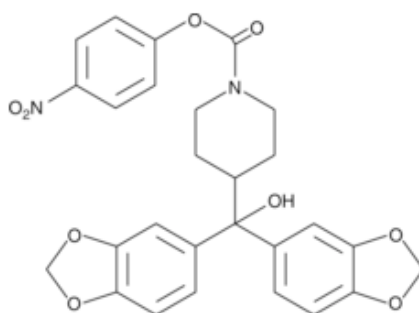
Fonte: (DI MARZO; BIFULCO; DE PETROCELLIS, 2004)

Sabe-se que os canabinóides suprimem a resposta de anticorpos em humanos e em animais, via receptor CB2, e que estes receptores estão ligados a uma variedade de funções do SI (CABRAL; GRIFFIN-THOMAS, 2009). Foi demonstrado que a supressão de imunidade humoral pelos canabinóides é atribuída pelo menos parcialmente à inibição da adenilato ciclase. Os efeitos dos canabinóides no SI ocorre de forma mais pronunciados no curso da inflamação, um processo no qual há aumento da expressão dos receptores CB2 disponíveis para serem ativados (CABRAL; GRIFFIN-THOMAS, 2009). Há, também, muitas evidências na literatura sugerindo que a ativação de receptores CB2 expressos pelos mastócitos e macrófagos esteja envolvida na regulação da resposta inflamatória, diminuindo-a (COMELLI et al., 2007).

Estão sendo desenvolvidos atualmente alguns inibidores da MAGL e da FAAH para auxiliar na elucidação do papel dos endocanabinóides como o 2-AG e a AEA nos sistemas biológicos. Long et al. (2009) sintetizaram um novo fármaco

denominado 4- nitrophenyl- 4- (dibenzo [d] [1,3] dioxol – 5 – yl (hydroxy) methyl) piperidine- 1-carboxylate (JZL184) (Figura 6). O JZL184 é um potente inibidor da atividade da MAGL *in vivo* e o faz por ligar-se de modo irreversível ao receptor da enzima (LONG; NOMURA; CRAVATT, 2009). Em camundongos, o JZL184 evita de forma rápida a hidrólise do 2-AG e mantém esta inibição por no mínimo 8 horas sem alterar os níveis da anandamida (LONG et al., 2009) mas bloqueando parcialmente a atividade da FAAH (ALHOUAYEK et al., 2011). Testaram-se em camundongos as doses 4, 16 e 40mg/kg do JZL184 de forma sistêmica. Após 16mg/kg, a atividade da MAGL foi considerada totalmente bloqueada de forma seletiva, tendo-se observado aumento dos níveis cerebrais de 2-AG, mas não de anandamida; a dose de 4mg/kg não produziu esse bloqueio total e, finalmente, a dose de 40mg/kg produziu um bloqueio não seletivo. Em um segundo experimento, empregando-se também camundongos e a dose 16mg/kg de JZL184, observou-se máxima inibição da ação da MAGL meia hora após tratamento com o bloqueio de 80% da hidrólise do 2-AG, fato que persistiu por pelo menos 24 horas. No entanto, apesar da permanência do bloqueio da MAGL por 24 horas, os níveis cerebrais de 2-AG retornaram à normalidade 24 horas após o tratamento (LONG et al., 2009).

Figura 6 - Estrutura química do JZL184



Fonte: (LONG; NOMURA; CRAVATT, 2009; LONG et al., 2009)

Empregando este novo fármaco (16mg/kg, por via sistêmica) também em camundongos, Long et al. (2009) mostraram notável variedade de efeitos dependentes de CB1 como: analgesia, hipomotilidade e hipotermia. Já Busquets-Garcia et al. (2011) utilizando o JZL184 (8mg/kg i.p.) destacaram um efeito ansiolítico em camundongos, atribuindo-o a uma ação do 2-AG em CB2 e, também,

um efeito antinociceptivo que foi por eles relacionado aos receptores CB1 e CB2 (BUSQUETS-GARCIA et al., 2011).

Após avaliação dos efeitos primários decorrentes do aumento dos níveis cerebrais e sistêmicos de 2-AG produzidos pelo uso do JZL184, propôs-se que esta nova ferramenta farmacológica seria capaz de reduzir os sinais clínicos produzidos pelo rimonabant, um bloqueador de receptor CB1, observados quando da retirada do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) em camundongos dependentes. Estudos prévios mostraram que a retirada abrupta da administração de doses repetidas de THC em camundongos não produziu sintomas de dependência como, por exemplo, tremores de pata (LICHTMAN; FISHER; MARTIN, 2001; WILSON et al., 2006); no entanto, administrando-se rimonabant (10mg/kg) no sexto dia após a remoção do tratamento com THC, o sintoma foi observado. Mostrou-se que o JZL184 (16mg/kg) administrado i.p. 2 horas antes da administração do rimonabant reduzia em 50% os tremores de pata (SCHLOSBERG et al., 2009).

Estudos recentes avaliaram os efeitos anti-inflamatórios do 2-AG empregando JZL184. A colite é uma inflamação intestinal que pode ser atenuada com a ativação dos receptores CB1 e CB2 em camundongos (ENGEL et al., 2010; STORR et al., 2008). Alhouayek et al. (2011) mostraram que o uso i.p. do JZL184 na dose 16mg/kg administrado 12 horas antes da indução da colite e mais duas vezes ao dia, após a indução da colite, até o sacrifício (3 dias) foi capaz de prevenir a inflamação do cólon (ALHOUAYEK et al., 2011). Kinsey et al. (2011) relataram ação gastroprotetora do JZL184, em doses maiores que 4mg/kg, após 2 horas de uma administração via i.p., em especial, na hemorragia gástrica por diclofenaco induzida em camundongos (KINSEY et al., 2011). Entretanto, os autores discutiram se o efeito observado era decorrência da inibição da MAGL ou do aumento sistêmico do 2-AG.

Desde a descoberta do sistema endocanabinóide, no início da década de 90, a busca pelos efeitos de endocanabinóides, como anadamida e 2-AG, sobre a imunidade têm recebido grandes contribuições. No entanto, o papel do 2-AG em modelos de inflamação ainda carece de aprofundamento. Por isso, resolvemos estudar os efeitos do aumento dos níveis sistêmicos de 2-AG (através da inibição da MAGL, com a utilização do JZL184) na inflamação aguda pulmonar ou injúria pulmonar aguda (ALI, da sigla em inglês *acute lung injury*) induzida pela administração intranasal de lipopolissacarídeo (LPS), em roedores (SZARKA et al., 1997), um modelo experimental da ALI humana. Sabe-se, a este respeito, que a

exposição ao LPS por via respiratória causa uma série de sintomas que incluem: dor-de cabeça, febre, fadiga, irritação dos olhos e nasal e, ainda, inflamação pulmonar (RYLANDER et al., 1989; LARSSON et al., 1994; PAINE, 1996; DANUSER et al., 2000).

Diante de tudo quanto exposto, há sólidas evidências que suportam a hipótese de haver substâncias que atuem no SNC e, que por serem estressores químicos, têm a capacidade de influenciar as respostas neuroimunes. Portanto, sendo a SDRA e a ALI doenças de relevância social (principal causa de morte em consequência da sepse), pareceu-nos relevante buscar os efeitos do LPS intranasal e do bloqueio da enzima degradadora do endocanabinóide 2-araquidonilglicerol (2-AG), a monoacilglicerol lipase (MAGL), sobre o comportamento e imunidade em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS (modelo experimental da ALI) previamente tratados ou não com o fármaco JZL184.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da inibição da monoacilglicerol lípase (MAGL), e a participação dos receptores CB1 e CB2 sobre parâmetros inflamatórios, neuroendócrinos e comportamentais, em camundongos submetidos a uma inflamação pulmonar aguda induzida pela administração intranasal de LPS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizando-se JZL184 como ferramenta farmacológica de um tratamento prévio, avaliar os efeitos de uma inibição prévia da MAGL em um modelo de inflamação aguda pulmonar, 6, 24 e/ou 48 horas após indução da inflamação, sobre:

1. Efeitos de doses na redução da migração de leucócitos e na produção de TNF- α no LBA;
2. Distribuição de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA), no sangue e na medula óssea;
3. Alterações histopatológicas do tecido pulmonar;
4. Produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10, IL-12p70, MIP-2 e KC) presentes no LBA;
5. Secreção de corticosterona;
6. Extravasamento vascular de proteínas no LBA;
7. Atividade da mieloperoxidase no pulmão;
8. Moléculas de adesão no endotélio pulmonar (ICAM-1 e E-selectina);
9. Moléculas de adesão em leucócitos circulantes (L-selectina, β 2-integrina, PECAM);
10. Expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α no hipotálamo;
11. Atividade locomotora dos animais (Campo Aberto);

12. Níveis de ansiedade (Labirinto em Cruz Elevado);
13. Capacidade de adaptação dos animais ao Campo Aberto.

Quando da observação dos efeitos anti-inflamatórios da inibição da MAGL, os experimentos foram repetidos utilizando-se os antagonistas CB1 (AM281) e CB2 (AM630) para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos sobre:

1. Distribuição de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA), no sangue e na medula óssea.
2. Quantificação de granulócitos da medula óssea;
3. Produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10, IL-12p70, MIP-2 e KC) presentes no LBA;
4. Extravasamento vascular de proteínas no LBA;
5. Atividade da mieloperoxidase no pulmão;
6. Moléculas de adesão em leucócitos circulantes (L-selectina, β 2-integrina, PECAM).

Utilizando-se JZL184 como ferramenta farmacológica em um tratamento terapêutico (após indução da inflamação pulmonar), avaliar os efeitos da inibição da MAGL em um modelo de inflamação aguda pulmonar, 24 horas após indução da inflamação, sobre:

1. Número de leucócitos totais no LBA;
2. Concentração da citocina pró-inflamatória TNF- α no LBA.

4 MATERIAL 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 nos experimentos camundongos C57BL/6 machos adultos, pesando entre 20 e 30g, 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 aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais da FMVZ – USP, protocolado sob número 2255/2011.

Antes do início dos experimentos, os animais foram alojados, por um período mínimo de 7 dias, em gaiolas de propileno (28 x 17 x 12cm) em número entre 3 e 5 animais por gaiola para adaptação às condições do biotério experimental. Estas gaiolas foram devidamente acondicionadas em salas com temperatura ambiente (22 a 26°C) e umidade (65 a 70%) mantidas 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 FÁRMACOS

O JZL184 (4-nitrophenyl-4-(dibenzo[d][1,3]dioxol-5-yl(hydroxy)methyl)piperidine -1-carboxylate) (Cayman Chemical, Michigan, USA) foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 16 mg/kg (0,1mL / 10g de peso) (LONG; NOMURA;

CRAVATT, 2009; LONG et al., 2009). O fármaco foi dissolvido em 15% dimetilsulfóxido (DMSO), 4,25% de polietilenoglicol (PEG) 400, 4,25% de *Tween* 80 e 76,5% de NaCl 0,9%. O tratamento consistiu de uma dose única feita 60 minutos antes da administração intranasal de LPS (nos experimentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6) ou em uma única dose feita 6 horas após a indução da ALI (experimento 7). Os animais do grupo controle receberam um volume similar de veículo, o mesmo utilizado para o preparo do fármaco.

O AM281 (1-(2,4-Diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-4-morfolinil-1H-pirazol-3-carboxamida) (Sigma Aldrich, St Louis, USA) e AM630 (6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil) etil]-1H-indol-3-il](4-metoxifenil)methanone) (Tocris Bioscience, Bristol, UK) foram administrados por via i.p. nas doses de 2,5 ou 5,0 mg/kg (ASGHARI-ROODSARI et al., 2010; GAMALEDDIN et al., 2012; VASEGHI; RABBANI; HAJHASHEMI, 2012). Os fármacos foram dissolvidos em 10% DMSO, 10% de *Tween* 80 e 80% de NaCl 0,9%. O tratamento consistiu de uma dose única feita 30 minutos antes da administração do JZL184. Os animais do grupo controle receberam um volume similar de veículo, o mesmo utilizado para o preparo dos fármacos. Todos os tratamentos foram realizados no período da manhã, entre 7h30 e 11 horas.

4.3 MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA

Uma hora após (experimentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6) ou seis horas antes (experimento 7) da administração do JZL184 os animais foram submetidos à instilação intra-nasal de LPS. Para tanto, os camundongos foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente, i.p.). O LPS (*Escherichia coli* serotype 055:B5, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) foi instilado por via nasal, em temperatura ambiente, na concentração de 100 µg/ml (após diluição em PBS), no volume de 1µl/g de animal. Esta concentração e via de administração do LPS baseiam-se nos estudos de Corteling et al. (2002) e Ribeiro et al. (2012). Como controle, foram utilizados animais submetidos à instilação de solução salina (NaCl 0,9%) apirogênica, nos mesmos volumes utilizados para o LPS. Decorridas 6, 24 ou 48 horas os animais foram novamente anestesiados, submetidos à eutanásia por

dessangramento através da artéria aorta abdominal e as amostras necessárias foram coletadas.

4.4 COLETA DE MATERIAL

Decorridas as 6, 24 ou 48 horas da instilação nasal de LPS (ou salina para o grupo controle), os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente, i.p.), submetidos a laparotomia mediana e dessangrados pela aorta abdominal.

4.4.1 Sangue

Uma alíquota de sangue foi tomada da aorta abdominal de cada animal com o auxílio de seringas plásticas de 1mL. Em seguida, aproximadamente 200 μ L de sangue foi transferido para microtubos contendo 10 μ L de solução de EDTA 10%. As amostras de sangue foram utilizadas para a contagem de leucócitos totais, diferenciais (corada com May-Grünwald-Giemsa) e para a análise das moléculas de adesão (L-selectina, β 2-integrina, PECAM) (item 4.6). Para tanto, alíquotas da amostra (10 μ l) foram acrescidas de 190 μ l do corante azul de Trypan e contadas em câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial, foi realizada extensão sanguínea com 5 μ l de amostra, as lâminas foram submetidas à coloração de Rosenfeld e analisadas em microscopia óptica comum. Foram contadas no mínimo 200 células, deferenciando-as morfológicamente em neutrófilos, monócitos e linfócitos.

Uma alíquota de sangue foi tomada da decaptação de cada animal em tubos secos. Em seguida, o material foi centrifugado a 280 x g e aproximadamente 200 μ L de soro foram armazenados a -80°C até o momento das análises. As amostras de soro foram utilizadas para a análise de concentração de cortiosterona.

4.4.2 Lavado Bronco-Alveolar (LBA)

Foi realizada uma incisão longitudinal na região cérvico-ventral; a traquéia foi exposta e canulada com o auxílio de uma cânula metálica de calibre 20 Gauge, fixada com fio de algodão ao redor da traquéia. A cânula foi acoplada a uma seringa contendo 0,8 mL de PBS (tampão fosfato pH 7,4) que foi injetado no espaço alveolar e, logo após, o lavado foi coletado em microtubo. Após este procedimento, mais 0,7 mL de PBS foi injetado no pulmão, sendo o lavado coletado e transferido para um microtubo, totalizando-se um volume de 1,5 mL.

O LBA obtido foi centrifugado a 250 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para a dosagem de citocinas / quimiocinas (item 4.7) e avaliação do extravasamento vascular (item 4.10); o botão celular foi ressuspensão em 1 ml de PBS e foi feita a análise das moléculas de adesão (item 4.9) e a contagem do número de leucócitos totais e diferenciais no LBA. Para tanto, alíquotas da amostra (90µl) foram acrescidas de 10µl de cristal de violeta 0,2% dissolvido em ácido acético 30% e contadas em câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial, alíquotas das amostras (100 µl) foram colocadas em Citocentrífuga Cytospin® (FANEM, São Paulo, Brasil) e centrifugadas a 250 x g por 10 minutos. A contagem diferencial foi realizada por coloração de Rosenfeld em microscopia óptica comum; foram contadas no mínimo 200 células, diferenciando-as morfológicamente em neutrófilos, macrófagos e linfócitos.

4.4.3 Medula óssea

Após a coleta do sangue e do LBA, o fêmur direito foi removido e as epífises foram cortadas transversalmente. Uma agulha de calibre 30 Gauge foi conectada a uma seringa plástica contendo 2 mL de meio de cultura de tecido animal desidratado (RPMI) foi inserida na medula femoral e as células foram lavadas e retiradas fisicamente. A suspensão celular foi centrifugada a 250 x g por 5 minutos. O botão celular foi ressuspensão em 1mL de PBS e analisado. A contagem do número total de células foi realizada em câmara de Neubauer na diluição de 40x com o corante azul

de Trypan e analisada em microscópio óptico comum. A quantificação de granulócitos foi realizada com a marcação do anticorpo Ly6G e lida em um citômetro de fluxo (Becton Dickison Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado a um computador (Machintosh Apple, San Jose, CA, USA). Foram adquiridos 10.000 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 FloJo® versão 7.0.

4.4.4 Pulmão

A cavidade torácica foi aberta e o leito vascular pulmonar perfundido com 10mL de PBS por meio de uma cânula inserida na artéria pulmonar. Uma fração do pulmão foi coletada, pesada e guardada em freezer -80°C até o momento da análise (itens 4.6 e 4.8).

4.4.5 Hipotálamo

Os animais tratados ou não com JZL184 e submetidos ou não a instilação intranasal de LPS foram decaptados. O crânio dos animais foram cuidadosamente abertos e os hipotálamos removidos. Todo o hipotálamo foi coletado em menos de 3 minutos, adicionado em nitrogênio líquido, pesado e guardado em freezer -80°C até o momento das análises (item 4.13 e 4.14)

4.5 ANÁLISES HISTLÓGICAS DO TECIDO PULMONAR

Análises histológicas do tecido pulmonar foram realizadas de acordo com a literatura (KIM et al., 2010; FALLER et al., 2012a). Foi coletado o pulmão esquerdo dos animais; em seguida ele foi devidamente fixado, embocado em parafina e

cortado a 5µm. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (H.E.) conforme descrito (FALLER et al., 2012b). De cada amostra, foram tiradas quatro fotos representativas (aumento x200). Cinco pontos da parede alveolar de cada foto foram aleatoriamente escolhidos e na sequência, a espessura das paredes alveolares foram mensuradas através do programa ImageJ (ImageJ, U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, E.U.A.). Para cada imagem aleatória, também foi atribuído um “escore” de lesão pulmonar, isto é, uma avaliação do grau de dano tecidual causado pelo LPS. Em resumo, foram pontuadas a (a) espessura das paredes alveolares, (b) a infiltração ou agregação de células inflamatórias, (c) presença de hemorragia e (d) a congestão alveolar. Cada amostra foi graduada de acordo com a escala: 0 - sem dano tecidual, 1 - pouco dano, 2 - dano moderado, 3 - muito dano e 4 - máximo dano tecidual. As amostras foram avaliadas por dois profissionais independentes e o grau da ALI foi obtido com a soma de cada item pontuado (pontuação de 0 a 16). A média da soma de cada leitura foi comparada entre os grupos.

4.6 DOSAGEM DE CITOCINAS/QUIMIOCINAS

O sobrenadante do LBA foi coletado e armazenado a -80°C para posterior quantificação das citocinas / quimiocinas. As dosagens de TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- γ e MCP-1 foram realizadas por Citometria de Fluxo (CBA Inflammation, BD, San Diego, USA), conforme especificação do fabricante. A quantificação das quimiocinas MIP-2 (proteína inflamatória de macrófagos) e KC (químioatrativo de queratinócito) foram realizadas por kit de ELISA (Quantikine® ELISA Mouse CXCL2/MIP-2, R&D Systems, Minneapolis, USA e Mouse KC Quantikine® ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, USA, respectivamente), conforme especificações dos fabricantes.

4.7 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

Após anestesia, os animais foram submetidos a laparotomia mediana e dessangrados pela aorta abdominal. A cavidade torácica foi exposta e o leito vascular pulmonar perfundido com 10mL de PBS por meio de uma cânula inserida na artéria pulmonar. Uma fração do pulmão foi coletada, pesada e guardada no freezer -80°C até o momento das análises. As amostras foram preparadas de acordo com (GOLDBLUM; WU; JAY, 1985). Brevemente, a fração do pulmão foi homogeneizada em 1mL de PBS contendo 0,5% de bromidrato de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e EDTA 5mM, pH6,0. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 30.000g por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a análise de atividade da MPO. Para isto, o homogenato do pulmão (10µL) foi incubado por 5 min com 200 µL de solução contendo H₂O₂ (0,1%) e orto-dianisidina. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de azida sódica (1%). A absorbância foi determinada utilizando-se um leitor de microplacas a 450nm (Bio-Tek Instruments®, Winooski, USA). O cálculo final da atividade de MPO foi normalizado dividindo-se os valores de absorbância pelo peso em gramas do tecido pulmonar.

4.8 AVALIAÇÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO DO SANGUE E LBA

Após centrifugação, o botão celular do LBA foi ressuspenso em 1mL de PBS. As células do LBA e do sangue foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD62L (L-selectina), CD18 (β2-integrina) e CD31 (PECAM), conforme especificação do fabricante.

Após o período de incubação, as células foram analisadas em citômetro de fluxo (Becton & Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado a um computador (Macintosh Apple, CA, USA). Para tanto, foram contados 10.000 eventos utilizando-se o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades *forward scatter/ side scatter* (FSC/SSC)

(tamanho/granulosidade) das mesmas, e os resultados de fluorescência foram adquiridos em escala logarítmica. Mensurando-se a fluorescência dos isotopos FITC, PE e/ou APC, a quantificação da expressão dos marcadores foi estimada pela intensidade de fluorescência média.

A dosagem da citocina TNF- α no tratamento terapêutico foi realizada por ELISA (ELISA MAX[®], Biolegend, San Diego, USA), conforme especificação dos fabricantes.

4.9 EXTRAVASAMENTO VASCULAR: QUANTIFICAÇÃO DE ALBUMINA NO LBA

Para a avaliação da formação de edema pulmonar, foi realizada a dosagem da concentração de proteínas no LBA. Alíquotas de LBA (10 μ l/poço) foram adicionadas a placa de 96 poços contendo 250 μ l de reagente de Bradford (Brilliant Blue G, diluído em ácido fosfórico e metanol, Sigma Aldrich, St Louis, USA). A leitura óptica foi realizada em leitor ELISA (Bio-Tek Instruments[®]) a 595 nm e os resultados foram comparados com curva padrão de albumina sérica bovina (100-1500 μ g/ml).

4.10 COLETA DE DADOS COMPORTAMENTAIS

Decorridas as 6, 24 e/ou 48 horas da instilação nasal de LPS (ou salina para o grupo controle), os animais passaram por análises comportamentais, sendo posteriormente guilhotinados para análise de corticosterona circulante e coletados os hipotálamos para análise de citocinas hipotalâmicas.

4.10.1 Campo aberto e medida da atividade locomotora

Trata-se de uma arena circular feita de madeira e pintada na cor branca, medindo 40,0 cm de diâmetro e 25,0 cm de altura, sendo o conjunto todo elevado a

55 cm do solo. A atividade locomotora dos animais foi avaliada por meio da observação indireta por intermédio do sistema Ethovision (Video Tracking Motion & Behavior Recognition System® versão XT7.1, Noldus Information Technology, Leesburg, EUA). Desta forma, a presença do observador não interferiu com os parâmetros observados, uma vez que este ficou fora da sala onde encontravam-se os animais em teste. É importante ressaltar que a sala onde, os testes foram realizados, 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 foi realizada sempre no mesmo período do dia (entre as 8:00 hs e 12:00 hs), com exceção da avaliação 6 horas após a instilação intranasal de LPS. A arena foi limpa com uma solução aquosa de álcool a 5 % antes da introdução de cada animal com a finalidade de evitar odores deixados pelo animal anterior.

Após as filmagens, no sistema Ethovision, o fundo circular da arena foi dividido, virtualmente, por 3 círculos concêntricos, dividindo as zonas central, mediana e periférica para avaliação dos seguintes parâmetros: (1) distância percorrida (cm); (2) velocidade média (cm/s); (3) tempo de permanência na zona central (s); (4) tempo de permanência na zona mediana (s) e (5) tempo de permanência na zona periférica (s) durante os 5 minutos do teste.

Duas observações foram feitas no CA: locomoção e capacidade de adaptação ao aparelho. Para avaliar a atividade locomotora utilizou-se diferentes animais na arena CA nos diferentes períodos 6, 24 e 48 horas após instilação intranasal de LPS, ou seja, cada animal passou somente uma vez pela arena CA. Para avaliar a capacidade de adaptação dos animais no CA, os mesmos animais foram submetidos ao teste CA nos períodos 6, 24 e 48 horas após a instilação intranasal de LPS, ou seja, cada animal passou três vezes pelo aparato de CA.

4.10.2 Medida de ansiedade por meio do labirinto em cruz elevado

Trata-se de um labirinto em forma de cruz feito de madeira e pintado na cor branca, constituído por dois braços abertos medindo 15cm de comprimento por 5cm

de largura cada um, em oposição a dois braços fechados de iguais medidas, mas com paredes laterais com 15cm de altura. Na intersecção dos braços abertos e fechados, forma-se um espaço de 25m² de área denominado centro, sendo o conjunto todo elevado a 55 cm do solo. Os níveis de ansiedade dos animais foi avaliada por meio da observação indireta por intermédio do sistema Ethovision (Video Tracking Motion & Behavior Recognition System® versão XT7.1, Noldus Information Technology, Leesburg, EUA). Desta forma, a presença do observador não interferiu com os parâmetros observados, uma vez que este ficou fora da sala onde encontravam-se os animais em teste. É importante ressaltar que a sala onde, os testes foram realizados, 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 comportamental foi realizada sempre no mesmo período do dia (entre as 8:00 hs e 12:00 hs), com exceção da avaliação 6 horas após a instilação intranasal de LPS. A arena foi limpa com uma solução aquosa de álcool a 5 % antes da introdução de cada animal com a finalidade de evitar odores deixados pelo animal anterior.

A avaliação dos níveis de ansiedade dos animais no LCE foi realizada como descrito por Pellow et al. (1985) e validado para camundongos por Lister (1987). Assim, após as filmagens, fez-se no software Ethovision® as divisões, na arena LCE, dos braços abertos e dos braços fechados analisando o registro dos seguintes parâmetros: (1) número de entradas nos braços abertos (EBA) (porcentagem de EBA em relação ao total de entradas nos 4 braços), (2) número de entradas nos braços fechados (EBF) (porcentagem de EBF em relação ao total de entradas nos 4 braços), (3) tempo de permanência nos braços abertos (TBA) (porcentagem de TBA em relação ao tempo total de 5 minutos) e (4) tempo de permanência nos braços fechados (TBF) (porcentagem de TBF em relação ao tempo total de 5 minutos).

Avaliou-se a ansiedade no LCE nos animais tratados e instilados com LPS 48 horas após indução da ALI.

4.11 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA

No momento da dosagem, as amostras de soro previamente identificadas, foram retiradas do *freezer* e mantidas à temperatura ambiente ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) para o descongelamento. As dosagens foram analisadas por meio de *kits* comerciais *DetectX® Corticosterone* (EIA kit, Arbor Assays®, Michigan, USA) que quantifica a corticosterona por método imunoenzimático não competitivo, conforme especificação do fabricante.

4.12 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA HIPOTALÂMICA POR RT-PCR

As amostras de hipotálamo dos animais foram submetidas ao processo de extração de RNA pelo sistema de purificação e extração por colunas. Este material foi quantificado e normalizado pelo Nanodrop para a realização da transcrição reversa do RNA em cDNA. Foi verificada a qualidade do RNA extraído pela corrida em gel de agarose 1,5%. A partir do cDNA, foi realizado a técnica do PCR em tempo real para análise da expressão gênica de IL-1B, IL-6 e TNF- α .

Extração de RNA

A extração de RNA do hipotálamo foi realizada através do kit para extração de RNA - *RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (RNAspin Mini Kit, GE Healthcare, UK). Em cerca de 6-8 mg de tecido hipotalâmico foram adicionados 350 μL da solução de lise RA1 e 3,5 μL de β -mercaptoetanol. As amostras sofreram lise mecânica por meio de pistilo autoclavado e RNase-free. A partir deste momento a mistura foi transferida para as colunas de extração, seguindo-se o protocolo determinado pelo fabricante do kit de extração. O processo consistiu basicamente em colocar as células em pequenas colunas de extração (adaptáveis a um microtubo de 1,5 mL), estas reteram o RNA enquanto o mesmo foi lavado e purificado com uma seqüência de reagentes. Na etapa final o reagente promoveu a liberação do RNA da coluna, o qual foi mantido em freezer -80°C até o momento do uso.

Quantificação e determinação da integridade do RNA total (Eletroforese e Nanodrop)

Uma alíquota de 10 µL foi retirada para quantificação e para verificação da integridade do RNA. O restante foi armazenado imediatamente em freezer -80°C até sua utilização. A análise qualitativa foi realizada submetendo-se as amostras a eletroforese em gel de agarose 1,5% diluída em TAE 1X (48,4g de Tris base; 20mL de EDTA 0,5M, pH 8,0; 1L,4mL de Ácido Acético; H₂O MilliQ autoclavada q.s.p. 1000mL), 60V, por 1,5 hora. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5mg/mL em água destilada) para a visualização das bandas 28S e 18S em luz UV. A correta identificação destas bandas indica a qualidade do RNA. A quantificação foi realizada pelo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) (260/280 nm). Amostras num range de 1,7 até 2,0 ng/µL indicaram baixa contaminação do RNA, sendo consideradas de boa qualidade para a transcrição reversa.

Transcrição Reversa

Para eliminar quaisquer resquícios de DNA, o RNA total foi tratado com DNase I. Foi utilizado 1 µl de DNase I para tratar 4 µg/µl de RNAtotal. Os microtubos foram mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos, sendo adicionado 1 µl de EDTA (25mM) para bloquear a ação da enzima e aquecidos por 10 minutos a 65°C em banho seco seguido de resfriamento em banho de gelo. As amostras receberam 1 µL de Oligo DT; 1 µL de dNTPs (mix 10mM- 2,5mM de cada dNTP) sendo posteriormente incubadas a 65°C por 5 minutos e resfriadas em gelo. Ainda no gelo adicionou-se em cada tudo 4 µL do buffer 5X (superscript II); 2 µl de DTT 1M; 1 µL de RNase OUT incubando-se os mesmos por 2 minutos a 42°C e resfriado-os, posteriormente em gelo. Foi acrescido 1 µL da enzima de transcrição reversa superscript II a cada amostra, permanecendo as mesmas em incubação a 42°C, por 50 minutos e em seguida por 70°C por 15 minutos e resfriados no gelo. Em seguida foi acrescido 1 µL da enzima RNase H (para eliminação de resíduos de RNA da amostra de cDNA), permanecendo por 20 minutos a 37°C. O cDNA foi armazenado a -20°C até o momento da amplificação do cDNA. Todos os reagentes foram fornecidos pela *Invitrogen Life Technologies* (Life Technologies, California, USA).

Quantificação da Expressão Gênica por PCR em Tempo Real

A análise por PCR em tempo real foi realizada em sistema de detecção StepOnePlus Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA). Para avaliação da expressão foram colocados em tubos apropriados (Optical Tubes Applied Biosystems) 2 μ L de cada produto de PCR (cerca de 10ng de RNA total), tampão A TaqMan 1X, MgCl₂ 5,5 mM, 200 nM de dATP/dCTP/dGTP, 400 μ M dUTP, 200 nM dos primers (senso e antisenso), 100 nM das probes TaqMan, 0,01U/mL de AmpErase e 0.025 U/ μ l da DNA polimerase AmpliTaq Gold em um volume total de 50 μ L. Após a completa mistura dos reagentes cada tubo foi fechado com tampas MicroAmp Optical (Applied Biosystems). Todas as reações foram corridas em duplicata. As condições de amplificação utilizadas para quase todos os genes foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos à 95°C; seguidos de 50 ciclos a 90°C por 15 segundos para desnaturação da fita de cDNA e a 60°C por 1 minuto para sua extensão. A interpretação dos resultados foi realizada conforme descrito pelo método comparativo de Livak e Schmittgen (2001) onde a expressão relativa dos genes corresponde a $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Ensaio (*Primers*)

Todos os ensaios (*primers*) foram adquiridos da empresa Applied Biosystems, e seus respectivos IDs estão descritos no quadro 1.

Quadro 1 - Ensaio da empresa *Applied Biosystems* utilizados para análise da expressão gênica por PCR em tempo real

GENES	ASSAY ID
IL-1 β	Mm99999061_mH
IL-6	Mm00446191_m1
TNF- α	Mm00443258_m1
18S (Controle endógeno)	4352930E

A interpretação dos resultados foi realizada conforme descrito pelo método comparativo de Livak e Schmittgen (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) onde a expressão relativa dos genes corresponde a $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene beta-Actina será utilizado como controle endógeno.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Softwares, Inc.). Os dados foram primeiro avaliados pelo teste de Bartlett para determinação da homogeneidade das variâncias. Os dados paramétricos foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas Tukey-Kramer, para avaliação dos contrastes. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn de comparações entre três ou mais grupos. O teste t e o teste Mann Whitney U foram usados para a comparação de dados entre dois grupos. Os dados de MPO e albumina pulmonar foram analisados utilizando-se testes aplicados para dados não-paramétricos após terem sido normalizados como percentual do grupo controle não inflamado (veículo+salina – C1). Os dados comportamentais e de citocinas hipotalâmicas foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Em todos os experimentos, foram consideradas significantes as análises com $p \leq 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

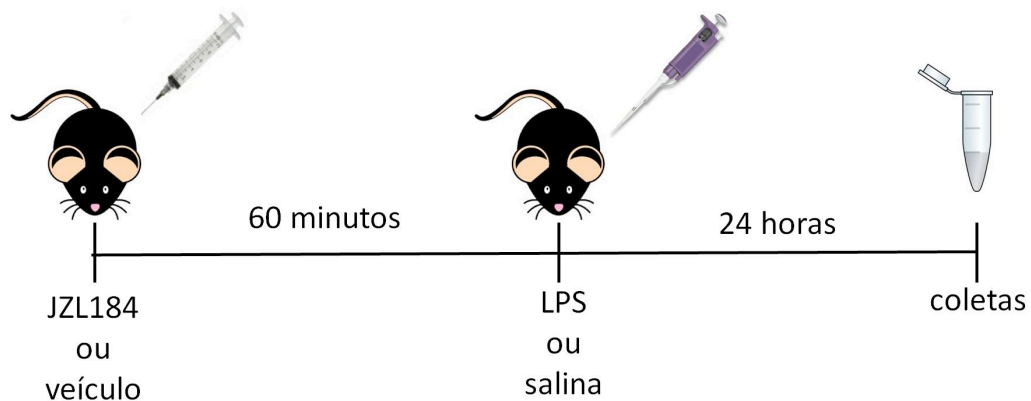
Destaque-se, inicialmente, que não foram encontradas diferenças significantes entre os animais dos grupos tratados ou não com o fármaco e com salina intranasal, ou seja, o JZL184 não produziu efeitos na ausência da administração do LPS nos parâmetros anti-inflamatórios avaliados (dados do Grupo C1 são estatisticamente semelhantes aos do grupo E1 – experimentos 1, 2 e 3).

5.1 EXPERIMENTO PILOTO: DOSES E EFEITOS DA INIBIÇÃO DA MAGL E AVALIAÇÃO DE POSSÍVEL ATIVIDADE DO VEÍCULO DO JZL184 EM UM MODELO MURINO DE ALI

Afim de escolher a melhor dose do JZL184, avaliamos os efeitos anti-inflamatórios do fármaco no modelo de ALI. Para tanto, foram utilizados 39 camundongos da linhagem C57BL/6 divididos em 5 grupos (n= 6-10 por grupo). Em todos os grupos, os animais foram tratados i.p. com JZL184 em diferentes doses ou veículo e após 60 minutos foram anestesiados, instilando-se LPS ou NaCl 0,9% em suas vias aéreas superiores. Nos animais do grupo controle 1 (salina) injetou-se o veículo i.p. e instilou-se salina estéril nas suas vias aéreas superiores. Naqueles do grupo controle 2 (LPS), o controle inflamado, os animais foram injetados com veículo do JZL184, sendo instilados com o LPS. Nos grupos 3, 4 e 5 injetou-se o JZL184 nas doses 4mg/kg (4), 16mg/kg (16) e 40mg/kg (40), respectivamente instilando-se LPS. Após 24 horas, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina e eutanasiados para coletas, conforme ilustrado na figura 7.

A coleta do lavado bronco-alveolar (LBA) foi realizada conforme descrito no item 4.5.2. A contagem total e diferencial dos leucócitos no LBA e a dosagem de TNF- α do LBA foram realizadas como descrito nos itens 4.5.2 e 4.7, respectivamente.

Figura 7 - Delineamento experimental empregado no experimento piloto para caracterização das doses e dos efeitos do JZL184



Fonte: (PAVANI, 2014)

A tabela 1 mostra os efeitos de doses crescentes do JZL184 sobre a migração de leucócitos para os pulmões. Observou-se que a instilação nasal de LPS (veículo+LPS) induziu um aumento do número de células totais no LBA ($F(4,34) = 33,87$; $p < 0,0001$) (Figura 8A); mais especificamente, do número de neutrófilos ($F(4,34) = 33,62$; $p < 0,0001$) (Figura 8B), em relação aos animais do grupo instilado com NaCl 0,9%. A análise estatística dos dados mostrou que o pré-tratamento com JZL184 após as doses 16mg/kg e 40 mg/kg (JZL+LPS) foi capaz de prevenir o aumento do número de células inflamatórias totais induzido pelo LPS nos animais quando comparados ao controle inflamado ($F(4,34) = 33,87$) (Figura 8A). O número de neutrófilos foi reduzido de forma significativa após as doses de 16mg/kg e 40mg/kg de JZL184 em relação ao controle inflamado ($F(4,34) = 33,62$) (Figura 8B). Não se observaram diferenças estatísticas entre os grupos avaliados quanto ao número de linfócitos (Figura 8C) e macrófagos (Figura 8D).

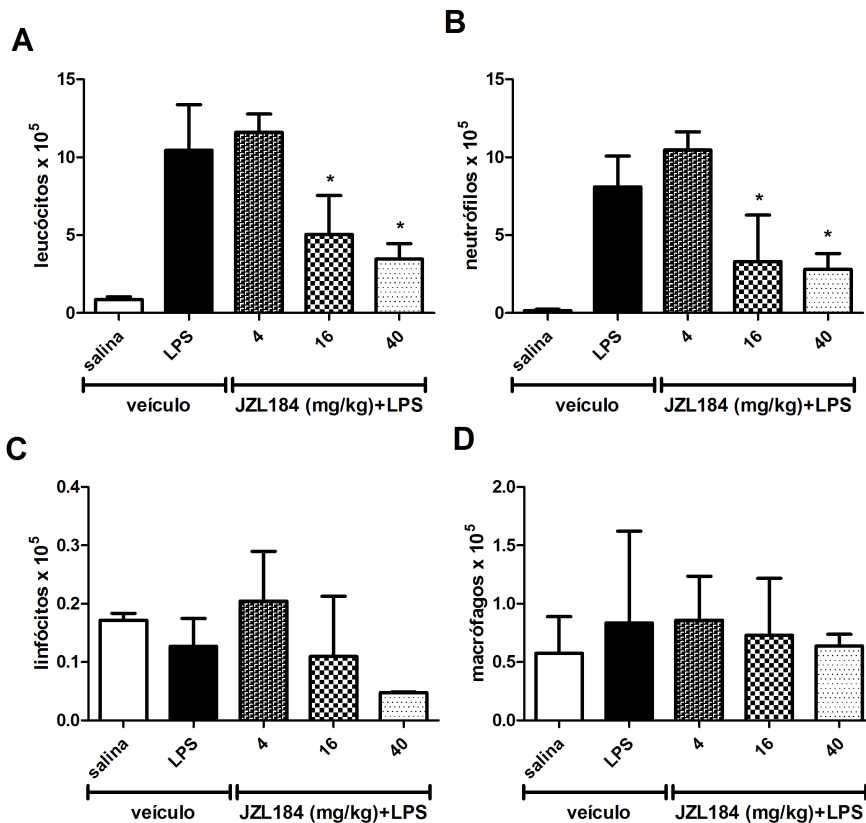
Após análise dos dados relativos às células do LBA, avaliamos os possíveis efeitos do bloqueio da MAGL sobre os níveis de Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) no LBA no modelo murino de ALI (Tabela 2). As doses de 16 ($p < 0,0001$) e 40 ($p < 0,0001$) mg/kg de JZL184 reduziram os níveis de TNF- α no LBA em relação ao controle inflamado ($F(4,34)=16,41$) (Figura 9).

Tabela 1 - Efeitos do tratamento com JZL184 na contagem de leucócitos em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda (ALI)

Leucócitos	Totais	Linfócitos	Macrófagos	Neutrófilos
Tratamento	(x 10 ⁵)	(x 10 ⁵)	(x 10 ⁵)	(x 10 ⁵)
Veículo+salina	0,8628±0,1897*	0,1717±0,0117	0,5758±0,3158	0,1617±0,0872*
Veículo+LPS	10,44±2,933	0,1268±0,0482	0,8345±0,7880	8,100±1,980
JZL184	11,60±1,179	0,2045±0,0852	0,8595±0,3762	10,47±1,156
4mg/kg+LPS				
JZL184	5,046±2,507*	0,1094±0,1032	0,7286±0,4896	3,310±2,988*
16mg/kg+LPS				
JZL184	3,473±0,982*	0,0477±0,0016	0,6369±0,1009	2,804±1,009*
40mg/kg+LPS				

Os dados representam a média ± desvio padrão, correspondente à contagem de leucócitos no LBA. *p<0,0001 em relação ao grupo controle inflamado (veículo+LPS). ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey-Kramer

Figura 8 - Efeitos do tratamento com JZL184 na contagem de leucócitos em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda (ALI)



Legenda: (A) contagem de leucócitos totais do LBA, em, (B) número de neutrófilos, (C) linfócitos e (D) macrófagos no LBA. *p<0,05 em relação ao grupo controle inflamado (veículo+LPS). ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey-kramer

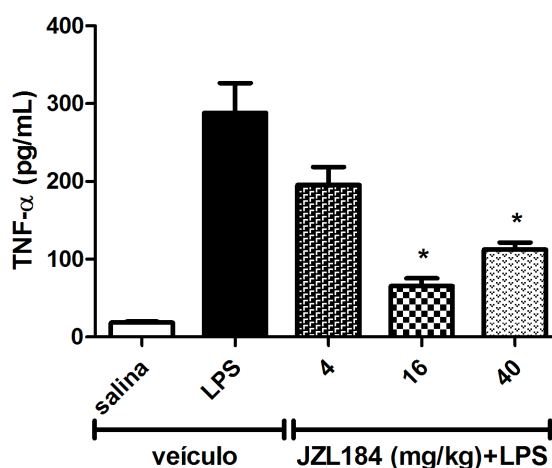
Fonte: (PAVANI, 2014)

Tabela 2 - Efeitos do tratamento com JZL184 nos níveis de TNF- α em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda (ALI)

Tratamento	TNF- α (pg/mL)
Veículo+salina	18,42 \pm 4,747*
Veículo+LPS	288,3 \pm 171,6
JZL184 4mg/kg+LPS	195,6 \pm 56,12
JZL184 16mg/kg+LPS	65,48 \pm 34,74*
JZL184 40mg/kg+LPS	112,6 \pm 35,39*

Os dados representam a média \pm desvio padrão correspondentes aos níveis de TNF- α no LBA. *p<0,0001 em relação ao grupo controle inflamado (veículo+LPS). ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey-Kramer

Figura 9 - Efeitos do tratamento com JZL184 nos níveis de TNF- α em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda (ALI)



*p<0,0001 em relação ao grupo controle inflamado (veículo+LPS). ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey-Kramer

Fonte:

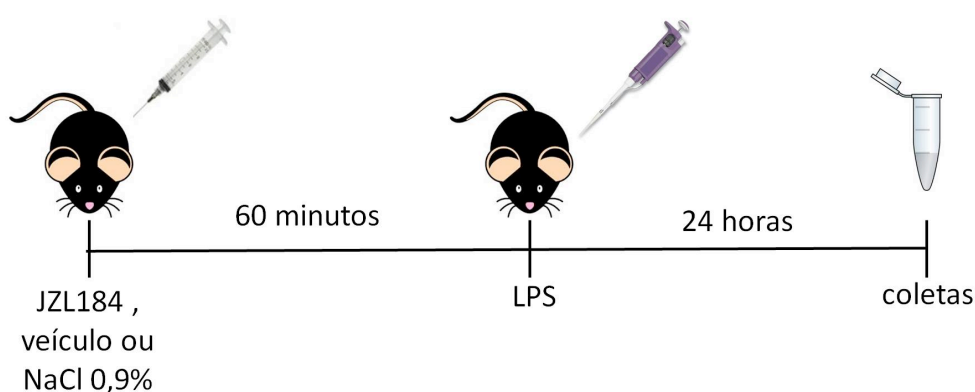
(PAVANI, 2014)

A partir destes resultados, todos os outros experimentos foram realizados utilizando-se a dose de 16mg/kg do JZL184.

Para verificar se os efeitos observados nos experimentos acima eram mesmo decorrentes da inibição da MAGL pela utilização do JZL184 ou se houve interferência do veículo empregado na diluição do fármaco (15% de DMSO + 4,25% de PEG400 + 4,25% de Tween 80 + q.s.p. 100% de salina), realizou-se um experimento para avaliar possíveis efeitos do veículo e do JZL184.

Foram utilizados 18 camundongos da linhagem C57BL/6 divididos em 3 grupos (n= 5 por grupo). Os animais foram tratados i.p. com NaCl 0,9%, com veículo do JZL184 ou com JZL184 (16mg/kg) diluído em veículo; após 60 minutos os animais foram anestesiados, instilando-se o LPS em suas vias aéreas. No grupo 1, injetou-se a salina e instilou-se LPS. No grupo 2, os animais foram injetados com veículo e inflamados com o LPS. No grupo 3, injetou-se JZL184 na dose de 16mg/kg e instilou-se LPS. Após 24 horas, os animais foram anestesiados e eutanasiados para a coleta do lavado bronco-alveolar (LBA), conforme ilustrado no figura 10.

Figura 10 - Delineamento experimental empregado no experimento piloto para verificação de possíveis efeitos do veículo do JZL184



Fonte: (PAVANI, 2014)

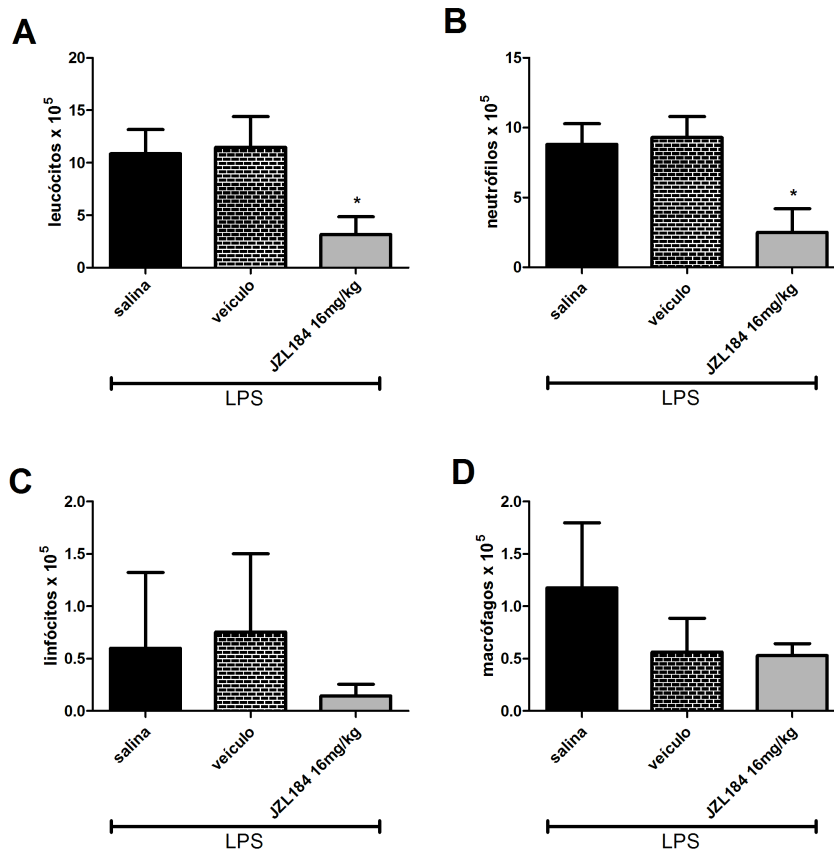
A tabela 3 mostra e a figura 11 ilustra os efeitos do JZL184, veículo ou NaCl 0,9% na migração de leucócitos para os pulmões de camundongos inflamados com LPS intra-nasal. Observamos redução no número de leucócitos totais ($F(2,15) = 15,84$; $p < 0,001$) (Figura 11A) e de neutrófilos ($F(2,15) = 26$; $p < 0,0001$) (Figura 11B) nos animais tratados com JZL184, mas não observamos diferenças entre os dados dos grupos tratados com NaCl 0,9% ou veículo ($F(2,15) = 15,84$; $p > 0,05$ para leucócitos totais; $F(2,15) = 26$; $p > 0,05$ para neutrófilos). Não observamos diferença, também, entre o número de linfócitos ($F(2,15) = 1,065$) (Figura 11C) e macrófagos ($F(2,15) = 3,379$; $p > 0,05$) (Figura 11D) entre os grupos avaliados. Sendo assim, concluímos que o veículo utilizado para diluir o fármaco não interferiu com a inflamação pulmonar aguda induzida por LPS e confirmamos a ação anti-inflamatória do JZL184 na dose de 16 mg/kg.

Tabela 3 - Efeitos do veículo do JZL184 sobre o número de leucócitos no LBA em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda (ALI)

Leucócitos	Totais	Linfócitos	Macrófagos	Neutrófilos
Tratamento	(x 10 ⁵)	(x 10 ⁵)	(x 10 ⁵)	(x 10 ⁵)
Salina+LPS	10,86±2,301	0,5984±0,7239	1,175±0,6215	8,811±1,465
Veículo+LPS	11,48±2,928	0,7543±0,7487	0,5648±0,3211	9,300±1,488
JZL184 16mg/kg+LPS	3,163±1,676*	0,1442±0,1119	0,5299±0,1138	2,488±1,707*

Os dados representam a média ± desvio padrão, correspondente à contagem de leucócitos no LBA. *p<0,001; em relação ao grupo controle salina+LPS. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey-Kramer

Figura 11 - Efeitos do veículo do JZL184 sobre o número de leucócitos no LBA em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda (ALI)



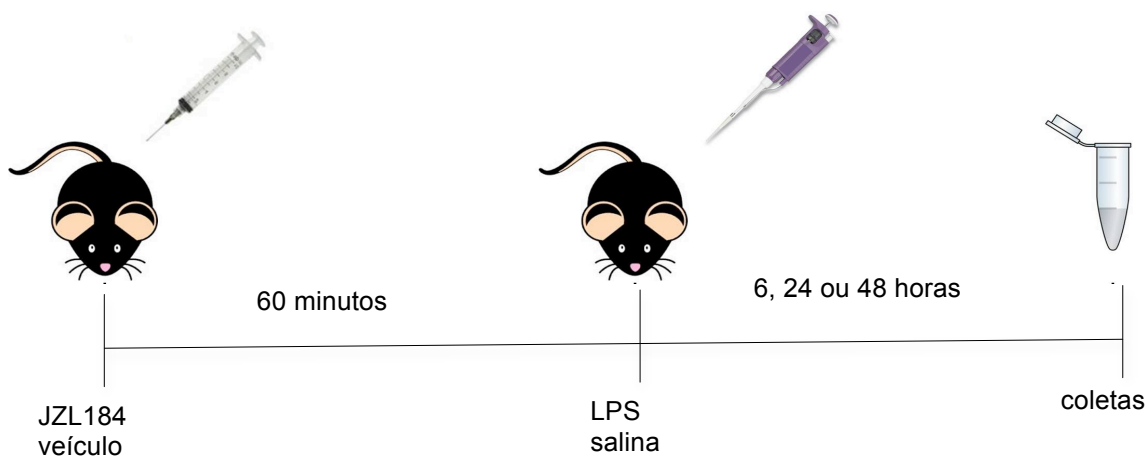
Legenda: (A) o número de células totais do LBA de animais tratados com salina, veículo ou JZL184 16mg/kg e inflamados com LPS. Em (B), (C) e (D) ilustrou-se o número de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, respectivamente, colhidos no LBA destes animais. *p<0,001 em relação ao grupo controle salina+LPS. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey-Kramer

Fonte: (PAVANI, 2014)

5.2 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO BLOQUEIO DA MAGL SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS NO PULMÃO, NO LBA, NO SANGUE E NA MEDULA ÓSSEA EM UM MODELO MURINO DE ALI

Um total de 76 camundongos foi dividido aleatoriamente em 4 grupos: Grupo 1 (C1)- não inflamado veículo + salina; Grupo 2 (C2)- inflamado veículo + LPS, Grupo 3 (E1)- tratado e não inflamado JZL184 + salina e Grupo 4 (E2)- tratado e inflamado JZL184 + LPS. Os animais foram tratados pela via i.p. com JZL184 (16mg/kg) ou com idêntico volume do veículo e após 60 minutos foram submetidos a instilação nasal de LPS ou salina estéril, conforme ilustrado na Figura 6. Três grupos idênticos de animais foram usados e avaliados em diferentes períodos: seis, vinte e quatro ou quarenta e oito horas após a instilação intranasal de LPS, conforme ilustrado na figura 12.

Figura 12 - Delineamento experimental empregado nos experimentos 1, 2 e 6



Fonte: (PAVANI, 2014)

Os animais foram anestesiados e eutanasiados para a coleta de sangue, do LBA e da medula óssea. A contagem total e diferencial dos leucócitos do sangue e do LBA, a quantificação dos granulócitos da medula óssea e a coleta e avaliação dos danos teciduais do pulmão foram realizadas conforme descrito nos itens 4.5.1, 4.5.2, 4.5.3, 4.5.4 e 4.6, respectivamente.

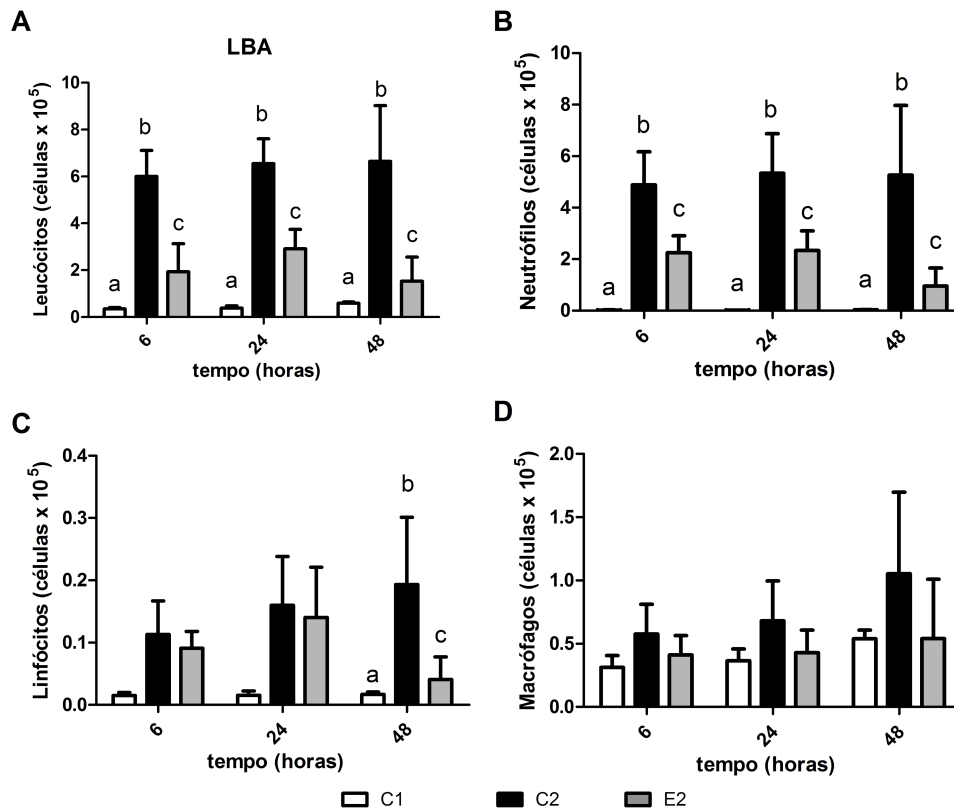
RESULTADOS:

LBA

Avaliou-se primeiro, os efeitos da inibição da MAGL (JZL184 16mg/kg) na migração dos leucócitos para os pulmões 6, 24 e 48 horas após administração intranasal de LPS. Notavelmente, a administração intranasal de LPS foi eficaz na indução da inflamação pulmonar, como observado por meio do número de leucócitos presentes no LBA 6 ($F(2,17) = 48.16$; $p < 0.0001$), 24 ($F(2,17) = 49.44$; $p < 0.0001$) e 48 ($F(2,18) = 23.19$; $p < 0.0001$) horas após a indução da ALI (Figura 13A). O tratamento com JZL186 reduziu o número de leucócitos no LBA 6, 24 e 48 horas após a administração de LPS (Figura 13A).

A contagem diferencial dos leucócitos no LBA mostrou que o tratamento com JZL184 reduziu a contagem de neutrófilos 6 ($F(2,17) = 46.02$; $p < 0.0001$), 24 ($F(2,17) = 37.04$; $p < 0.0001$) e 48 ($F(2,18) = 14.70$; $p < 0.0001$) horas após a instilação intranasal de LPS (Figura 13B), assim como a contagem de linfócitos 48 horas ($F(2,18) = 9.926$; $p < 0.001$) após a indução da inflamação (Figura 13C). Não foram encontradas diferenças no número de macrófagos no LBA em todos os períodos avaliados (Figura 13D).

Figura 13 - Efeitos da inibição da MAGL na migração de leucócitos para os pulmões



Legenda: (A) contagem de leucócitos totais no LBA, (B) contagem de neutrófilos no LBA, (C) contagem de linfócitos no LBA e (D) contagem de macrófagos no LBA. Os dados são apresentados como média \pm D.P., n = 5-9 animais / grupo. $p < 0,05$. Anova de uma via seguida do teste Tukey-Kramer

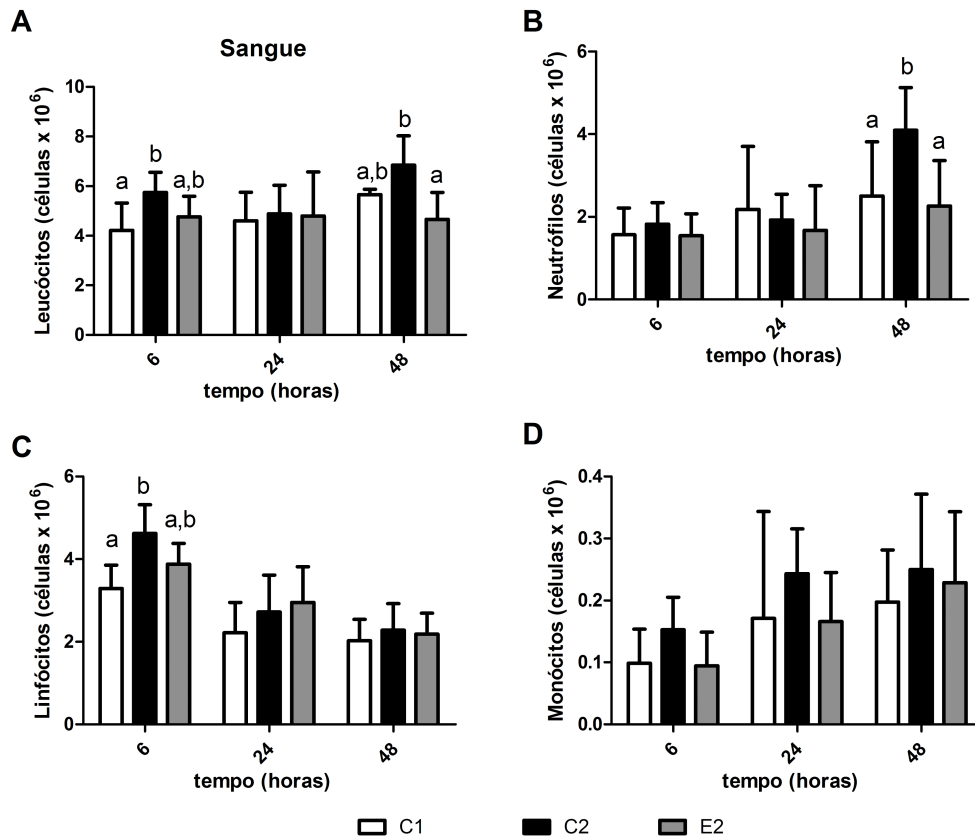
Fonte: (COSTOLA-DE-SOUZA et al., 2013 modificado)

Sangue

Os efeitos da inibição da MAGL, através da administração i.p. de 16mg/kg de JZL184, no sangue também foram analisados 6, 24 e 48 horas após a indução da ALI. Um aumento no número de leucócitos ($F(2,17) = 4.294$; $p < 0.05$) (Figura 14A), especialmente de linfócitos ($F(2,17) = 6.923$; $p < 0.001$) (Figura 14C), foi evidente no sangue nos animais do grupo C2, 6 horas após a instilação intranasal de LPS; neste momento, o aumento não foi evitado com o uso do JZL184 (Figuras 14A,C). Entretanto, em relação aos dados do grupo C2, o tratamento com JZL184 reduziu a contagem no número de leucócitos ($F(2,18) = 8.544$; $p < 0.001$) (Figura 14A) e de neutrófilos ($F(2,18) = 6.514$; $p < 0.001$) (Figura 14B) sanguíneos 48 horas após a indução da ALI.

Não foram encontradas diferenças na contagem de monócitos no sangue em todos os períodos avaliados (Figura 14D), assim como na contagem de leucócitos totais e diferenciais no sangue 24 horas após a indução da ALI (Figuras 14A-D).

Figura 14 - Efeitos da inibição da MAGL na migração de leucócitos para o sangue



Legenda: (A) contagem de leucócitos totais no sangue, (B) contagem de neutrófilos no sangue, (C) contagem de linfócitos no sangue e (D) contagem de monócitos no sangue. Os dados são apresentados como média \pm D.P., n = 5-9 animais / grupo. p < 0,05. Anova de uma via seguida do teste Tukey-Kramer

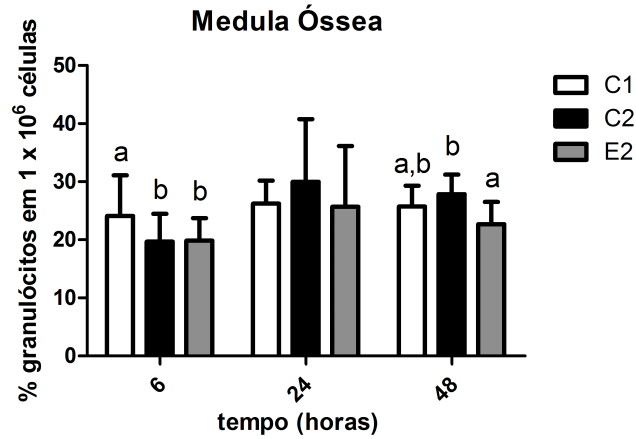
Fonte: (COSTOLA-DE-SOUZA et al. 2013 modificado)

Medula Óssea

Os animais do grupo C2 apresentaram uma redução da expressão de granulócitos na medula óssea 6 horas após a indução da ALI ($F(2,17) = 6.212$; $p < 0.05$) (Figura 15); estes achados não foram revertidos com o tratamento com JZL184, como observado nos animais do grupo E2 ($F(2,17) = 6.212$; $p < 0.05$) (Figura 15). Quarenta e oito horas após a administração intranasal de LPS, a expressão de granulócitos na medula óssea dos camundongos do grupo E2 foi menor que a expressão mensurada nos animais do grupo C2 ($F(2,17) = 3.553$; $p <$

0.05) (Figura 15). Não foram encontradas diferenças nos granulócitos da medula óssea 24 horas após a administração intranasal de LPS (Figura 15).

Figura 15 - Efeitos da inibição da MAGL na porcentagem de granulócitos na medula óssea



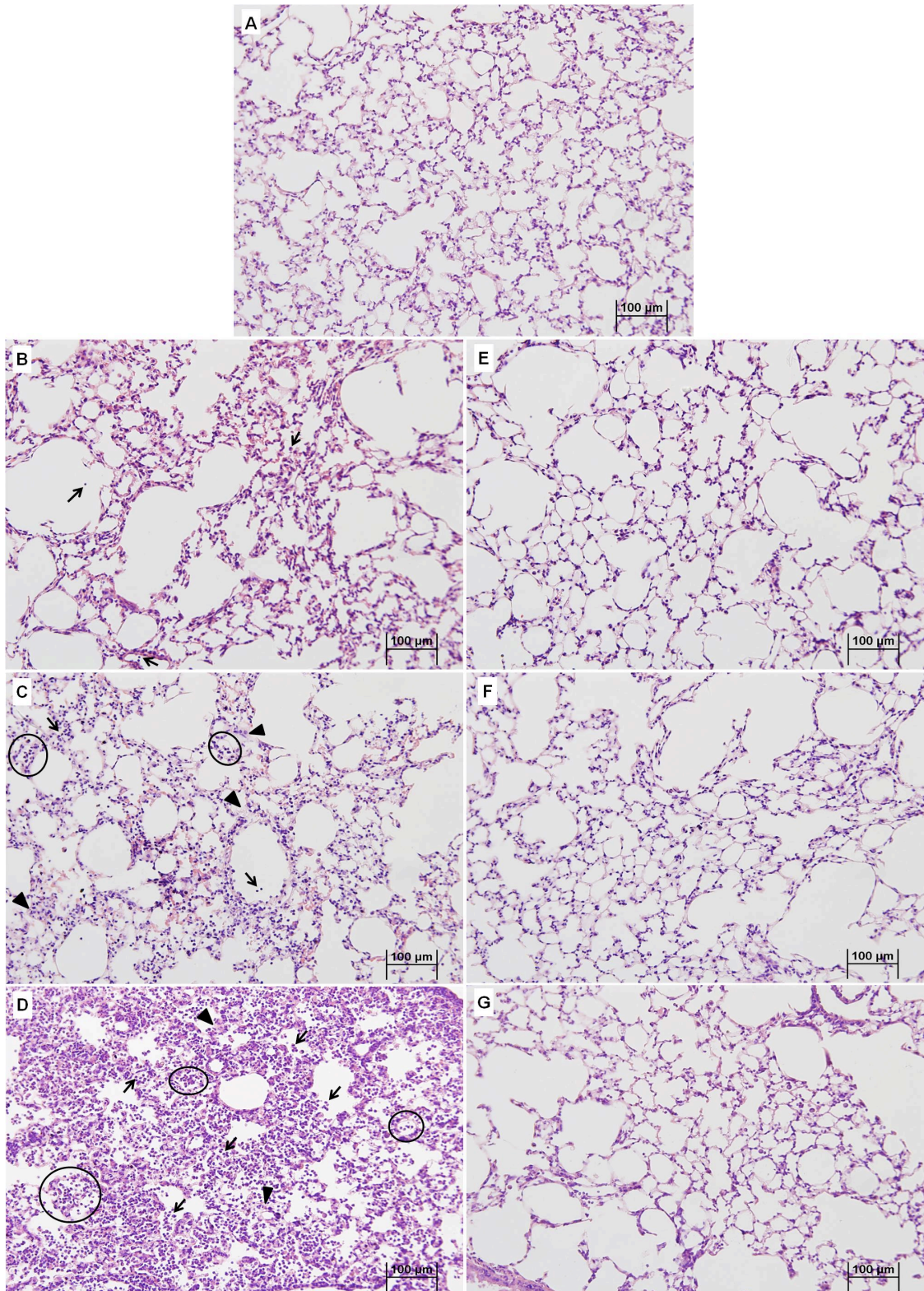
Os dados são apresentados como média \pm D.P., n = 5-9 animais / grupo. p < 0,05. Anova de uma via seguida do teste Tukey-Kramer (COSTOLA-DE-SOUZA et al. 2013 modificado)

Fonte:

Pulmão

A instilação intranasal com LPS produziu hemorragia, congestão alveolar, aumento da espessura da parede dos alvéolos e infiltração ou agregação de células inflamatórias (Figura 16B-D), em comparação com o grupo controle não inflamado C1 (Figura 16A). Já o tratamento com o JZL184 (grupo E2) foi capaz de reduzir o dano tecidual causado pelo LPS em todos os períodos avaliados (Figura 16E-G).

Figura 16 - Efeitos da inibição da MAGL na arquitetura pulmonar no dano tecidual causado pelo LPS

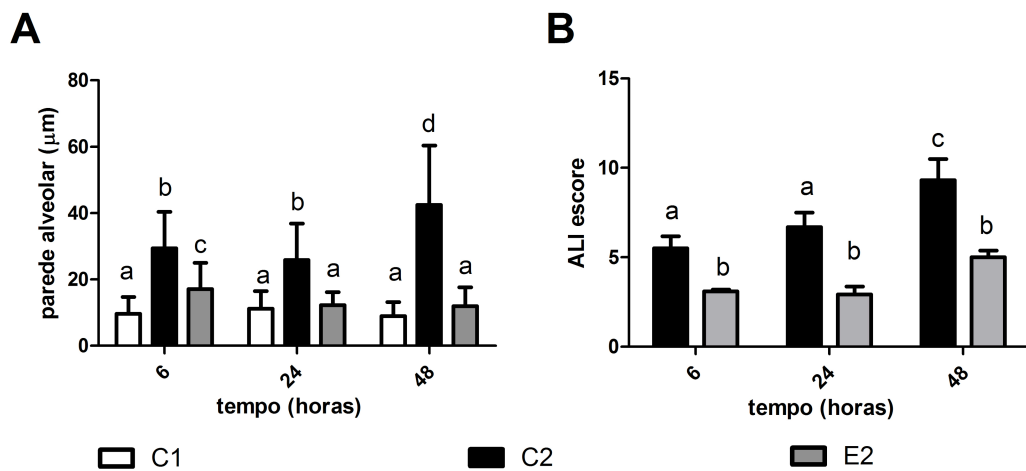


Legenda: (A) grupo C1, (B) grupo C2 6 horas, (C) grupo C2 24 horas, (D) grupo C2 48 horas após LPS, (E) grupo E2 6 horas, (F) grupo E2 24 horas e (G) grupo E2 48 horas após LPS. Infiltração e adregação de células inflamatórias (seta); aumento na espessar da parede alveolar (cabeça de seta) e congestão alveolar (círculo). Cortes do pulmão esquerdo coradas com H.E. Imagens representativas retiradas de cada grupo (aumento 200x)

Fonte: (COSTOLA-DE-SOUZA et al. 2013 modificado)

Os achados histológicos foram confirmados com a avaliação quantitativa através dos escores da ALI: o tratamento com o JZL184 foi capaz de prevenir o espessamento das paredes alveolares $F(1,11) = 130.3$; $p < 0.0001$ 6 horas; $F(1,10) = 105.7$; $p < 0.0001$ 24 horas and $F(1,10) = 220.7$; $p < 0.0001$ 48 horas após instilação intranasal de LPS) (Figura 17A) e preveniu ainda um aumento excessivo do dano tecidual (U =8.0; $p < 0.001$ 6 horas; U=8.0; $p < 0.001$ 24horas e U= 5.0; $p < 0.05$ 48 horas após LPS) (Figura 17B).

Figura 17 - Efeitos da inibição da MAGL no dano tecidual causado pelo LPS



Legenda: (A) espessura da parede alveolar e (B) escore da ALI. Dados representados como média \pm D.P., $n = 5-6$ animais / grupo. $p < 0,05$. (A) Anova de uma via seguida do teste Tukey-Kramer; (B) teste Mann Whitney U para comparação entre dois grupos

Fonte: (COSTOLA-DE-SOUZA et al., 2013 modificado)

5.3 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO JZL184 SOBRE A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO, A PERMEABILIDADE VASCULAR, ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS E A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS/ QUIMIOCINAS MEDIDA EM UM MODELO MURINO DE ALI

Um total de 76 camundongos foi dividido aleatoriamente em 4 grupos e tratados ou não com JZL184 e LPS intranasal conforme descrito no experimento 1 (Figura 12).

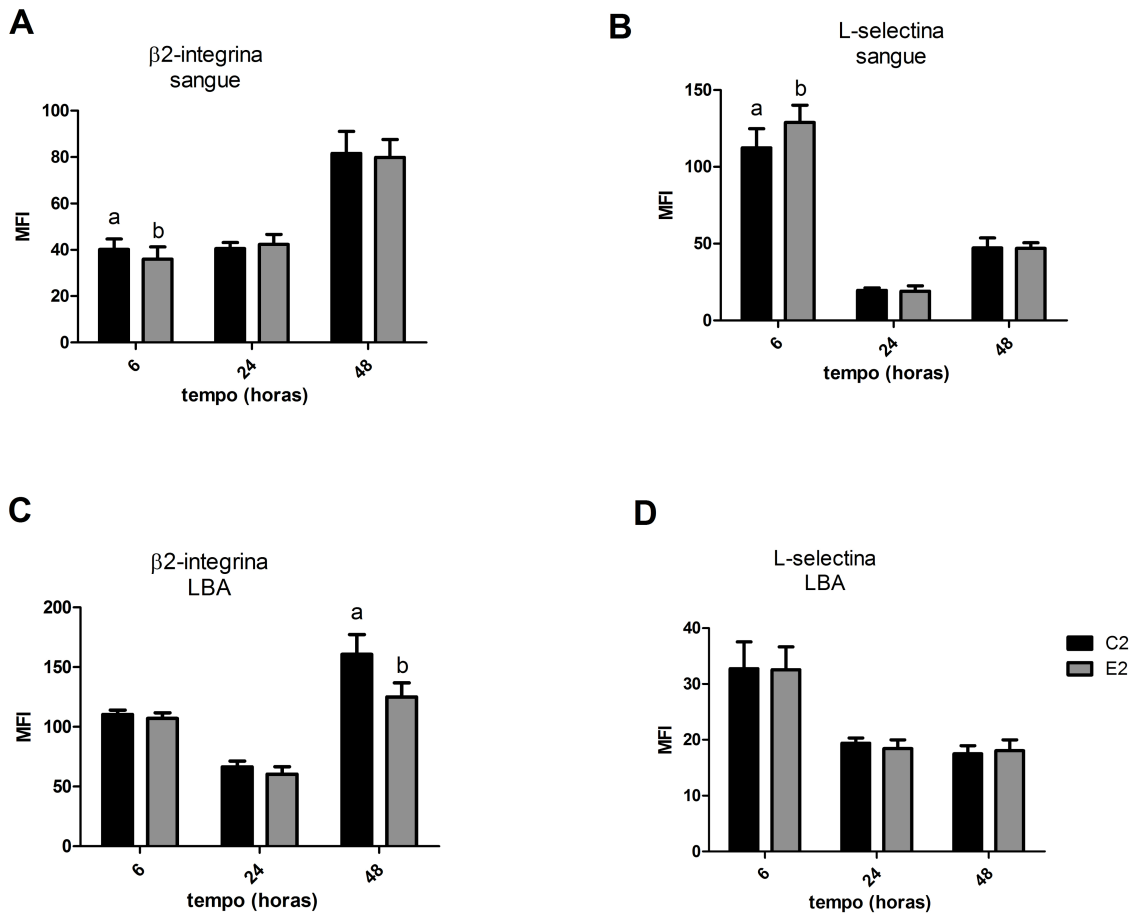
Os animais foram anestesiados e eutanasiados para a coleta do LBA. A avaliação da concentração de citocinas, MPO, expressão das moléculas de adesão e a permeabilidade vascular foram realizadas conforme descrito nos itens 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10 respectivamente.

RESULTADOS:

Moléculas de adesão

Avaliou-se a expressão das moléculas de adesão (L-selectina, β 2-integrina e PECAM) nos neutrófilos sanguíneos e do LBA dos camundongos tratados ou não com JZL184. Em relação aos animais do grupo C2, o tratamento com o JZL184 reduziu a expressão da β 2-integrina ($U = 8.0$; $p < 0.05$) (Figura 18A); entretanto, no mesmo período, este tratamento aumentou a expressão da L-selectina ($U = 9.0$; $p < 0.05$) (Figura 18B) nos neutrófilos sanguíneos 6 horas após a indução da ALI. Não foram encontradas diferenças para a expressão de PECAM nos neutrófilos sanguíneos em todos os períodos avaliados (Tabela 5) ou β 2-integrina e L-selectina 24 e 48 horas após a indução da ALI (Figura 18A-B). Ademais, também foi observado que a inibição da MAGL através do JZL184 reduziu a expressão da β 2-integrina ($U = 7.0$; $p < 0.001$) nos neutrófilos do LBA 48 horas após a instilação intranasal de LPS (Figura 18C). Entretanto, não foram encontradas diferenças significantes para a expressão da L-selectina (Figura 18D) e PECAM nos neutrófilos do LBA em todos os períodos avaliados (Tabela 4).

Figura 18 - Efeitos da inibição da MAGL na expressão de moléculas de adesão no modelo de ALI induzida por LPS



Legenda: (A) β 2-integrina e (B) de L-selectina no sangue 6 horas após a indução da ALI. (C) β 2-integrina no fluido de lavagem bronco-alveolar 48 horas após a indução da ALI. Os dados são apresentados como média \pm D.P., n = 5-9 animais / grupo. p <0,05. Mann Whitney U para comparação de dois grupos

Fonte: (COSTOLA-DE-SOUZA et al., 2013 modificado)

Tabela 4 - Efeitos da inibição da MAGL na expressão de PECAM no LBA e sangue de camundongos 6, 24 e/ou 48 horas após ALI induzida por LPS

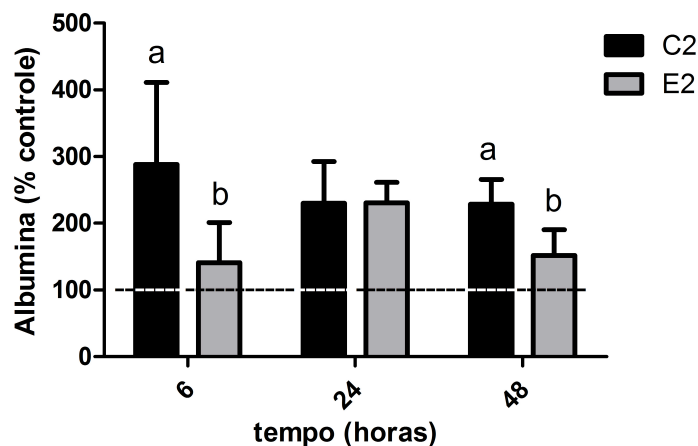
Material analisado	Tempo após instilação intranasal de LPS	Veículo + LPS	JZL184 + LPS
LBA	6 horas	56.04 \pm 10.73	58.31 \pm 3.50
	24 horas	44.03 \pm 5.79	41.98 \pm 6.08
	48 horas	23.12 \pm 6.38	20.56 \pm 2.04
Sangue	6 horas	47.39 \pm 8.79	51.1 \pm 14.33
	24 horas	77.65 \pm 11.74	82.27 \pm 9.12
	48 horas	118.4 \pm 27.81	131.3 \pm 52.53

Os dados são apresentados como média \pm D.P., n=5-9 animais/grupo. Mann Whitney U para comparação entre dois grupos

Permeabilidade vascular

A permeabilidade vascular nos pulmões foi avaliada através da concentração de albumina no LBA. O JZL184 reduziu a concentração de proteína no LBA em relação aos animais do grupo C2 6 (U = 3.0; p < 0.05) e 48 (U = 4.0; p < 0.001) horas após a instilação intranasal de LPS (Figura 19).

Figura 19 - Efeitos da inibição da MAGL sobre a concentração de albumina no LBA



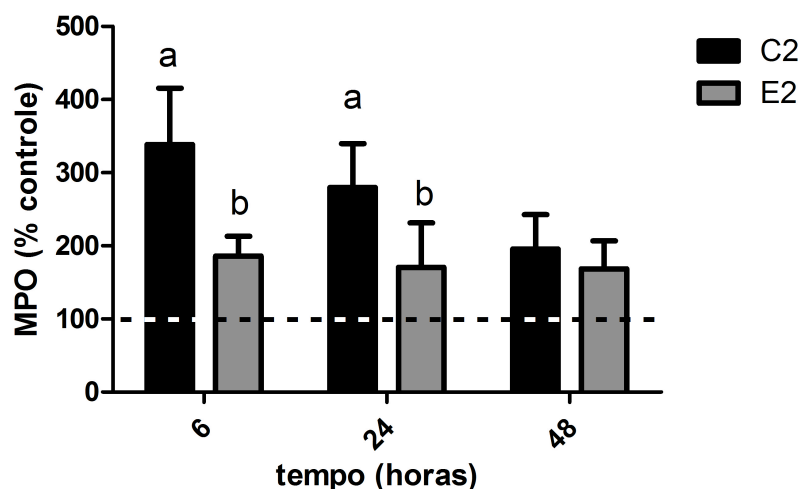
Os dados são apresentados como média \pm D.P., n = 5-8 animais / grupo. p < 0,05. Mann Whitney U para comparação de dois grupos (COSTOLA-DE-SOUZA et al., 2013)

Fonte: (COSTOLA-DE-SOUZA et al., 2013 modificado)

Atividade de neutrófilos

A atividade de neutrófilos foi avaliada de forma indireta através da atividade da MPO. O JZL184 reduziu a atividade de MPO nos pulmões em relação aos animais do grupo C2 às 6 (U = 2.0; p < 0.0001) e 24 (U = 10.0; p < 0.001) horas após a instilação intranasal de LPS (Figura 20).

Figura 20 - Efeitos da inibição da MAGL sobre a atividade de MPO no pulmão em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzido por LPS



Os dados são apresentados como média \pm D.P., n = 7-13 animais / grupo. p < 0,05. Mann Whitney U para comparação de dois grupos. Dados normalizados do controle não inflamado

Fonte: (COSTOLA-DE-SOUZA et al., 2013 modificado)

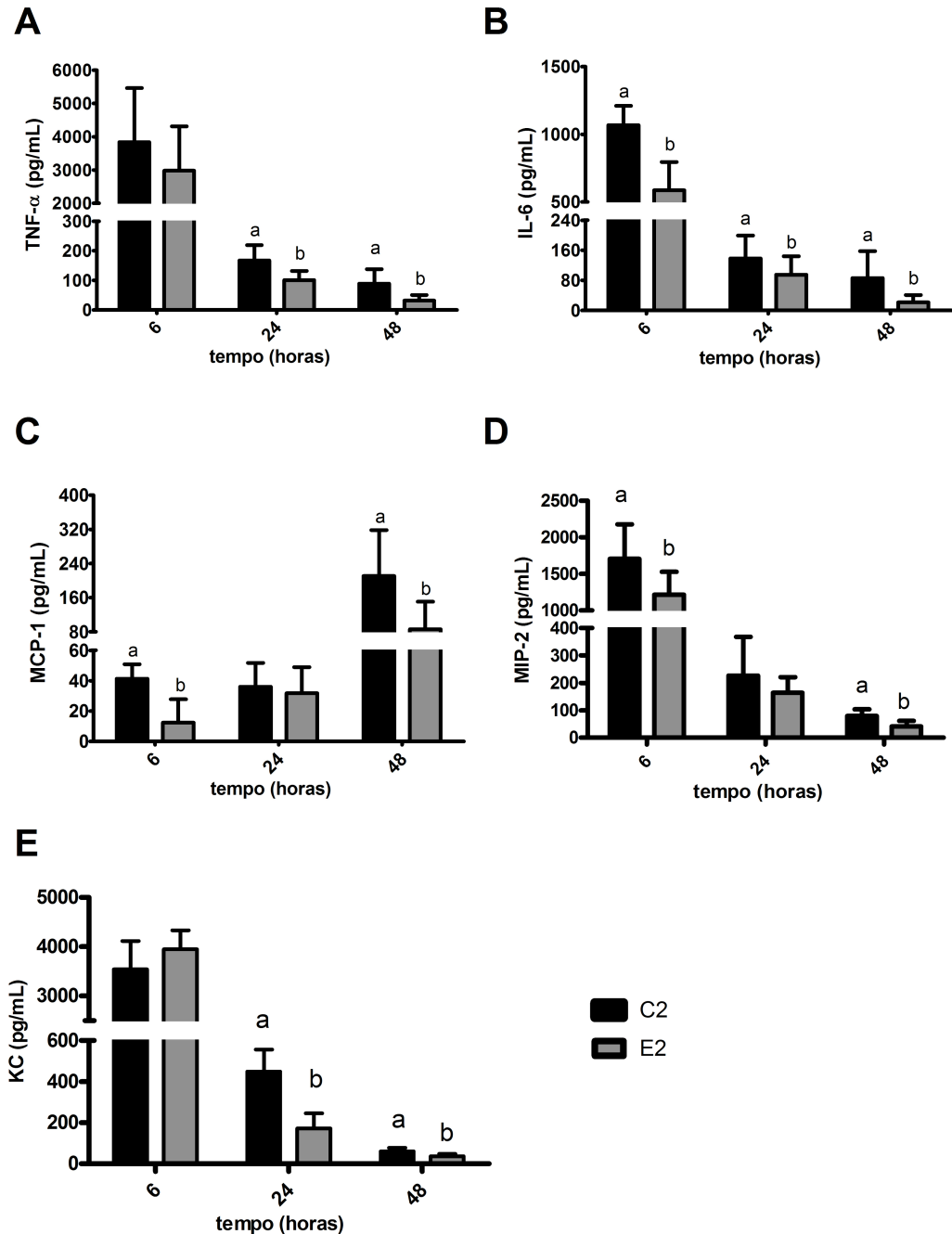
Citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias

Em relação aos animais do grupo C1, observamos um grande aumento na concentração de TNF- α , IL-6, MIP-2 e KC no LBA nos animais do grupo C2 6 horas após a indução da inflamação (Figura 21A-B, D-E). Com o passar das horas, no entanto, observamos uma redução na concentração dessas citocinas (Figura 21A-B, D-E). Observamos ao mesmo tempo um aumento gradual na concentração de MCP-1 no LBA dos animais do grupo C2 nos períodos avaliados (Figura 21C). O tratamento com JZL184 reduziu a concentração de TNF- α 24 (U = 3.0; p < 0.05) e 48 (U = 4.0; p < 0.001) horas após a instilação intranasal de LPS (Figura 21A), assim como a concentração de IL-6 6 (U = 2.0; p < 0.05), 24 (U = 6.0; p < 0.05) e 48 (U = 9.0; p < 0.05) horas após a indução da ALI (Figura 21B). O tratamento com JZL184 (grupo E2) reduziu, ainda, a concentração de MCP-1 6 (U = 4.0; p < 0.001) e 48 (U = 7.0; p < 0.05) horas após a indução da ALI (Figura 21C).

O tratamento com JZL184 reduziu a concentração de KC, em comparação ao grupo C2, às 24 (U = 4.0; p < 0.001) e 48 (U = 4.0; p < 0.05) horas após a instilação intranasal de LPS (Figura 21E) e a concentração de MIP-2 às 6 (U = 4.0; p < 0.05) e 48 (U = 6.0; p < 0.05) horas após a indução da ALI (Figura 21D). Não foram

encontradas diferenças estatísticas para a concentração de IL-10, IFN- γ and IL-12p70 no LBA dos grupos nos períodos avaliados (Tabela 5).

Figura 21 - Efeitos da inibição da MAGL sobre a concentração de citocinas / quimiocinas no LBA



Legenda: Concentrações de (A) TNF- α , (B) IL-6, (C) MCP-1, (D) MIP-2 e (E) KC. Os dados são apresentados como média \pm D.P., n = 5-8 animais / grupo. p < 0,05. Mann Whitney U para comparação de dois grupos

Fonte: (COSTOLA-DE-SOUZA et al, 2013 modificado)

Tabela 5 - Efeitos da inibição da MAGL sobre a concentração de citocinas e quimiocina no LBA 6, 24 e/ou 48 horas após ALI induzida por LPS

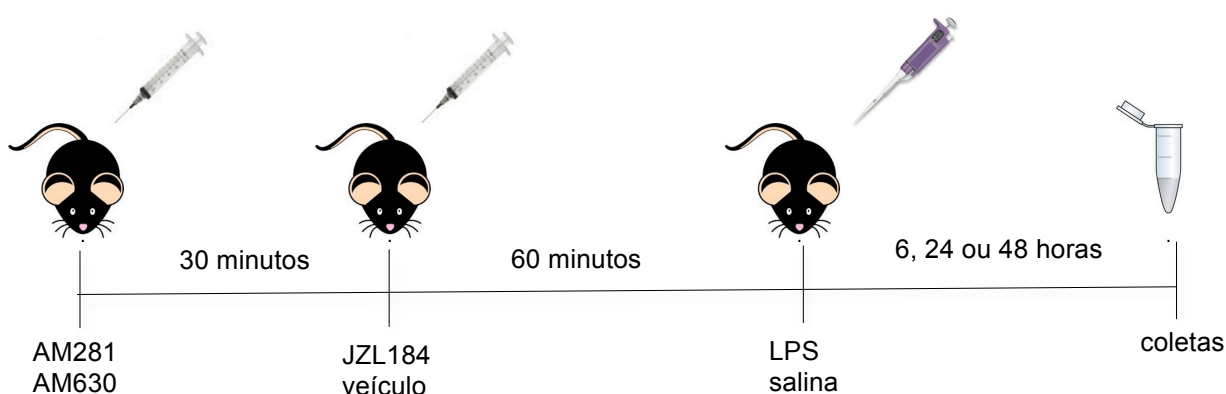
Citocinas / Quimiocinas	Tempo após instilação intranasal de LPS	Veículo + LPS (pg/mL)	JZL184 + LPS (pg/mL)
TNF- α	6 horas	3836 \pm 1631	2984 \pm 1329
IL-10	6 horas	1.492 \pm 3.654	2.690 \pm 4.624
IFN- γ	6 horas	1.150 \pm 0.6314	0.3386 \pm 0.5786
IL-12p70	6 horas	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
MCP-1	24 horas	35.91 \pm 15.82	37.01 \pm 10.95
IL-10	24 horas	7.667 \pm 5.777	8.683 \pm 4.226
IFN- γ	24 horas	0.3143 \pm 0.5383	0.6200 \pm 0.5803
IL-12p70	24 horas	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
IL-10	48 horas	4.337 \pm 5.504	6.349 \pm 5.340
IFN- γ	48 horas	1.984 \pm 2.133	1.135 \pm 0.7783
IL-12p70	48 horas	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

Os dados são apresentados como média \pm D.P., n=5-8 animais/grupo. Mann Whitney U para comparação entre dois grupos

5.4 EXPERIMENTO 3: A PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES CB1 E CB2 NOS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DO TRATAMENTO COM JZL184

Dada a observação de efeitos anti-inflamatórios com o uso do JZL184 (diferenças entre os animais do grupo E2 em relação ao grupo C2) realizamos um experimento empregando antagonistas de receptores canabinóides CB1 (AM281) e CB2 (AM630). Especificamente, foram utilizados um total de 96 camundongos. Primeiramente, os animais foram tratados (i.p.) com os antagonistas AM281 ou AM630 ou volume similar do seu veículo (0.1 mL/10 g). Após 30 minutos, os animais receberam o fármaco JZL184 (16mg/kg) ou volume similar de seu veículo (0.1 mL/10 g) e, finalmente, após 60 minutos, foi instilado LPS ou salina estéril via intranasal. Assim, os animais foram divididos em seis grupos experimentais: veículo+salina (C1); veículo+LPS (C2); JZL184+LPS (E2); AM281 (2.5 mg/kg)+JZL184+LPS; AM630 (2.5 mg/kg) +JZL184+LPS e AM630 (5.0 mg/kg)+JZL184+LPS. As amostras foram coletadas e analisadas 6, 24 e 48 horas após a administração intranasal de LPS (Figura 22).

Figura 22 - Delineamento experimental empregado no experimento 3



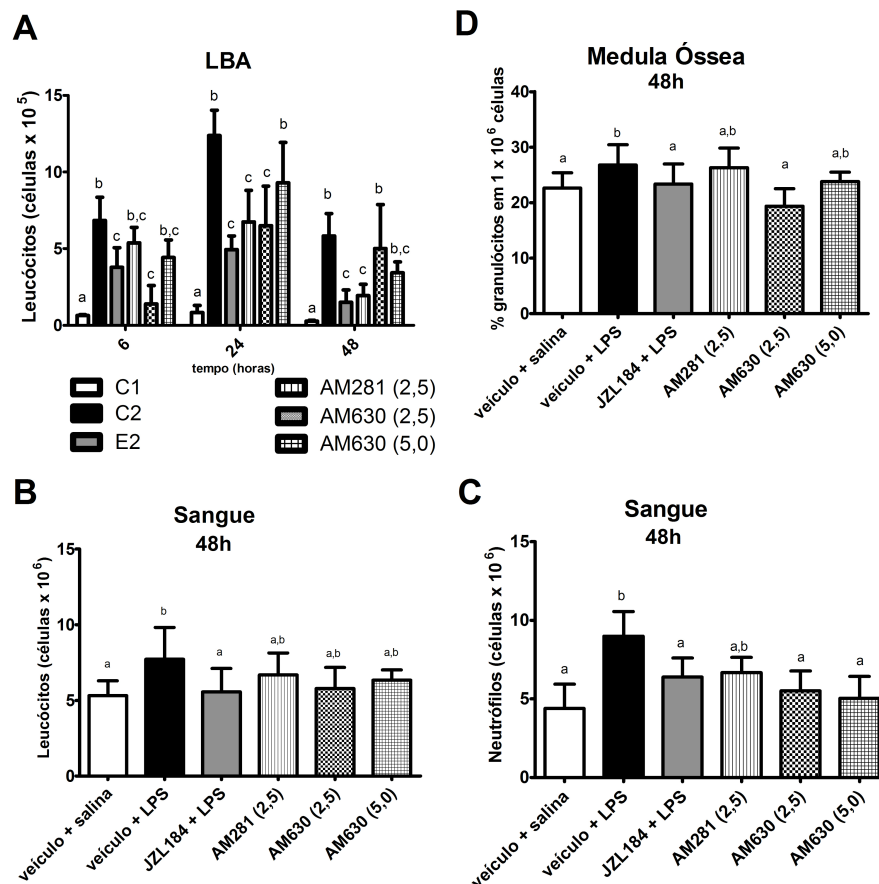
Fonte: (PAVANI, 2014)

A contagem total e diferencial dos leucócitos do sangue e do LBA, a quantificação dos granulócitos da medula óssea e a coleta e avaliação dos danos teciduais do pulmão foram realizadas conforme descrito nos itens 4.5.1, 4.5.2 e

4.5.3, respectivamente. A avaliação da concentração de citocinas, MPO, expressão das moléculas de adesão e a permeabilidade vascular foram realizadas conforme descrito nos itens 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10 respectivamente.

Os dados mostraram que o tratamento com AM281 e AM630 bloquearam parcialmente as ações do JZL184 na migração leucocitária para os pulmões 6 horas após a instilação intranasal de LPS ($F(5,28) = 13.53$) (Figura 23A). Observamos que os tratamentos com AM281 e AM230 revertem parcialmente as ações do JZL184 na contagem leucócitos sanguíneos ($F(5,25) = 3.61$) (Figura 23B) e a porcentagem de granulócitos na medula óssea ($F(5,25) = 6.336$) (Figura 23D) 48 horas após a indução da ALI. Observamos, ainda, que as ações do JZL184 na contagem de neutrófilos sanguíneos foram parcialmente revertidas pelo tratamento com AM281 ($F(5,25) = 7.498$) (Figura 23C).

Figura 23 - Participação dos receptores CB1 e CB2 na migração de leucócitos para os pulmões

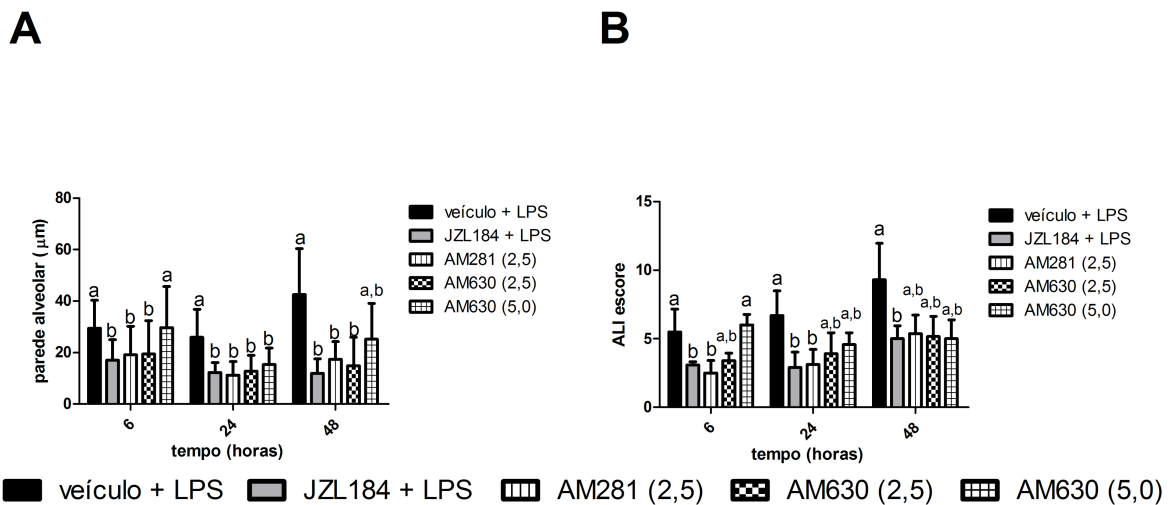


Legenda: (A) Número de leucócitos no LBA, (B) Número de leucócitos no sangue, (C) número de neutrófilos no sangue, e (D), a porcentagem de granulócitos na medula óssea. Os dados são apresentados como média \pm D.P., $n = 5-8$ animais / grupo. $p < 0,05$. Anova de uma via seguida pelo teste de Tukey-Kramer

Fonte: (COSTOLA-DE-SOUZA et al., 2013 modificado)

Os efeitos do bloqueio da MAGL na prevenção do aumento da espessura da parede alveolar e dos danos teciduais foram revertidos pelo uso do antagonista de receptores CB2, o AM630 (5mg/kg), 6 horas após a instilação intranasal de LPS ($F(5,29) = 61.23$; $p < 0.0001$ e $KW = 21.44$; $p < 0.05$, respectivamente) (Figura 24 A-B).

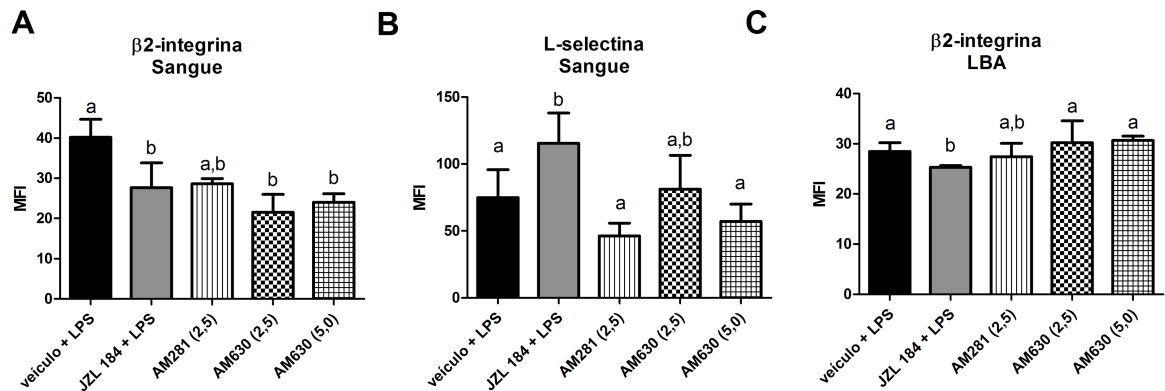
Figura 24 - Participação dos receptores CB1 e CB2 na prevenção do dano tecidual induzido pelo LPS



Legenda: (A) Espessura da parede alveolar e (B) ALI score. Dados representados como média \pm D.P., $n = 5-6$ animais / grupo. $p < 0,05$. (A) Anova de uma via seguida do teste Tukey-Kramer; (B) teste Kruskal-Wallis e teste de Dunn para múltiplas comparações
 Fonte: (COSTOLA-DE-SOUZA et al., 2013 modificado)

Uma análise mais aprofundada da expressão das moléculas de adesão mostrou que as ações do JZL184 foram parcialmente ou totalmente bloqueadas pelos tratamentos com AM281 ou AM630. Assim, o AM281 reduziu a inibição da $\beta 2$ -integrina sanguínea 6 horas após ALI com tratamento com o JZL184 ($KW = 20.30$) (Figura 25A). Além disso, AM281 e AM630 impediram o grande aumento da expressão da L-selectina ($KW = 24.65$) (Figura 25B) no sangue 6 horas após ALI. A redução da expressão da $\beta 2$ -integrina no LBA provocada pelo tratamento com JZL184 foi parcialmente bloqueada com o tratamento com AM281 ($KW = 20.39$) e totalmente bloqueada com o tratamento com AM630 ($KW = 20.39$; $p < 0.0001$ para a dose de 5.0 mg/kg e $KW = 20.39$; $p < 0.05$ para a dose de 2.5 mg/kg) (Figura 25C).

Figura 25 - Participação dos receptores CB1 e CB2 na expressão de moléculas de adesão no modelo murino de ALI induzida por LPS

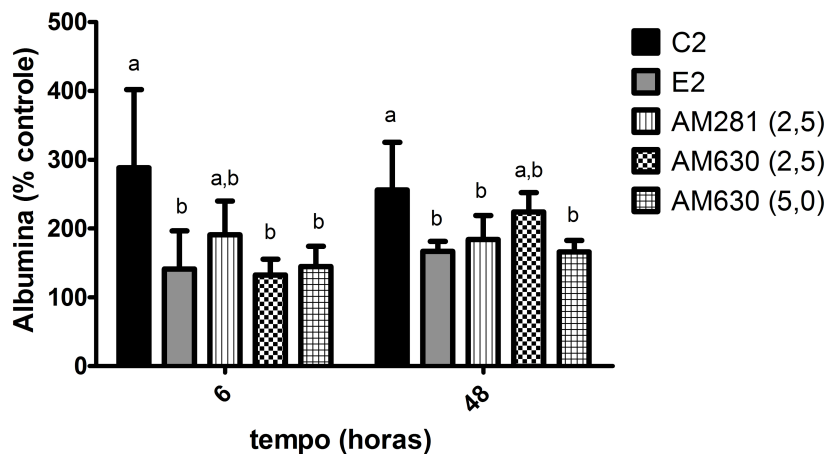


Legenda: (A) β 2-integrina no sangue 6 horas após a ALI, (B) de L-selectina no sangue 6 horas após a ALI e (C) β 2-integrina no LBA 48 horas após a ALI. Os dados são apresentados como média \pm D.P., n = 5-8 animais / grupo. p < 0,05. Kruskal-Wallis e teste de Dunn para múltiplas comparações

Fonte: (COSTOLA-DE-SOUZA et al., 2013 modificado)

Como ilustrado na figura 26, os tratamentos com AM281 (KW = 21.04) e AM630 (KW = 13.84) reduziram as ações do JZL184 sobre a permeabilidade vascular dos pulmões 6 e 48 horas após ALI, respectivamente.

Figura 26 - Participação dos receptores CB1 e CB2 na concentração de albumina do LBA

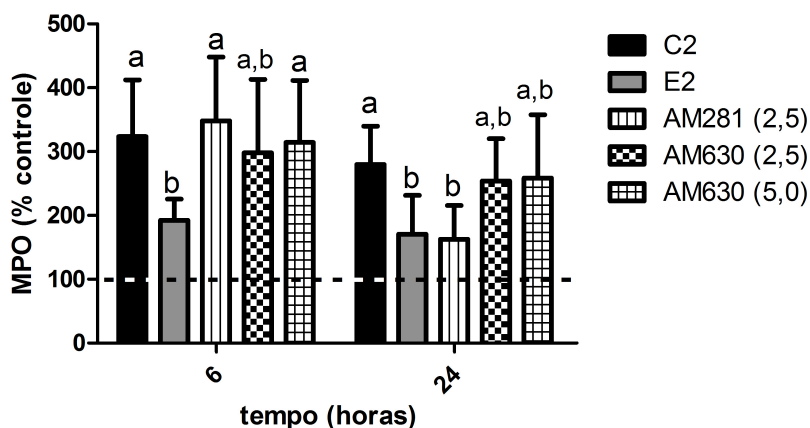


Legenda: Os dados são apresentados como média \pm D.P., n = 5-8 animais / grupo. p < 0,05. Kruskal-Wallis e teste de Dunn para múltiplas comparações

Fonte: (COSTOLA-DE-SOUZA et al., 2013 modificado)

O tratamento com AM281 (KW = 20.3, p < 0.001) e com o AM630 (KW = 20.3, p < 0.05) inibiram as ações do JZL184 na atividade da MPO dos pulmões 6 horas após ALI (Figura 27).

Figura 27 - Participação dos receptores CB1 e CB2 na atividade de MPO do pulmão



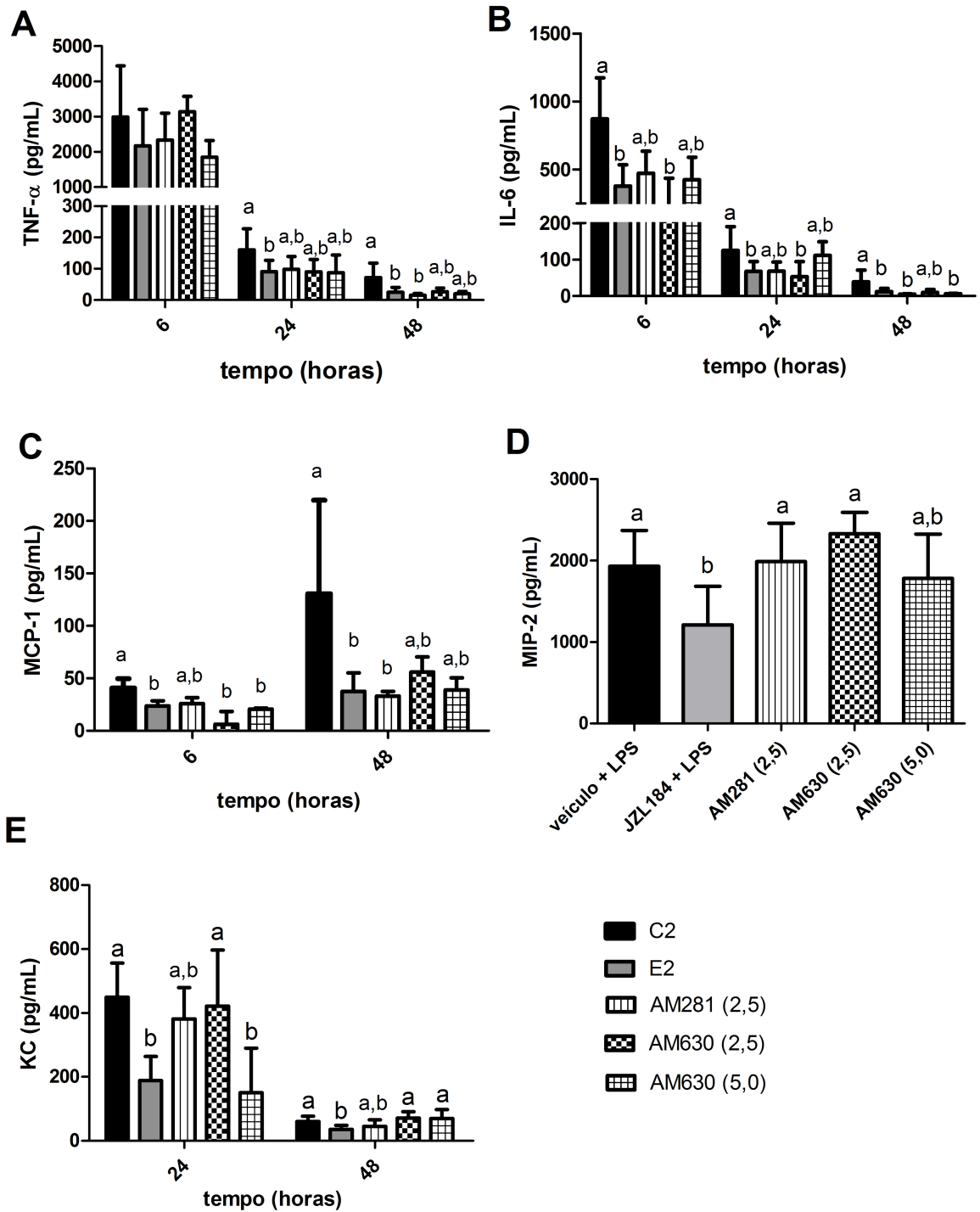
Os dados são apresentados como média \pm D.P., n = 5-10 animais / grupo. p <0,05. Kruskal-Wallis e teste de Dunn para múltiplas comparações. Dados normalizados do controle não inflamado

Fonte:

(PAVANI, 2014)

Finalmente, observamos que o tratamento com AM281 e/ou AM630 reduziram as ações do JZL184 na concentração de citocinas/quimiocina no LBA 6, 24 ou 48 horas após a instilação intranasal de LPS: TNF- α (KW = 13.33, 24 horas e KW = 21.05, 48 horas após ALI) (Figura 28A), IL-6 (KW = 13.27, 6 horas, KW = 19.80, 24 horas e KW = 22.02, 48 horas após ALI) (Figura 28B) e MCP-1 (KW = 20.43, 6 horas e KW = 19.10, 48 horas após ALI) (Figura 28C). Observamos, ainda, que os tratamentos com AM281 e/ou AM630 reduziram e/ou inibiram as ações do JZL184 nas concentrações de citocinas avaliadas no LBA 6, 24 ou 48 horas após a instilação intranasal de LPS: MIP-2 (KW = 23.49) 6 horas após ALI (Figura 28D) e KC (KW = 20.46, 24 horas e KW = 11.21 48 horas após ALI) (Figura 28E).

Figura 28 - Participação dos receptores CB1 e CB2 nas concentrações de citocinas / quimiocinas do LBA



Legenda: Concentração de (A) TNF- α , (B) IL-6, (C) MCP-1, (D) MIP-2 e (E) KC. Os dados são apresentados como média \pm D.P., n = 5-8 animais / grupo. * e ** p < 0,05. Kruskal-Wallis e teste de Dunn para múltiplas comparações

Fonte: (COSTOLA-DE-SOUZA et al., 2013 modificado)

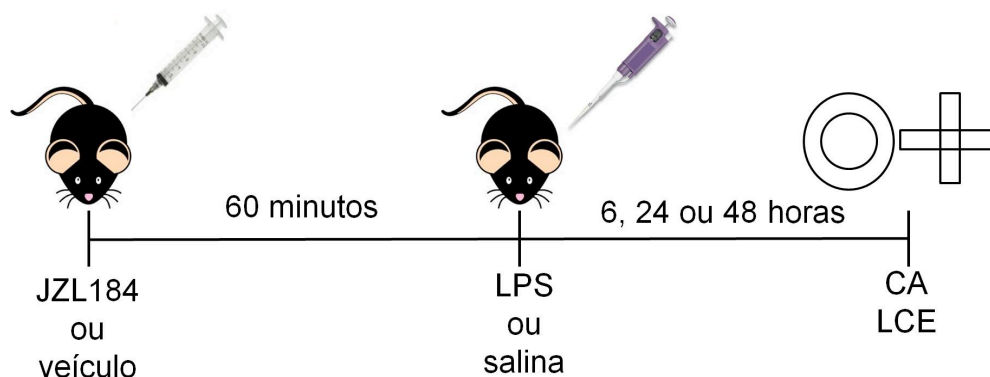
5.5 EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM CAMPO ABERTO (CA) E NÍVEIS DE ANSIEDADE NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE) EM UM MODELO MURINO DE ALI

Um total de 148 camundongos foi dividido aleatoriamente em 4 grupos: Grupo 1 (C1)- não inflamado veículo + salina; Grupo 2 (C2)- inflamado veículo + LPS, Grupo 3 (E1)- tratado e não inflamado JZL184 + salina e Grupo 4 (E2)- tratado e inflamado JZL184 + LPS. Os animais foram tratados pela via i.p. com JZL184 (16mg/kg) ou veículo e após 60 minutos foram submetidos a instilação nasal de LPS ou salina estéril.

No CA: três grupos independentes e idênticos de animais foram usados para avaliar possíveis efeitos comportamentais do LPS em diferentes períodos: 6, 24 ou 48 horas após a instilação intranasal do mesmo (Figura 29).

No LCE: outros animais foram divididos em grupos, conforme descrito acima, utilizados para análise comportamental no LCE 48 horas após a indução da ALI.

Figura 29 - Delineamento experimental empregado no experimento 4



Fonte: (PAVANI, 2014)

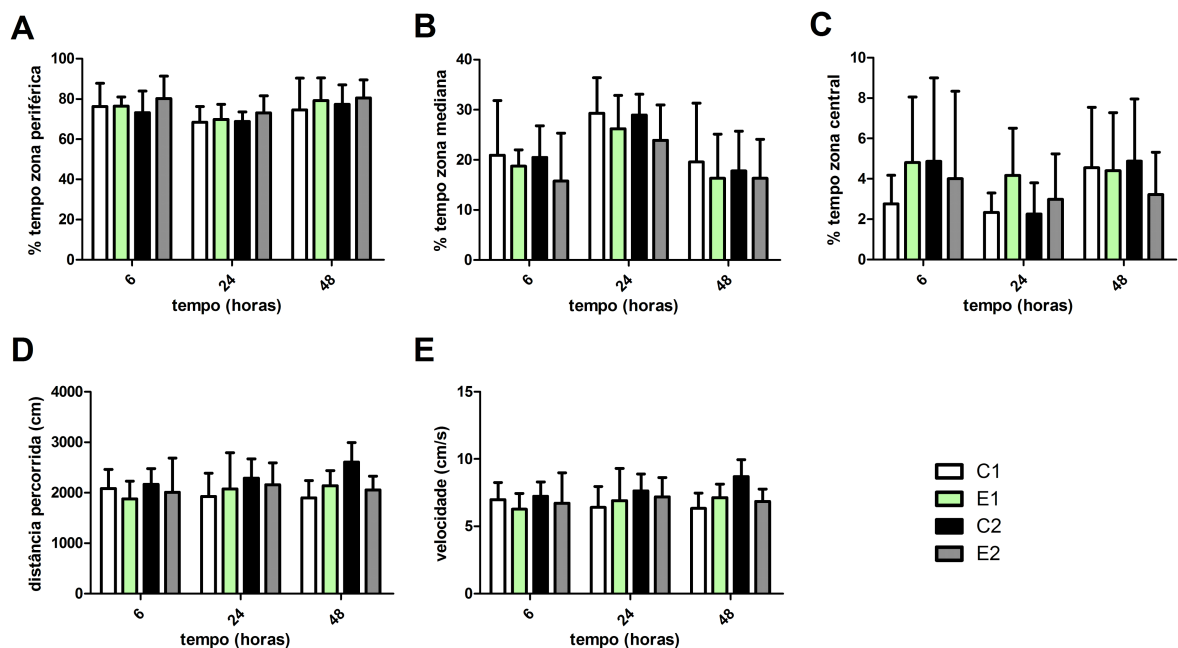
As avaliações da atividade locomotora no CA e no LCE foram realizadas conforme descrito nos itens 4.11.1 e 4.11.2, respectivamente.

A ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni, não mostrou alterações significantes entre os tratamentos e tampouco na interação tratamento X tempo, mas detectou nos animais do grupo C2 (controle inflamado) alterações entre

os tempos de observação ($F(2,122) = 15.80$; $p=0,0039$). Idênticos resultados foram obtidos na zona mediana do CA ($F(2,122)=13.60$; $p<0,0001$). No entanto, nenhuma alteração foi encontrada na zona central do aparelho. Especificamente, observou-se redução da porcentagem de tempo na zona periférica do CA às 24 horas momento em que se observou aumento deste parâmetro na zona mediana do aparelho (Figura 30A-C).

Idêntica análise estatística não evidenciou alterações entre os grupos e entre as iterações tratamento X tempo e entre os diferentes tempos para a distância percorrida pelos animais no CA e para a velocidade média no aparelho (Figura 30D-E).

Figura 30 - Avaliação da atividade locomotora (CA) de animais tratados ou não com inibidor da MAGL em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzido por LPS



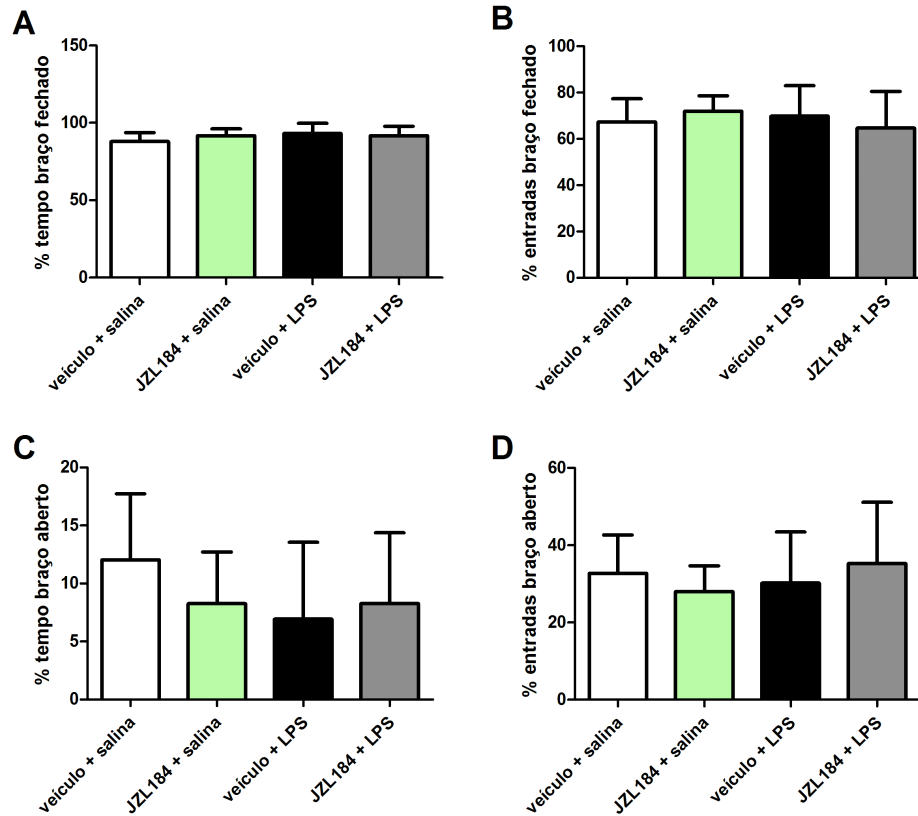
Legenda: (A) % do tempo de permanência na zona periférica, (B) % do tempo de permanência na zona mediana, (C) % do tempo de permanência na zona central, (D) distância total percorrida e (E) velocidade média. Os dados são apresentados como média \pm D.P., $n = 9-16$ animais / grupo. Diferentes letras acima das colunas significam diferenças significantes, $p<0.05$. ANOVA de 2 vias seguida pelo teste Bonferroni (PAVANI, 2014)

Fonte:

Como mostra a figura 31A-D, os animais foram submetidos ao teste de LCE (para avaliação da ansiedade) 48 horas após o tratamento ou não com JZL184 e administração ou não de LPS. Não foram encontradas diferenças entre os grupos

nos períodos avaliados em relação ao tempo de permanência nos braços abertos e fechados e, também, no número de entradas nos braços abertos e fechados.

Figura 31 - Avaliação da ansiedade (LCE) de animais tratados ou não com inibidor da MAGL em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzido por LPS 48 horas após ALI



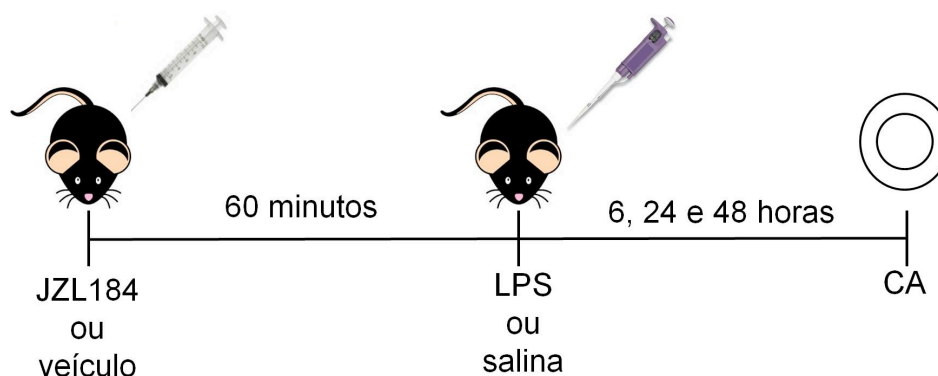
Legenda: (A) % do tempo de permanência nos braços fechados, (B) % de entradas nos braços fechados, (C) % do tempo de permanência nos braços abertos e (D) % de entradas nos braços abertos. Os dados são apresentados como média \pm D.P., n = 5 animais / grupo. Kurskal Wallis seguido de Dunn.

Fonte: (PAVANI, 2014)

5.6 EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ADAPTAÇÃO EM CAMPO ABERTO EM UM MODELO MURINO DE ALI

Um total de 63 camundongos foi dividido aleatoriamente em 4 grupos: Grupo 1 (C1)- não inflamado veículo + salina; Grupo 2 (C2)- inflamado veículo + LPS, Grupo 3 (E1)- tratado e não inflamado JZL184 + salina e Grupo 4 (E2)- tratado e inflamado JZL184 + LPS. Os animais foram tratados pela via i.p. com JZL184 (16mg/kg) ou veículo e após 60 minutos foram submetidos a instilação nasal de LPS ou salina estéril. Os mesmos animais passaram pelo CA três vezes consecutivas: 6, 24 e 48 horas após a instilação intranasal de LPS, conforme ilustrado na figura 32.

Figura 32 - Delineamento experimental empregado no experimento 5



Fonte: (PAVANI, 2014)

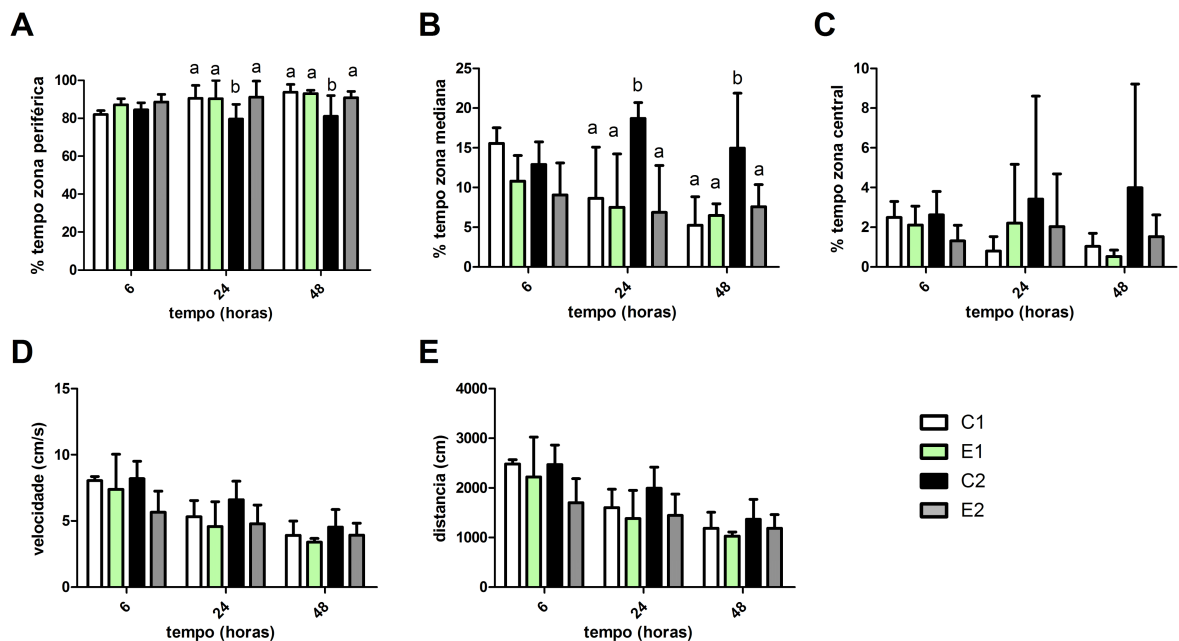
As avaliações da capacidade de adaptação no CA foram realizadas conforme descrito nos itens 4.11.1, respectivamente.

Como no experimento anterior, poucas foram as alterações comportamentais observadas. De fato, a aplicação da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni detectou diferenças significativas apenas para as interações entre grupos e tratamentos às 24 horas após a instilação intranasal de LPS para as porcentagens de tempo gastos na zona periférica ($F(3,56) = 7.07$; $p = 0,0004$) e na zona mediana ($F(3,56) = 10.65$; $p < 0,0001$) do CA. Especificamente, observou-se no grupo C2 (controle inflamado), em relação ao grupo C1, redução do tempo de permanência

dos animais na zona periférica às 24 e 48 horas e aumento deste parâmetro na zona mediana do aparelho em relação às 6 horas (Figura 33 A-B).

Como no experimento anterior, a aplicação da ANOVA de duas vias não evidenciou alterações entre os grupos e entre as iterações tratamento X tempo e entre os diferentes tempos para o tempo de permanência na zona central, para a distância percorrida pelos animais no CA e para a velocidade média no aparelho (Figura 33C-E).

Figura 33 - Avaliação da capacidade de adaptação, no CA, de animais tratados ou não com inibidor da MAGL em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzido por LPS



Legenda: (A) % do tempo de permanência na zona periférica, (B) % do tempo de permanência na zona mediana, (C) % do tempo de permanência na zona central, (D) distância total percorrida e (E) velocidade média. Os dados são apresentados como média \pm D.P., n = 5-7 animais / grupo. Diferentes letras acima das colunas significam diferenças significantes, $p < 0.05$. ANOVA de 2 vias seguida pelo teste Bonferroni (PAVANI, 2014)

Fonte: (PAVANI, 2014)

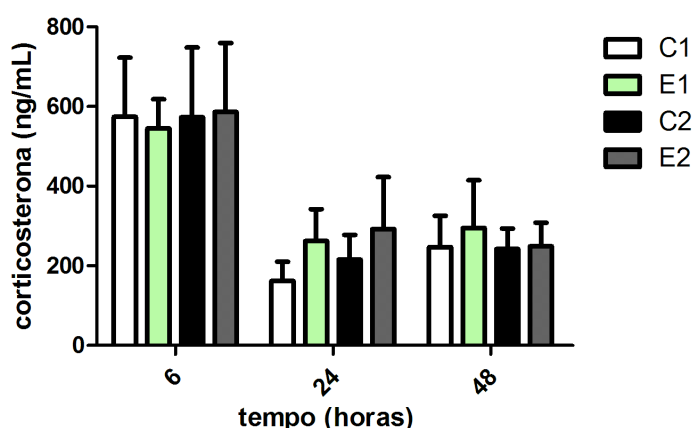
5.7 EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA SÉRICA E EXPRESSÃO DE CITOCINAS HIPOTALÂMICAS EM UM MODELO MURINO DE ALI

Um total de 133 camundongos foi dividido aleatoriamente em 4 grupos: Grupo 1 (C1)- não inflamado veículo + salina; Grupo 2 (C2)- inflamado veículo + LPS, Grupo 3 (E1)- tratado e não inflamado JZL184 + salina e Grupo 4 (E2)- tratado e inflamado JZL184 + LPS. Os animais foram tratados pela via i.p. com JZL184 (16mg/kg) ou veículo e após 60 minutos foram submetidos à instilação nasal de LPS ou salina estéril, conforme ilustrado na Figura 6. Três grupos idênticos de animais foram usados e avaliados em diferentes períodos: 6, 24 ou 48 horas após a instilação intranasal de LPS, conforme ilustrado na figura 12.

As avaliações da concentração de corticosterona sérica e da expressão de RNAm de citocinas hipotalâmicas foram realizadas conforme descrito nos itens 4.12 e 4.13, respectivamente.

Não foram encontradas diferenças estatísticas na concentração sérica de corticosterona dos animais dos diferentes grupos em todos os períodos avaliados (Figura 34).

Figura 34 - Efeitos da inibição da MAGL sobre a concentração de corticosterona sérica em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzido por LPS



Os dados são apresentados como média \pm D.P., n = 7-10 animais / grupo. Anova de uma via seguida de Tukey-Kramer (PAVANI, 2014)

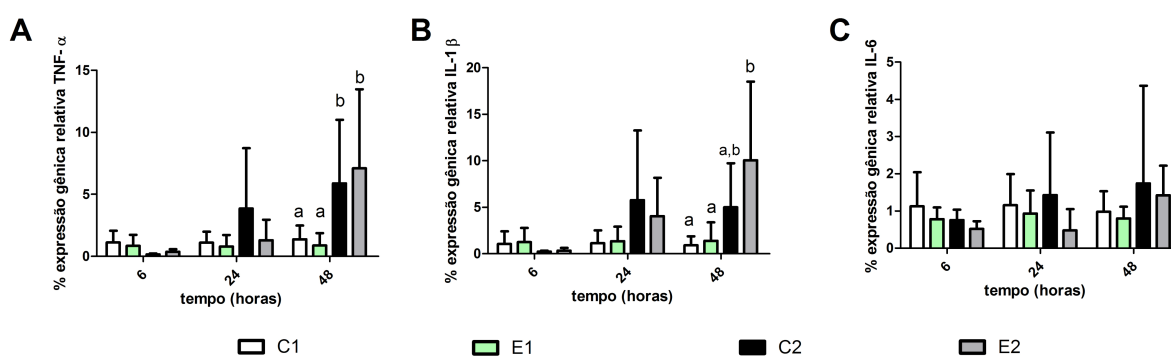
Fonte:

Considerando-se a expressão gênica de TNF- α no hipotálamo dos animais, a ANOVA de duas vias mostrou uma diferença entre os tratamentos ($F(3,52)=2.88$; $p=0,0458$) e entre os tempos de observação ($F(2,52)=6.60$; $p=0.0030$) mas não para a interação tratamento X tempo (Figura 35A). O teste pos-hoc de Bonferroni revelou um aumento significativo na expressão gênica de TNF- α no hipotálamo dos animais do grupo C2 (controle inflamado) e E2 (experimental inflamado) em relação ao animais do grupo controle C1 (não inflamado) ($p<0.05$, 48 horas após ALI), como ilustrado na figura 35A.

Observamos, ainda, uma diferença entre os tratamentos ($F(3,52)=3.30$; $p=0.028$) e entre os tempos ($F(2,52)=4.48$; $p=0.016$) mas não para a interação tratamento X tempo na expressão gênica de IL-1 β no hipotálamo (Figura 35B). O teste pos-hoc de Bonferroni revelou um aumento significativo na expressão gênica de IL-1 β no hipotálamo dos animais do grupo E2 em relação ao animais do grupo controle C1 ($p<0.01$, 48 horas após ALI), como ilustrado na figura 35B.

A ANOVA de duas vias não mostrou alterações entre os tratamentos, entre os tempos e entre a interação tratamento X tempo na expressão gênica de IL-6 no hipotálamo dos animais (Figura 35C).

Figura 35 - Efeitos da inibição da MAGL sobre a porcentagem da expressão de RNAm de citocinas hipotalâmicas



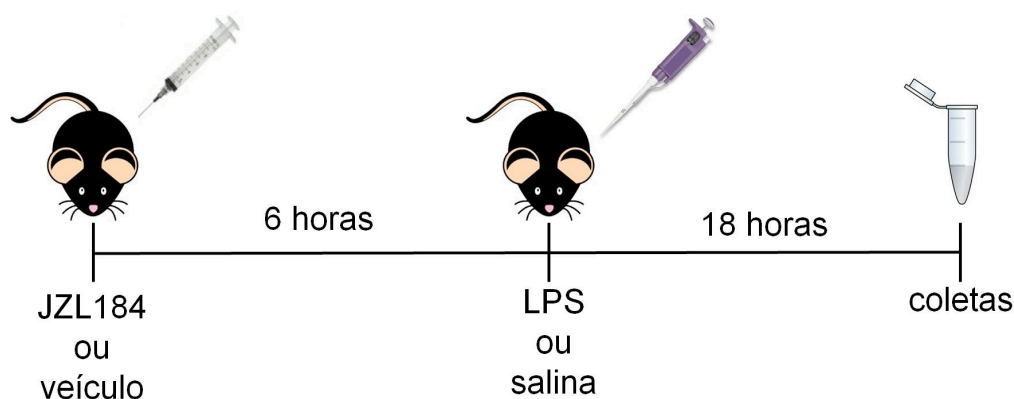
Legenda: (A) TNF- α , (B) IL-1 β e (C) IL-6. Os dados são apresentados como média \pm D.P., $n = 5-6$ animais / grupo. Diferentes letras acima das colunas significam diferenças significantes, $p < 0.05$. ANOVA de 2 vias seguida pelo teste Bonferroni

Fonte: (PAVANI, 2014)

5.8 EXPERIMENTO 7: TRATAMENTO “TERAPÊUTICO” COM JZL184 EM UM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS

Um total de 22 camundongos foi dividido aleatoriamente em 4 grupos tratados de forma “terapêutica” com JZL184: Grupo 1 (C1)- não inflamado salina + veículo; Grupo 2 (C2)- inflamado LPS + veículo, Grupo 3 (E1)- tratado e não inflamado salina + JZL184 e Grupo 4 (E2)- tratado e inflamado LPS + JZL184. Primeiramente, aos animais dos grupos C2 e E2, foi administrado LPS (100 µg/mL) de forma intranasal e aos animais dos grupos C1 e E1 um volume similar de NaCl 0,9% esterilizada (1mL/g de peso corporal do camundongo). Seis horas após a instilação de LPS ou salina, foi feito o tratamento com JZL184 nos grupos E1 e E2 e aos grupos controle, C1 e C2, foi administrado volume similar do veículo. Os camundongos de todos os grupos foram anestesiados com cetamina e xilazina e eutanasiados por exsanguinação por meio da veia cava inferior 24 horas após a ALI induzida por LPS para a coleta do lavado broncoalveolar (Figura 36).

Figura 36 - Delineamento experimental empregado no experimento com tratamento terapêutico com JZL184 (experimento 7)



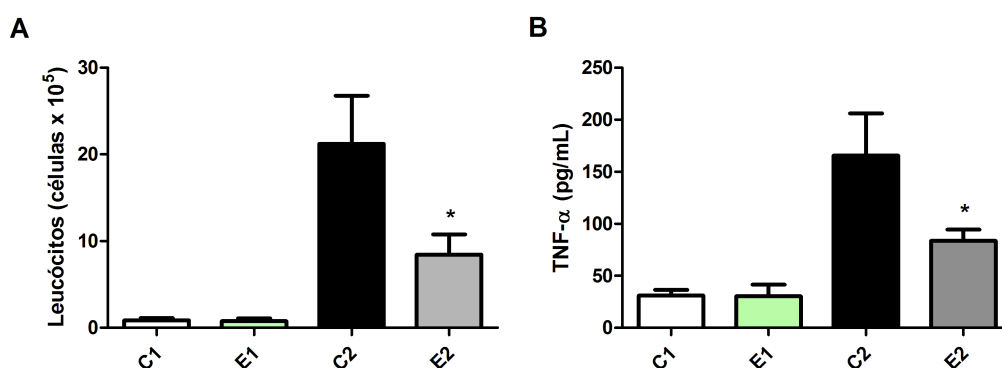
Fonte: (PAVANI, 2014)

A avaliação do número de leucócitos e de TNF- α no LBA foi realizada conforme descrito nos itens 4.5.2 e 4.7, respectivamente.

Em relação aos animais do grupo C1, observamos um grande aumento no número de leucócitos totais e na concentração de TNF- α no LBA dos animais do

grupo C2, 24 horas após a indução da inflamação (Figura 37 A-B). Observamos, ainda, uma redução no número de células inflamatórias ($F(3, 18)= 52.44$; $p<0.0001$) (Figura 37A) e na concentração da citocina no LBA dos animais do grupo E2 em relação aos animais do grupo controle inflamado (C2) ($KW=24.04$, $p<0.05$) (Figura 37B).

Figura 37 - Efeitos do bloqueio da MAGL com JZL184 administrado de forma “terapêutica” sobre o número de neutrófilos e na concentração de TNF- α no LBA de um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzido por LPS



Legenda: (A) leucócitos totais e (B) TNF- α no LBA. Os dados são apresentados como média \pm D.P., n = 5-7 animais / grupo. * $p<0.05$ em relação ao grupo C2. (A) Anova de uma via seguida de Tukey-Kramer e (B) Kruskal-Wallis e teste de Dunn para múltiplas comparações

Fonte: (PAVANI, 2014)

6 DISCUSSÃO

A Monoacilglicrol lípase (MAGL) é a principal enzima de degradação do endocanabinóide 2-araquidonilglicerol (2-AG) (KARLSSON et al., 1997). Mais especificamente, o 2-AG é tido como um endocanabinóide que apresenta propriedades anti-inflamatórias. O fármaco JZL184 é conhecido como um eficaz e seletivo inibidor da MAGL; sugere-se que o JZL184 apresente propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias (ALHOUAYEK et al., 2011). De fato, foram relatados para ele efeitos anti-inflamatórios em modelos de edema de pata, hemorragia gástrica por diclofenaco, colite e inflamação sistêmica (COMELLI et al., 2007; ALHOUAYEK et al., 2011; KINSEY et al., 2011). Ribeiro et al. (2012) mostraram efeitos anti-inflamatórios do canabidiol (CBD), canabinóide não psicotrópico da *Cannabis sativa*, sobre a inflamação pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos. Até o presente momento não há dados na literatura relativos aos possíveis efeitos do 2-AG em modelos que envolvam inflamação pulmonar.

Os tratamentos disponíveis para a inflamação pulmonar aguda conhecida como ALI (da sigla em inglês, *acute lung injury*), em humanos, nada mais são que medidas de suporte, uma vez que terapias específicas para a doença ainda não foram desenvolvidas. Desta forma, nossos estudos foram planejados e executados com a finalidade de buscar por eventuais efeitos do 2-AG, dentro de uma perspectiva neuroimune, utilizando o JZL184 (bloqueador seletivo da MAGL) como tratamento profilático em um modelo murino de ALI induzida por LPS. Mostramos que uma única dose de JZL184 (16mg/kg, i.p.) foi capaz de reduzir parâmetros inflamatórios pulmonares durante o percurso da doença em um modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS; especificamente, a migração de leucócitos (neutrófilos, linfócitos e macrófagos) aos pulmões, a expressão de moléculas de adesão no BAL e no sangue, a permeabilidade vascular nos pulmões, a atividade de neutrófilos (MPO) pulmonares e a produção de citocinas e quimiocinas no BAL. Também mostramos que a ativação dos receptores canabinóides CB1 e CB2 podem ter papel relevante nos efeitos anti-inflamatórios, aqui relatados para o JZL184.

O protocolo experimental do modelo murino de ALI foi obtido em experimentos previamente realizados em nossos laboratórios (RIBEIRO et al.,

2012). A ALI caracteriza-se por inflamação alvéolo-capilar, inflamação com acúmulo de neutrófilos e produção de citocinas pró-inflamatórias (TSUSHIMA et al., 2009). A migração de neutrófilos para o interstício e para o espaço bronco-alveolar é relevante por exercer papel central na progressão da ALI induzida por LPS (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011). Importante ressaltar, que a migração de neutrófilos para os pulmões não é suficiente para causar a ALI; de fato, os neutrófilos podem migrar para os pulmões sem a doença, o que implica ser necessária uma ativação dos mesmos (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011). Em outras palavras, implica na necessidade de produção e liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Quando do início dos estudos para escolha da dose do JZL184 a ser utilizada no modelo de ALI, analisamos os efeitos do bloqueio da MAGL no modelo de ALI através da contagem do número de leucócitos totais e diferenciais e da avaliação dos níveis de TNF- α no LBA com o uso de doses do fármaco, citadas em referências (LONG et al., 2009; SCHLOSBERG et al., 2009; ALHOUAYEK et al., 2011).

As doses escolhidas para avaliação do número de leucócitos e dos níveis de TNF- α no LBA foram 4, 16 e 40mg/kg. Após as doses de 16 e 40mg/kg observamos uma redução da migração de leucócitos totais induzida pela inflamação; observamos uma redução principalmente do infiltrado de neutrófilos no LBA. As doses mais altas do JZL184 também foram eficazes em prevenir o aumento de TNF- α causado pela inflamação no modelo de ALI. Da mesma forma, a administração prévia do canabidiol, no mesmo modelo, preveniu a ALI muito provavelmente por atuar nos receptores CB2 e de adenosina A_{2A} (RIBEIRO et al., 2012). Corroborando com nosso resultado, relatou-se que a inibição da enzima conversora de TNF produziu uma redução da infamação pulmonar aguda induzida por LPS em ratos (SHIMIZU et al., 2009). Os achados obtidos após a administração de JZL184 no modelo murino inflamatório de hemorragia gástrica por diclofenaco também concordam com os presentes achados pois, o fármaco evitou o aumento dos níveis de TNF- α no estômago (KINSEY et al., 2011).

Long et al. (2009) relataram efeitos indesejáveis de veículos utilizados na diluição do JZL184. Em nossas condições laboratoriais, o veículo que melhor solubilizou o JZL184 foi aquele proposto por Busquets-Garcia et al. (2011). Para comprovar se o efeito sobre a ALI era mesmo decorrente do uso do JZL184 e não do veículo, um novo experimento foi realizado. Desta feita, utilizamos animais

tratados com salina, com o veículo ou com o JZL184 (16mg/kg), diluído neste veículo, todos inflamados com LPS. Após 24 horas da indução da inflamação, foi feita a contagem total e diferencial de leucócitos. Não se observaram diferenças estatísticas entre os grupos salina e veículo, mostrando estes dados que o veículo não exercia atividade na inflamação pulmonar e, portanto, confirmando o efeito do JZL184 no modelo murino de ALI.

Dada a observação de efeitos anti-inflamatórios do JZL184, investigamos ainda outros parâmetros que pudessem melhor caracterizar os efeitos do fármaco em nosso modelo: a migração de leucócitos da medula óssea para o sangue e para o pulmão, a atividade da mieloperoxidase (MPO) pulmonar e o extravasamento de proteínas para o espaço alveolar.

É de conhecimento geral que o processo inflamatório se inicia na microcirculação, sendo caracterizado pela formação de espaços intercelulares responsáveis pelo aumento da permeabilidade microvascular observada na doença (WARE, 2006). Desta forma, a diminuição na função da barreira celular epitelial facilita o influxo de fluido rico em células e macromoléculas para o espaço alveolar. Quer nos parecer que a redução na função da barreira epitelial celular na ALI pode ter facilitado o influxo de fluido rico em células e macromoléculas no espaço alveolar. Assim como demonstrado no presente trabalho, Ribeiro et al. (2012) relataram um aumento da permeabilidade vascular e de proteínas no fluido pulmonar em um modelo murino de ALI. Mostramos, agora, que o aumento da permeabilidade vascular nos pulmões causado pela administração intranasal de LPS foi prevenido pelo uso do JZL184.

Na vigência de um processo inflamatório, as células sanguíneas são imediatamente recrutadas para o local da inflamação; a medula óssea produz maior quantidade de leucócitos que migram para a corrente sanguínea, dirigindo-se para o foco inflamatório (OPDENAKKER; FIBBE; VAN DAMME, 1998). Em nosso modelo experimental, observamos redução, atingindo os níveis basais, do número de granulócitos produzidos na medula óssea dos animais tratados com JZL184 em relação aos animais do grupo controle inflamados, 48 horas após instilação nasal de LPS. Na contagem de leucócitos sanguíneos, os dados do grupo tratado foram semelhantes aos do grupo controle inflamado porém menores que aqueles observados nos animais do grupo controle não inflamado, neste mesmo período.

O influxo de neutrófilos para o interstício e para o espaço broncoalveolar é considerado fundamental para a progressão da ALI (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011). Observamos que o tratamento prévio com o JZL184 reduziu a migração de leucócitos para os pulmões dos camundongos 6, 24 e 48 horas após a indução da inflamação, como mostrado pelo número de leucócitos no LBA. Especificamente, observamos redução no número de neutrófilos e de linfócitos no LBA dos animais tratados com o JZL184 em relação aos animais inflamados e não tratados. Sabe-se que a migração de leucócitos para o sítio da inflamação é importante pois a presença de células inflamatórias, em especial de neutrófilos, pode danificar o tecido pulmonar (KLEBANOFF, 2005). De fato, observou-se que a instilação intranasal de LPS causou dano tecidual e, sendo assim, parece-nos viável sugerir que a diminuição do processo inflamatório, induzido pelo tratamento prévio com JZL184 em camundongos é acompanhada por redução do dano tecidual na ALI.

A rápida e intensa migração dos neutrófilos pode ser justificada pela sua especialização nas funções primárias de fagocitose e destruição de microorganismos (KLEBANOFF, 2005). Sabe-se ser a MPO uma molécula que apresenta atividade microbicida, liberada dentro dos fagossomos durante o processo de degranulação. Sabe-se, ainda, que o ácido hipocloroso (HOCl) é o produto inicial do sistema MPO-H₂O₂-cloridrato (KLEBANOFF, 2005). Neste sentido, o HOCl é o composto oxidante com atividade bactericida produzido pelos neutrófilos. Assim, uma análise da atividade da MPO tem sido considerada um bom marcador para avaliação dos neutrófilos teciduais (RIBEIRO et al., 2012). Ribeiro et al. (2012) relataram que a atividade da MPO aumentou após a indução da ALI em camundongos; dados que corroboram com os do presente trabalho. Observamos, ainda, que o tratamento com JZL184 preveniu esse aumento da atividade da MPO produzida pela administração do LPS intranasal.

Em humanos, a lesão pulmonar aguda (ALI) ou a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), é o componente principal da disfunção múltipla de órgãos sendo descrita como "síndrome de inflamação e aumento da permeabilidade endotelial capilar" (WEINACKER; VASZAR, 2001; TASAKA; HASEGAWA; ISHIZAKA, 2002). Mediadores inflamatórios desempenham um papel chave na SDRA, sendo esta apontada como a principal causa de morte em tais condições (BHATIA; MOOCHHALA, 2004).

Concordando com o que foi relatado anteriormente para diferentes doenças inflamatórias como inflamações gástricas e a própria ALI (ALHOUAYEK et al., 2011; KINSEY et al., 2011; COSTOLA-DE-SOUZA et al., 2013), nosso estudo mostrou que o JZL184 protegeu os animais da inflamação pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos. Durante a inflamação, a migração celular inicia-se com a produção e liberação, por macrófagos, de TNF- α e de outras citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias, tal como a IL-6, MCP-1, IL-8 humana (KC em camundongos) e MIP-2. Observamos, neste estudo, redução na produção das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) e da quimiocina (MCP-1) nos animais tratados com o JZL184 e inflamados com LPS em relação aos do grupo controle inflamado. Estes achados parecem ser muito importantes uma vez que as citocinas são essenciais para o estabelecimento da inflamação e para a ativação fagocitária. Este resultado pode, então, explicar a redução na migração leucocitária para os pulmões após o uso prévio do JZL184.

Quimiocinas que atraem neutrófilos, como a MIP-2 e KC e também a MCP-1 (CCL2) que além dos neutrófilos atraem monócitos e linfócitos (BALAMAYOORAN et al., 2011), têm papel relevante na mediação da granulopoiese e no recrutamento de leucócitos a locais afetados por LPS (KOLLS; KHADER, 2010). Observamos uma redução na produção das quimiocinas (MCP-1, MIP-2 e KC) nos animais tratados com o JZL184 e inflamados com LPS em relação aos do grupo controle inflamado. Este resultado pode explicar a observada redução na migração leucocitária para os pulmões após o uso preventivo (COSTOLA-DE-SOUZA et al., 2013) do JZL184 como demonstrado no presente trabalho. Corroborando com nossos achados, mostrou-se que o tratamento prévio com o JZL184 reduziu e/ou bloqueou a expressão de citocinas e quimiocinas tanto no curso da inflamação pulmonar aguda induzida por LPS (COSTOLA-DE-SOUZA et al., 2013) como no intestino ou na corrente sanguínea em modelos de inflamação gástrica (ALHOUAYEK et al., 2011; KINSEY et al., 2011).

Nossos resultados sugerem, ainda, que a inibição da expressão das moléculas de adesão após o uso do JZL184 possa estar também envolvida nos efeitos anti-inflamatórios relatados. A migração de leucócitos para tecidos inflamados envolve interações complexas dos leucócitos com o endotélio através de expressão das moléculas de adesão na superfície tecidual. No presente estudo, mostramos que o tratamento com o JZL184 (1) reduziu a expressão de β 2-integrina

no sangue 6 horas após a instilação intranasal de LPS, (2) aumentou a expressão de L-selectina no sangue 6 horas após a indução da ALI e (3) reduziu a expressão da β 2-integrina no LBA 48 horas após a indução da inflamação. Em conjunto, estes fatos parecem justificar a menor intensidade de inflamação observada nos camundongos do grupo tratado com JZL184 em relação aos do grupo controle inflamado. De fato, as moléculas de adesão β 2-integrina e L-selectina são conhecidas por aumentarem o processo de adesão leucocitário (KISHIMOTO et al., 1989a; SIMON et al., 1992).

Estudos ao longo do tempo com a expressão de β 2-integrina e L-selectina, durante a inflamação, têm mostrado uma relação inversa entre as concentrações das mesmas no soro; a β 2-integrina é aumentada enquanto a L-selectina é diminuída (KISHIMOTO et al., 1989a; SIMON et al., 1992). Especula-se que essa relação inversa é necessária para permitir a adesão de neutrófilos (ROCHON; FROJMOVIC, 1992). Levando este fato em consideração e também as mudanças na expressão das moléculas de adesão, é possível sugerir que efeitos do bloqueio da MAGL sobre as moléculas de adesão possam ter contribuído para a redução na adesão das células inflamatórias nos animais tratados com JZL184 no presente experimento.

O JZL184 é conhecido por inibir a enzima MAGL, assim aumentando os níveis do endocanabinóide 2-AG (LONG et al., 2009; LONG; NOMURA; CRAVATT, 2009). O 2-AG e a anandamida são lipídios sinalizadores que se ligam aos receptores canabinóides CB1 (MATSUDA et al., 1990) e CB2 (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). Tem sido mostrado que a ativação dos receptores CB1 e CB2 exerce um papel importante na inflamação (ALHOUAYEK et al., 2011). Assim, agonistas endógenos e exógenos dos receptores dos canabinóides estão envolvidos com a ativação de leucócitos e com a produção de citocinas em diferentes condições inflamatórias (MASSI et al., 2000; SACERDOTE et al., 2000; SMITH; DENHARDT; SMITH; TERMINELLI; DENHARDT, 2000, 2001; TERMINELLI, 2001; CONTI et al., 2002).

O 2-AG, atuando principalmente através do receptor CB2, estimula reações inflamatórias e alérgicas por induzir a adesão dos leucócitos a células endoteliais vasculares (OKA et al., 2006). Além disso, outras células não hematopoiéticas, tais como células endoteliais, podem responder a ligantes dos receptores CB1 e CB2. Os receptores CB1 e CB2 são expressos durante a angiogênese inflamatória; o

receptor CB1 parece estar fortemente envolvido com o acúmulo de leucócitos e com a produção de citocinas; o receptor CB2 está relacionado sobretudo com uma resposta mediada pela ativação de neutrófilos. Em amostras de pele de cães saudáveis detectou-se imunoreatividade para receptores CB1 e CB2 em vários tipos de células da epiderme e da derme dos animais, incluindo-se aqui as células perivasculares com morfologia de mastócitos, os fibroblastos e as células endoteliais. Observou-se nas amostras de pele de cães, com dermatite atópica, uma maior imunoreatividade dos receptores CB1 e CB2 do que em amostras de pele de cães saudáveis (CAMPORA et al., 2012). Portanto, para avaliar o envolvimento da ativação dos receptores CB1 e CB2 nos efeitos anti-inflamatórios do JZL184, empregou-se, neste trabalho, os antagonistas CB1 (AM281) e CB2 (AM630) antes do tratamento com JZL184.

Notavelmente, os tratamentos com o AM281 e com o AM630 reduziram todos os efeitos anti-inflamatórios do JZL184 relatados neste estudo; por exemplo, a migração leucocitária aos pulmões, o dano tecidual, a expressão de moléculas de adesão, a redução da permeabilidade vascular e a produção de quimiocinas pró-inflamatórias 6, 24 ou 48 horas após a indução da ALI. Mostrou-se que o bloqueio do receptor CB1 e principalmente do receptor CB2 reduz a resposta inflamatória em um modelo murino de hemorragia gástrica induzida por fármacos (KINSEY et al., 2011). Mostrou-se, também, que o bloqueio dos receptores canabinóides atenuou os sintomas apresentados por camundongos em um modelo de colite e de inflamação sistêmica (ALHOUAYEK et al., 2011). Além disso, a migração de neutrófilos em humanos (MCHUGH et al., 2008), a produção de citocinas/quimiocinas em camundongos (ALHOUAYEK et al., 2011), a permeabilidade vascular em cobaias (FUKUDA; ABE; YOSHIHARA, 2010) e a expressão de moléculas de adesão em camundongos (ZHAO et al., 2010) também foram reduzidas pela ativação dos receptores CB1 ou CB2.

Assim, parece-nos viável sugerir que o bloqueio dos efeitos anti-inflamatórios produzidos pelo JZL184 na ALI induzida por LPS possa estar envolvido com a ativação dos receptores CB1 e CB2. Entretanto, não podemos esquecer que as ações de canabinóides podem estar também relacionadas a outros mecanismos além da ativação dos receptores CB1 e CB2 como, por exemplo, a ativação do receptor de adenosina (RIBEIRO et al., 2012) e/ou a inibição parcial da FAAH provocada pelo uso do JZL184 (LONG et al., 2009). Além disso, outra possibilidade

pode explicar os efeitos anti-inflamatórios do JZL184 mostrados neste trabalho: a liberação do ácido araquidônico através da hidrólise do 2-AG e da anandamida, fatos que levariam à formação de eicosanoides (leucotrienos) atuantes nos neutrófilos. Dados mostraram que o 2-AG *in vitro* ativou neutrófilos humanos, um efeito atribuído à ligação do leucotrieno (LT) B₄ a um receptor específico presente nos neutrófilos (receptores LTB₄) (CHOUINARD et al., 2011).

Uma vez realizada a análise crítica dos resultados obtidos após o emprego preventivo do JZL184 avaliamos, da mesma forma, aqueles decorrentes de seu emprego “terapêutico”, isto é, do uso do JZL184 quando os animais já apresentavam os sinais de inflamação. Ressaltamos que optamos por fazer este experimento por acreditar que nenhum paciente internado em UTI, por apresentar quadro de ALI/ARDS, receberia qualquer tipo de terapia, à *priori*. Desta forma, avaliamos dados relativos à migração de leucócitos para os pulmões. Observamos que o tratamento terapêutico com o JZL184 (16mg/kg) foi capaz de diminuir substancialmente a contagem total de leucócitos no LBA 24 horas após a indução da inflamação pulmonar. Este dado coincide com aquele por nós observado quando do tratamento preventivo. Posteriormente, avaliamos os níveis de TNF- α no LBA dos animais submetidos a inflamação pulmonar. Observamos que o tratamento com o JZL184 diminuiu de forma significativa a produção de TNF- α , 24 horas após a instilação intranasal de LPS. Tomados em seu conjunto, os presentes achados experimentais mostram que o tratamento terapêutico com o JZL184 diminuiu a inflamação pulmonar induzida por LPS. Estes resultados coincidem com aqueles obtidos com aqueles obtidos após o emprego prévio do fármaco, em especial, aqueles relativos à migração de leucócitos para os pulmões e a produção de TNF- α nos pulmões. Assim sendo, acreditamos que o mecanismo de ação responsável pelos efeitos terapêuticos do JZL184 também decorra de uma sinalização via receptores canabinóides CB1 e CB2.

Uma vez caracterizadas as alterações imunes, pareceu-nos interessante verificar possíveis alterações comportamentais induzidas pelo LPS intranasal e, no caso de presentes, se o uso do JZL184 teria algum efeito sobre as mesmas. Para tanto, utilizamos o CA e o LCE.

O CA vem sendo utilizado em nossos laboratórios há muitos anos para análise da atividade geral ou exploratória dos animais (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1979, 1980; FRUSSA-FILHO; PALERMO-NETO, 1988, 1990, 1991) assim

como da atividade motora (BERNARDI, PALERMO-NETO, 1980; FLÓRIO; PALERMO-NETO, 1993) e dos níveis de ansiedade (RIGHI; PALERMO-NETO, 2003; FONSECA et al., 2005; STANKEVICIUS et al., 2008). Como se lê na metodologia, trata-se de uma arena de madeira pintada de branco em que os animais são colocados para explorá-la livremente. Os baixos índices de iluminação e ausência dos observadores na sala (o comportamento é registrado por meio de uma câmera) permite que se façam inferências a respeito do comportamento emitido pelos animais nesta situação.

De modo geral, os animais quando colocados no aparelho tendem a explorá-lo principalmente em sua zona periférica (ADES, 1976), até mesmo nos locais em que tocam as paredes com as suas vibriças. Com o passar do tempo, começam a explorar a zona mediana e, finalmente, a zona central do aparelho. Sabe-se que situações de estresse ou de ansiedade aumentam o tempo de permanência dos animais na zona periférica do aparelho, diminuindo, conseqüentemente, a exploração da zona mediana e, principalmente, da zona central (RIGHI; PALERMO-NETO, 2003; FONSECA et al., 2005; STANKEVICIUS et al., 2008). O aumento de luminosidade ou a introdução de barulhos ou outro fator estressante no momento das observações no CA também fazem com que os animais permaneçam mais tempo na zona periférica do aparelho. Em ambos os casos (ansiedade e estimulação ambiental), observam-se ainda diminuição da freqüência de locomoção, do ato de levantar (*rearing*) e um aumento do número de bolos fecais (ADES, 1976).

Como comentado, o presente experimento foi realizado na ausência de estimulação ambiental. Desta forma, qualquer alteração comportamental detectada no aparelho deve ser atribuída a variáveis endógenas, no caso aos tratamentos com o LPS e/ou com o JZL184 ou seu veículo.

Estudos conduzidos no laboratório de Hugo Oscar Besedovsky mostraram que a imunização de ratos produzia um aumento na atividade elétrica de neurônios do hipotálamo ventromedial que correspondia ao momento de pico da produção de anticorpos contra o antígeno (BESEDOVSKY et al., 1977). Este mesmo grupo havia demonstrado que a imunização de ratos e de camundongos com diferentes antígenos levava a um aumento de até três vezes na concentração de corticosterona no sangue (BESEDOVSKY et al., 1975; DEL REY et al., 2000). Mostrou-se, também, que mediadores solúveis liberados por células do sistema imune ativadas *in vitro* também eram capazes de aumentar os níveis séricos de corticosterona de ratos

(BESEDOVSKY; DEL REY; SORKIN, 1981). O conjunto de evidências apresentadas pelo grupo de Besedovsky sugere que a ativação do sistema imune e a consequente produção de mediadores solúveis provoca uma resposta endócrina desencadeada pelas ações destes mediadores no SNC. De fato, alguns anos depois foi demonstrado pelo próprio Besedovsky que a injeção de IL-1, substância liberada por exemplo por macrófagos ativados, é capaz de promover um aumento nos níveis plasmáticos de ACTH e, também de corticosterona via ativação do eixo HPA de ratos e camundongos (BESEDOVSKY et al., 1986). Mais especificamente, mostrou-se que a ação da IL-1 se fazia por meio da ativação de neurônios produtores do fator liberador de corticotrofina (CRF) (BERKENBOSCH et al., 1987).

Sabe-se, hoje, que a ativação do eixo HPA e a consequente liberação de ACTH e de glicocorticóides fazem parte das respostas neurovegetativas ligadas às situações de estresse e ansiedade (RIVIER; VALE, 1983). Desta forma, a ativação do mesmo eixo pela IL-1, que pode ser produzida durante um processo inflamatório ou infeccioso, passa então a ser considerada como parte de uma situação de estresse ou ansiedade, de forma semelhante àquela desencadeada por estímulos ambientais ou físicos (DUNN; BROWN; LOVE, 1995).

O conjunto de alterações comportamentais observadas em animais após a injeção de IL-1 por via i.p. ou intracerebroventricular (i.c.v.), assim como de LPS por via i.p. foi denominado de comportamento doentio (*sickness behavior*). Importante salientar neste momento que o comportamento doentio não deve ser compreendido como um estado de depressão inespecífico e/ou generalizado do SNC, mas sim como uma estratégia altamente organizada que visa a adaptação do animal ao estímulo (no caso, uma infecção) e que, em última instância pode ser crítico para a sobrevivência (DANTZER, 2001).

A forma exata pela qual as citocinas modulam o comportamento e a atividade neuronal não está totalmente esclarecida; no entanto é indiscutível que neurônios apresentam receptores para diferentes citocinas sendo por elas modulados (GADEK-MICHALSKA et al., 2013). Alguns trabalhos mostram o envolvimento das prostaglandinas nas alterações comportamentais ocasionadas pela injeção de IL-1 (BLUTHÉ et al., 1992).

Nossos resultados mostraram pequenas alterações comportamentais dos animais no CA após a administração do LPS. Observamos uma pequena redução do tempo de permanência dos camundongos do grupo controle inflamado (C2) na zona

periférica com concomitante aumento deste parâmetro na zona mediana. A uma primeira vista, esta alteração poderia indicar uma pequena redução dos níveis de ansiedade dos animais no aparelho 24 horas após a administração do LPS. No entanto, a ausência de alteração comportamental no LCE parece descartar essa possibilidade; de fato, nenhuma alteração foi observada nas porcentagens e nos tempos de permanência dos animais nos braços abertos e fechados do aparelho. Mais que isto, não se observaram alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona entre os animais dos diferentes grupos.

Considerando-se que os animais do grupo C2 haviam sido tratados com LPS por via intranasal e, lembrando-se que o LPS produz comportamento doentio caracterizado, entre outros, por uma diminuição de motivação, é possível sugerir que os animais tenham explorado menos o aparelho por redução do “drive” ou da motivação relacionada à exploração. Também nesse caso, quer nos parecer não ser esta a explicação uma vez que também se observou uma redução de atividade na zona periférica e um aumento simultâneo da mesma na zona mediana do aparelho. Desta forma, quer nos parecer que esta pequena alteração comportamental estaria mesmo indicando uma pequena redução dos níveis de ansiedade dos animais induzida pelo LPS no CA. Neste caso, a redução teria sido tão pequena a ponto de não ser perceptível em outro aparelho (LCE) onde a estimulação ambiental é determinante para escolha do braço preferencial.

Embora não se possa precisar a razão desta pequena redução de ansiedade, é inegável que foi produzida por ações do LPS no SNC. Uma vez que os níveis de IL-1 β apresentava uma tendência ao aumento e os níveis de TNF- α estavam aumentados nos animais do grupo C2 em relação aos do grupo controle (C1) é tentador sugerir o envolvimento destas citocinas com a pequena redução dos níveis de ansiedade acima discutido. De fato, já se mostrou redução da atividade exploratória de camundongos 20 minutos após administração i.c.v. de IL-1 em camundongos (SPADARO; DUNN, 1990). Dunn e Wang (1995) já sugeriram ser a IL-1 capaz de mimetizar uma situação estressante ambiental.

Uma análise simplista dos dados do CA poderia sugerir que o JZL184 tenha prevenido os efeitos do LPS no aparelho uma vez que a porcentagem de permanência dos animais do grupo E2 não foi diferente daquela dos animais do grupo C1. No entanto, não se observaram diferenças significantes entre os dados dos grupos E2 e E1 no CA, isto é, entre os animais tratados com o JZL184 com ou

sem o LPS. Diferentes efeitos foram observados para o JZL184 nos níveis de IL-1 β e de TNF- α no hipotálamo dos animais dos grupos E1 e E2, ou seja, somente após o tratamento com o JZL184 e com o LPS observou-se um aumento na expressão de IL-1 β e de TNF- α no hipotálamo dos animais. Destaque-se, no entanto, que idêntico efeito foi observado para os grupos controle inflamado (C2) e experimental inflamado (E2) no tocante aos níveis de IL-1 β e de TNF- α no hipotálamo dos animais. Neste sentido, trabalho de Longe et al. (2009) empregando o JZL184 em um diferente contexto experimental mostra hipomotilidade, analgesia e hipotermia induzidas pelo fármaco; os presentes dados contrastam, pois, com os deste grupo de pesquisadores pelo menos no que diz respeito à hipomotilidade.

Trabalho do grupo de Besedovsky mostrou que a administração i.p. de LPS aumenta a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no hipotálamo de camundongos; este aumento de citocinas hipotalâmicas era acompanhado por aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona (DEL REY et al., 2000). De forma interessante, estes autores mostraram que a administração de um antagonista dos receptores de IL-1 β i.c.v. foi capaz de antagonizar os efeitos do LPS no aumento de corticosterona plasmática (DEL REY et al., 2000).

Uma vez que administrou-se o LPS neste experimento por via intranasal é possível sugerir que as pequenas alterações comportamentais e endócrinas observadas sejam decorrentes de pequenas variações nos níveis de citocinas e/ou de efeito das mesmas na atividade neuronal. De fato, toda a gama de alterações que caracterizam o comportamento doente provieram de estudos que empregaram a via i.p. ou a via i.c.v. Mesmo assim, é curioso que animais que apresentavam um quadro inflamatório pulmonar intenso induzido pelo LPS, como observado neste estudo, tenham apresentado alterações comportamentais tão pequenas, em especial no CA. Era de se esperar que a dificuldade respiratória e/ou a redução de oxigenação resultassem em alterações mais evidentes da atividade exploratória. Estaria esta situação envolvida com o pequeno aumento de ansiedade detectado no aparelho? Futuros experimentos poderão responder esta questão.

Tomados em seu conjunto, os presentes resultados permitem concluir que a instilação intranasal do LPS induziu inflamação pulmonar aguda 6, 24 e 48 horas após o procedimento, assim como a sua prevenção e/ou reversão pelo bloqueio da MAGL produzido por dose única de JZL184. É provável que os efeitos anti-inflamatórios agora observados no modelo murino de ALI induzida por LPS tenham

sido decorrência da ativação dos receptores canabinóides CB1 e/ou CB2. Parece-nos possível inferir, ainda, que a utilização do JZL184 não tenha produzido alterações comportamentais nos animais na dose, períodos e nos testes comportamentais usados.

Embora se tenha consciência de que se deva ter cuidado com extrapolação de dados experimentais para o contexto clínico humano, quer nos parecer seja lícito sugerir que o bloqueio da MAGL deva ser considerado uma ferramenta terapêutica relevante para o tratamento de doenças inflamatórias pulmonares como a ALI e a SDRA.

7 CONCLUSÕES

7.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

O tratamento com JZL184 em camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar aguda (ALI) induzida pela administração intranasal de LPS:

- diminuiu a migração de leucócitos, especialmente de neutrófilos, para os pulmões;
- diminuiu o dano tecidual;
- diminuiu a produção de citocinas e de quimiocinas no sobrenadante do LBA;
- diminuiu a distribuição de leucócitos na medula óssea;
- não alterou a distribuição de leucócitos no sangue;
- diminuiu a atividade de MPO (medida indireta da atividade de neutrófilos) no tecido pulmonar;
- diminuiu a permeabilidade vascular;
- não induziu comportamento doentio;
- aumentou ligeiramente os níveis de ansiedade no CA mas não no LCE;
- não alterou os níveis séricos de corticosterona;
- aumentou os níveis hipotalâmicos de TNF- α e IL-1 β .

Todos os parâmetros de inflamação foram reduzidos ou abolidos pela inibição da MAGL pelo uso do JZL184.

O uso de antagonistas dos receptores canabinóides CB1 e/ou CB2 impediram a manifestação dos efeitos do JZL184 no modelo experimental de ALI.

7.2 CONCLUSÃO GERAL

O tratamento com o JZL184 (16mg/kg) produziu efeito anti-inflamatório em um modelo murino de ALI, muito provavelmente em decorrência de um aumento da sinalização dos receptores canabinóides CB1 e CB2. Por esta razão, acreditamos que o bloqueio da MAGL venha a ser, no futuro, uma ferramenta terapêutica relevante para o tratamento de doenças inflamatórias pulmonares, tais como ALI e SDRA.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E.; MATTHAY, M. A.; DINARELLO, C. A.; VINCENT, J. L.; COHEN, J.; OPAL, S. M.; GLAUSER, M.; PARSONS, P.; FISHER, C. J.; REPINE, J. E. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 1, p. 232–235, 2000.
- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annual Review Of Immunology**, v. 2, p. 283–318, 1984.
- ADER, R. On the development of psychoneuroimmunology. **European Journal Of Pharmacology**, v. 405, n. 1-3, p. 167–176, 29, 2000.
- ADES, C. A observação do comportamento em situações experimentais. **Ciência e Cultura**, v. 28, p. 25-34, 1976.
- AGARWAL, S. K.; MARSHALL, G. D. Dexamethasone promotes type 2 cytokine production primarily through inhibition of type 1 cytokines. **Journal Of Interferon & Cytokine Research : The Official Journal Of The International Society For Interferon And Cytokine Research**, v. 21, n. 3, p. 147–155, 2001.
- ALHOUEYEK, M.; LAMBERT, D. M.; DELZENNE, N.M.; CANI, P. D.; MUCCIOLI, G. G. Increasing endogenous 2-arachidonoylglycerol levels counteracts colitis and related systemic inflammation. **FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 25, n. 8, p. 2711–2721, 2011.
- ALVES, G. J.; RIBEIRO, A.; PALERMO-NETO, J. The neuroimmune changes induced by cohabitation with an Ehrlich tumor-bearing cage mate rely on olfactory information. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 1, p. 32–39, 2012.
- ALVES-FILHO, J. C.; SPILLER, F.; CUNHA, F. Q. Neutrophil paralysis in sepsis. **Shock**, v. 34, p. 15–21, 2010. Supplement1.
- ARMARIO, A. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v. 5, n. 5, p. 485–501, 2006.
- ASGHARI-ROODSARI, A.; LESANI, A.; JAVADI-PAYDAR, M.; TABATABAEEFAR, L.; TAVANGAR, S. M.; NOROUZI, A.; DEHPOUR, A. R. Tocolytic effect of delta9-tetrahydrocannabinol in mice model of lipopolysaccharide--induced preterm delivery: role of nitric oxide. **Reproductive Sciences Thousand Oaks Calif**, v. 17, n. 4, p. 391–400, 2010.
- ASHBAUGH, D. G.; BIGELOW, D. B.; PETTY, T. L.; LEVINE, B.; ASHBAUGH, D. G.; BIGELOW, D. B.; PETTY, T. L.; LEVINE, B. E. Acute respiratory distress in adults. *The Lancet*, Saturday 12 August 1967. **Critical care and Resuscitation:**

Journal of the Australasian Academy of Critical Care Medicine, v. 7, n. 1, p. 60–61, 2005.

BAEUERLE, P. A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 141–179, 1994.

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, v. 392, n. 6676, p. 565–568, 1998.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Human chemokines: an update. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 675–705, 1997.

BALAMAYOORAN, G.; BATRA, S.; BALAMAYOORAN, T.; CAI, S.; JEYASEELAN, S. Monocyte chemoattractant protein 1 regulates pulmonary host defense via neutrophil recruitment during Escherichia coli infection. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 7, p. 2567–2577, jul. 2011.

BARNETT, S. A. Behaviour of wild rats in the laboratory. **Medical & Biological Illustration**, 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.

BATRA, S.; BALAMAYOORAN, G.; SAHOO, M. K. Nuclear factor- κ B: a key regulator in health and disease of lungs. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, v. 59, n. 5, p. 335–351, 2011.

BERCZI, I. The stress concept and neuroimmunoregulation in modern biology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 851, p. 3–12, 1998.

BERKENBOSCH, F.; VAN OERS, J.; DEL REY, A.; TILDERS, F.; BESEDOVSKY, H. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. **Science**, v. 238, n. 4826, p. 524–526, 1987.

BERNARD, G. R.; ARTIGAS, A.; BRIGHAM, K. L.; CARLET, J.; FALKE, K.; HUDSON, L.; LAMY, M.; LEGALL, J. R.; MORRIS, A.; SPRAGG, R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 149, n. 3, pt. 1, p. 818–824, 1994.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Atividade geral: conceitos e medidas. **Psicologia**, v. 6, n. 1, p. 43-55, 1980.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Effects of abrupt and gradual withdrawal long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats. **Psychopharmacology**, v. 65, p. 247-250, 1979.

BERSTEN, A. D.; EDIBAM, C.; HUNT, T.; MORAN, J. Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian

States. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 165, n. 4, p. 443–448, 2002.

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. E.; SORKIN, E. Immune-neuroendocrine interactions. **Journal of immunology**, v. 135, n. 2, p. 750s–754s, 1985. Supplement.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A.; SORKIN, E. Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. **Journal of Immunology**, v. 126, n. 1, p. 385–387, 1981.

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

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

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; KELLER, M.; MÜLLER, J. Changes in blood hormone levels during the immune response. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 150, n. 2, p. 466–470, 1975.

BEUTLER, B. A.; MILSARK, I. W.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. **Journal of Immunology**, v. 135, n. 6, p. 3972–3977, 1985.

BHATIA, M.; MOOCHHALA, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. **The Journal of Pathology**, v. 202, n. 2, p. 145–156, 2004.

BISOGNO, T.; LIGRESTI, A.; DI MARZO, V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 81, n. 2, p. 224–238, 2005.

BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W. Sepsis and cytokines: current status. **British Journal of Anaesthesia**, v. 77, n. 1, p. 110–117, 1996.

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. The syntax of immune-neuroendocrine communication. **Immunology Today**, v. 15, n. 11, p. 504–511, 1994.

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

BLUTHÉ, R. M.; CRESTANI, F.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Mechanisms of the behavioral effects of interleukin 1. Role of prostaglandins and CRF. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 650, p. 268–275, 1992.

BRASIER, A. R.; ZHAO, Y. Measurement of the innate immune response in the airway. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 795, p. 233–254, 2014.

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

BRIGHAM, K. L.; MEYRICK, B. Endotoxin and lung injury. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 133, n. 5, p. 913–927, 1986.

BRUN-BUISSON, C.; MINELLI, C.; BERTOLINI, G.; BRAZZI, L.; PIMENTEL, J.; LEWANDOWSKI, K.; BION J.; ROMAND, J. A.; VILLAR, J.; THORSTEINSSON, A.; DAMAS, P.; ARMAGANIDIS, A.; LEMAIRE, F. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. **Intensive Care Medicine**, v. 30, n. 1, p. 51–61, 2004.

BUSQUETS-GARCIA, A.; PUIGHERMANAL, E.; PASTOR, A.; TORRE, R.; MALDONADO, R.; OZAITA, A. Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 5, p. 479–486, 2011.

CABRAL, G. A.; GRIFFIN-THOMAS, L. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. **Expert Reviews In Molecular Medicine**, v. 11, p. e3, 2009. Disponível em: <[http://www.biologicalpsychiatryjournal.com/article/S0006-3223\(11\)00440-9/fulltext](http://www.biologicalpsychiatryjournal.com/article/S0006-3223(11)00440-9/fulltext)>. Acesso em: 10 out. 2014.

CAMPORA, L.; MIRAGLIOTTA, V.; RICCI, E.; CRISTINO, L.; DI MARZO, V.; ALBANESE, F.; VALLE, M. F. D.; ABRAMO, F. Cannabinoid receptor type 1 and 2 expression in the skin of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. **American Journal Of Veterinary Research**, v. 73, n. 7, p. 988–995, 2012.

CANETTI, C.; SILVA, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Tumour necrosis factor- α and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **British Journal Of Pharmacology**, v. 134, n. 8, p. 1619–1628, 2001.

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 9, p. 3666–3670, 1975.

CASSATELLA, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology Today**, v. 16, n. 1, p. 21–26, 1995.

CATANIA, R. A.; CHAUDRY, I. H. Immunological consequences of trauma and shock. **Annals of the Academy of Medicine, Singapore**, v. 28, n. 1, p. 120–132, 1999.

CHOUINARD, F.; LEFEBVRE, J. S.; NAVARRO, P.; BOUCHARD, L.; FERLAND, C.; LALANCETTE-HÉBERT, M.; MARSOLAIS, D.; LAVIOLETTE, M.; FLAMAND, N. The endocannabinoid 2-arachidonoyl-glycerol activates human neutrophils: critical role of its hydrolysis and de novo leukotriene B4 biosynthesis. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 5, p. 3188–3196, 2011.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 267, n. 9, p. 1244–1252, 1992.

COLLART, M. A.; BAEUERLE, P.; VASSALLI, P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 4, p. 1498–1506, 1990.

COMELLI, F.; GIAGNONI, G.; BETTONI, I.; COLLEONI, M.; COSTA, B. The inhibition of monoacylglycerol lipase by URB602 showed an anti-inflammatory and anti-nociceptive effect in a murine model of acute inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 5, p. 787–794, 2007.

CONTI, S.; COSTA, B.; COLLEONI, M.; PAROLARO, D.; GIAGNONI, G. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 1, p. 181–187, 2002.

COSTA-PINTO, F. A.; COHN, D. W. H.; SA-ROCHA, V. M.; SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Behavior: a relevant tool for brain-immune system interaction studies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1153, p. 107–119, 2009.

COSTA-PINTO, F. A.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmune interactions in stress. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 3, p. 196–199, 2010.

COSTOLA-DE-SOUZA, C.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; CALEFI, A. S.; ALOIA, T. P. A.; GIMENES-JÚNIOR, J. A.; ALMEIDA, V. I.; PINHEIRO, M. L.; PALERMO-NETO, J. Monoacylglycerol Lipase (MAGL) Inhibition Attenuates Acute Lung Injury in Mice. **PloS One**, v. 8, n. 10, p. e77706, 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0077706>>. Acesso em: 10 out. 2014.

COTA, D.; MARSICANO, G.; TSCHÖP, M.; GRÜBLER, Y.; FLACHSKAMM, C.; SCHUBERT, M.; AUER, D.; YASSOURIDIS, A.; THÖNE-REINEKE, C.; ORTMANN, S.; TOMASSONI, F.; CERVINO, C.; NISOLI, E.; LINTHORST, A. C.; PASQUALI,

R.; LUTZ, B.; STALLA, G. K.; PAGOTTO, U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 3, p. 423–431, 2003.

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.

D'ALESSIO, F. R.; TSUSHIMA, K.; AGGARWAL, N. R.; WEST, E. E.; WILLETT, M. H.; BRITOS, M. F.; PIPELING, M. R.; BROWER, R. G.; TUDER, R. M.; MCDYER, J. F.; KING, L. S. CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 10, p. 2898–2913, 2009.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 933, p. 222–234, 2001.

DANUSER, B.; REBSAMEN, H.; WEBER, C.; KRUEGER, H. Lipopolysaccharide-induced nasal cytokine response: a dose–response evaluation. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 257, n. 10, p. 527–532, 2000.

DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H. O. Sympathetic nervous system-immune interactions in autoimmune lymphoproliferative diseases. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 1, p. 29–36, 2008.

DEL REY, A.; RANDOLF, A.; PITOSI, F.; ROGAUSCH, H.; BESEDOVSKY, H. O. Not all peripheral immune stimuli that activate the HPA axis induce proinflammatory cytokine gene expression in the hypothalamus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, p. 169–174, 2000.

DENG, L.; WANG, C.; SPENCER, E.; YANG, L.; BRAUN, A.; YOU, J.; SLAUGHTER, C.; PICKART, C.; CHEN, Z. J. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 351–361, 2000.

DEVANE, W. A.; DYSARZ, F. A.; 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.

DI MARZO, V.; BIFULCO, M.; DE PETROCELLIS, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 771–784, 2004.

DI MARZO, V.; BISOGNO, T.; SUGIURA, T.; MELCK, D.; DE PETROCELLIS, L. The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal-

and basophil-like cells: connections with anandamide. **The Biochemical Journal**, v. 331, Pt 1, p. 15–19, 1998.

DINARELLO, C. A. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 5, p. 1203–1217, 2011.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095–2147, 1996.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503–508, 2000.

DOYLE, S. L.; O'NEILL, L. A. J. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1102–1113, 2006.

DRISCOLL, K. E.; HASSENBEIN, D. G.; HOWARD, B. W.; ISFORT, R. J.; CODY, D.; TINDAL, M. H.; SUCHANEK, M.; CARTER, J. M. Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 58, n. 3, p. 359–364, 1995.

DUNN, A. J.; WANG, J. Cytokine effects on CNS biogenic amines. **Neuroimmunomodulation**, v. 2, n. 6, p. 319–328, 1995.

DUSHIANTHAN, A.; GROCCOTT, M. P. W.; POSTLE, A. D.; CUSACK, R. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. **Postgraduate Medical Journal**, v. 87, n. 1031, p. 612–622, 2011.

ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Stress, cytokine patterns and susceptibility to disease. **Baillière's Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 13, n. 4, p. 583–595, 1999.

ENGEL, M. A.; KELLERMANN, C. A.; BURNAT, G.; HAHN, E. G.; RAU, T.; KONTUREK, P. C. Mice lacking cannabinoid CB1-, CB2-receptors or both receptors show increased susceptibility to trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis. **Journal of Physiology and Pharmacology: an Official Journal of the Polish Physiological Society**, v. 61, n. 1, p. 89–97, 2010.

FACCIOLI, L. H.; SOUZA, G. E.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents and Actions**, v. 30, n. 3-4, p. 344–349, 1990.

FAFFE, D. S.; SEIDL, V. R.; CHAGAS, P. S.; GONÇALVES DE MORAES, V. L.; CAPELOZZI, V. L.; ROCCO, P. R.; ZIN, W. A. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. **The European Respiratory Journal**, v. 15, n. 1, p. 85–91, 2000.

FALLER, S.; FOECKLER, M.; STROSING, K. M.; SPASSOV, S.; RYTER, S. W.; BUERKLE, H.; LOOP, T.; SCHMIDT, R.; HOETZEL, A. Kinetic effects of carbon

monoxide inhalation on tissue protection in ventilator-induced lung injury. **Laboratory Investigation**, v. 92, n. 7, p. 999–1012, 2012b.

FALLER, S.; ZIMMERMANN, K. K.; STROSING, K. M.; ENGELSTAEDTER, H.; BUERKLE, H.; SCHMIDT, R.; SPASSOV, S. G.; HOETZEL, A. Inhaled hydrogen sulfide protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Medical Gas Research**, v. 2, n. 1, p. 26, 2012a.

FELSZEGHY, K.; GÁSPÁR, E.; NYAKAS, C. Long-term selective down-regulation of brain glucocorticoid receptors after neonatal dexamethasone treatment in rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 8, n. 7, p. 493–499, 1996.

FIALKOW, L.; VIEIRA, S. R. R.; FERNANDES, A. K.; SILVA, D. R.; BOZZETTI, M. C. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome at the intensive care unit of a general university hospital in Brazil. An epidemiological study using the American-European Consensus Criteria. **Intensive Care Medicine**, v. 28, n. 11, p. 1644–1648, 2002.

FLÓRIO, J. C.; SAKATE, M.; PALERMO-NETO, J. Effects of amitraz on motor function. **Pharmacology & Toxicology**, v. 73, n. 2, p. 109–114, 1993.

FONSECA, E. S. M.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. **Physiology & Behavior**, v. 77, n. 2-3, p. 205–215, nov. 2002.

FONSECA, E. S. M.; SAKAI, M.; CARVALHO-FREITAS, M. I. R.; PALERMO NETO, J. Naloxone treatment prevents prenatal stress effects on peritoneal macrophage activity in mice offspring. **Neuroendocrinology**, v. 81, n. 5, p. 322–328, 2005.

FRANCHIMONT, D.; GALON, J.; GADINA, M.; VISCONTI, R.; ZHOU, Y.; ARINGER, M.; FRUCHT, D. M.; CHROUSOS, G. P.; O'SHEA, J. J. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 4, p. 1768–1774, 2000.

FRIEDMAN, E. M.; IRWIN, M. R. Modulation of immune cell function by the autonomic nervous system. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 74, n. 1, p. 27–38, 1997.

FRUSSA-FILHO, R.; PALERMO-NETO, J. Effects of single and long-term administration of sulpiride on open-field and stereotyped behavior of rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 23, n. 5, p. 463–472, 1990.

FRUSSA-FILHO, R.; PALERMO-NETO, J. Effects of single and long-term droperidol administration on open-field and stereotyped behavior of rats. **Physiology & Behavior**, v. 50, n. 4, p. 825–830, 1991.

FRUSSA-FILHO, R.; PALERMO-NETO, J. Effects of single and long-term metoclopramide administration on open field and stereotyped behavior of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 323–329, 1988.

FUKUDA, H.; ABE, T.; YOSHIHARA, S. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 inhibits antigen-induced plasma extravasation in guinea pig airways. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 152, n. 3, p. 295–300, 2010.

GADEK-MICHALSKA, A.; TADEUSZ, J.; RACHWALSKA, P.; BUGAJSKI, J. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 6, p. 1655–1662, 2013.

GALANOS, C.; LEHMANN, V.; LÜDERITZ, O.; RIETSCHER, E. T.; WESTPHAL, O.; BRADE, H.; BRADE, L.; FREUDENBERG, M. A.; HANSEN-HAGGE, T.; LÜDERITZ, T. Endotoxic properties of chemically synthesized lipid A part structures. Comparison of synthetic lipid A precursor and synthetic analogues with biosynthetic lipid A precursor and free lipid A. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 140, n. 2, p. 221–227, 1984.

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

GAMALEDDIN, I.; ZVONOK, A.; MAKRIYANNIS, A.; GOLDBERG, S. R.; FOLL, B. L. Effects of a selective cannabinoid CB2 agonist and antagonist on intravenous nicotine self administration and reinstatement of nicotine seeking. **PloS One**, v. 7, n. 1, p. e29900, 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0029900>>. Acesso em 10 out. 2014.

GATTI, S.; BARTFAI, T. Induction of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6. **Brain Research**, v. 624, n. 1-2, p. 291–294, 1993.

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

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

GOLDBLUM, S. E.; WU, K. M.; JAY, M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. **Journal of Applied Physiology**, v. 59, n. 6, p. 1978–1985, 1985.

GOLDSTEIN, D. S.; MCEWEN, B. Allostasis, homeostats, and the nature of stress. **Stress**, v. 5, n. 1, p. 55–58, 2002.

GONSIOREK, W.; LUNN, C.; FAN, X.; NARULA, S.; LUNDELL, D.; HIPKIN, R. W. Endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol is a full agonist through human type 2

cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. **Molecular Pharmacology**, v. 57, n. 5, p. 1045–1050, 2000.

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. **Research in Immunology**, v. 149, n. 7-8, p. 685–688, 1998.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 3-4, p. 293–307, 2011.

HAMACHER, J.; LUCAS, R.; LIJNEN, H. R.; BUSCHKE, S.; DUNANT, Y.; WENDEL, A.; GRAU, G. E.; SUTER, P. M.; RICOU, B. Tumor necrosis factor-alpha and angiostatin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory distress syndrome. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, v. 166, n. 5, p. 651–656, 2002.

HARANT, H.; MARTIN, R.; ANDREW, P. J.; FOGAR, E.; DITTRICH, C.; LINDLEY, I. J. Synergistic activation of interleukin-8 gene transcription by all-trans-retinoic acid and tumor necrosis factor-alpha involves the transcription factor NF-kappaB. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 43, p. 26954–26961, 1996.

HASHIMOTODANI, Y.; OHNO-SHOSAKU, T.; KANO, M. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. **The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology And Psychiatry**, v. 13, n. 2, p. 127–137, 2007.

HEDRICH, C. M.; BREM, J. H. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. **Immunologic Research**, v. 47, n. 1-3, p. 185–206, 2010.

HEEG, K.; DALPKE, A. TLR-induced negative regulatory circuits: role of suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins in innate immunity. **Vaccine**, v. 21, p. S61–S67, 2003. Supplement, 2.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; 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 : The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 563–83, 1991.

HITCHCOCK, P. J.; LEIVE, L.; MÄKELÄ, P. H.; RIETSCHEL, E. T.; STRITTMATTER, W.; MORRISON, D. C. Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future. **Journal of Bacteriology**, v. 166, n. 3, p. 699–705, 1986.

HUDSON, L. D.; MILBERG, J. A.; ANARDI, D.; MAUNDER, R. J. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 151, n. 2 Pt 1, p. 293–301, 1995.

IVASHKIV, L. B. Inflammatory signaling in macrophages: transitions from acute to tolerant and alternative activation states. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 9, p. 2477–2481, 2011.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197–216, 2002.

JOSENS, P. G.; ROSSENEU, M.; DEVREESE, A. M.; BULT, H.; MARESCAU, B.; HERMAN, A. G. Diminished capacity to release metabolites of nitric oxide synthase in macrophages loaded with oxidized low-density lipoproteins. **European Journal of Pharmacology**, v. 212, n. 1, p. 113–115, 1992.

JØRGENSEN, H.; KNIGGE, U.; KJAER, A.; MØLLER, M.; WARBERG, J. Serotonergic stimulation of corticotropin-releasing hormone and pro-opiomelanocortin gene expression. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 14, n. 10, p. 788–795, 2002.

JURUENA, M. F.; CLEARE, A. J.; PARIANTE, C. M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. 3, p. 189–201, 2004.

KARLSSON, M.; CONTRERAS, J. A.; HELLMAN, U.; TORNQVIST, H.; HOLM, C. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 43, p. 27218–27223, 1997.

KASS, J. D.; FRIEDMAN, R.; LESERMAN, J.; CAUDILL, M.; ZUTTERMEISTER, P. C.; BENSON, H. An Inventory of Positive Psychological Attitudes with potential relevance to health outcomes: validation and preliminary testing. **Behavioral Medicine**, v. 17, n. 3, p. 121–129, 1991.

KAWAI, T.; ADACHI, O.; OGAWA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity**, v. 11, n. 1, p. 115–122, 1999.

KAWAKAMI, M.; CERAMI, A. Studies of endotoxin-Induced Decrease In Lipoprotein Lipase Activity. **The Journal Of experimental medicine**, v. 154, n. 3, p. 631–639, 1981.

KELLER, S. E.; WEISS, J. M.; SCHLEIFER, S. J.; MILLER, N. E.; STEIN, M. Stress-induced suppression of immunity in adrenalectomized rats. **Science**, v. 221, n. 4617, p. 1301–1304, 1983.

KIM, H. J.; HAWKE, N.; BALDWIN, A. S. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 5, p. 738–747, 2006.

KIM, K.; KIM, W.; RHEE, J. E.; JO, Y. H.; LEE, J. H.; KIM, K. S.; KWON, W. Y.; SUH, G. J.; LEE, C. C.; SINGER, A. J. Induced hypothermia attenuates the acute lung injury in hemorrhagic shock. **The Journal of Trauma**, v. 68, n. 2, p. 373–381, 2010.

KINSEY, S. G.; NOMURA, D. K.; O'NEAL, S. T.; LONG, J. Z.; MAHADEVAN, A.; CRAVATT, B. F.; GRIDER, J. R.; LICHTMAN, A. H. Inhibition of monoacylglycerol lipase attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric hemorrhages in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 338, n. 3, p. 795–802, 2011.

KIRSTEN, T. B.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; CHAIBLE, L. M.; SILVA, A. C.; MARTINS, D. O.; BRITTO, L. R. G.; DAGLI, M. L. Z.; TORRÃO, A. S.; PALERMO-NETO, J.; BERNARDI, M. M. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. **Journal of neuroscience research**, v. 90, n. 10, p. 1903–1912, 2012.

KIRSTEN, T. B.; TARICANO, M.; FLÓRIO, J. C.; PALERMO-NETO, J.; BERNARDI, M. M. Prenatal lipopolysaccharide reduces motor activity after an immune challenge in adult male offspring. **Behavioural Brain Research**, v. 211, n. 1, p. 77–82, 2010.

KISHIMOTO, T. K.; JUTILA, M. A.; BERG, E. L.; BUTCHER, E. C. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. **Science**, v. 245, n. 4923, p. 1238–41, 1989b.

KISHIMOTO, T. K.; LARSON, R. S.; CORBI, A. L.; DUSTIN, M. L.; STAUNTON, D. E.; SPRINGER, T. A. The leukocyte integrins. **Advances in Immunology**, v. 46, p. 149–182, 1989a.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 5, p. 598–625, 2005.

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.

KLEINERT, H.; EUCHENHOFER, C.; IHRIG-BIEDERT, I.; FÖRSTERMANN, U. In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF-kappaB. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 11, p. 6039–6044, 1996.

KOHM, A. P.; SANDERS, V. M. Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. **Immunology Today**, v. 21, n. 11, p. 539–542, 2000.

KOLAHIAN, S.; SHAHBAZFAR, A. A.; TAYEFI-NASRABADI, H.; KEYHANMANESH, R.; ANSARIN, K.; GHASEMI, H.; RASHIDI, A. H.; GOSENS, R.; HANIFEH, M. Tiotropium effects on airway inflammatory events in the cat as an animal model for acute cigarette smoke-induced lung inflammation. **Experimental Lung Research**, 2014.

KOLLS, J. K.; KHADER, S. A. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 6, p. 443–448, 2010.

KOTANI, S.; TAKADA, H.; TSUJIMOTO, M.; OGAWA, T.; TAKAHASHI, I.; IKEDA, T.; OTSUKA, K.; SHIMAUCHI, H.; KASAI, N.; MASHIMO, J. Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from an Escherichia coli re-mutant. **Infection and Immunity**, v. 49, n. 1, p. 225–237, 1985.

KOVACH, M. A.; STANDIFORD, T. J. The function of neutrophils in sepsis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, n. 3, p. 321–327, 2012.

KSONTINI, R.; MACKAY, S. L.; MOLDAWER, L. L. Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation. **Archives of Surgery**, v. 133, n. 5, p. 558–567, 1998.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition in the innate immune response. **The Biochemical Journal**, v. 420, n. 1, p. 1–16, 2009.

LAING, K. J.; SECOMBES, C. J. Chemokines. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, n. 5, p. 443–460, 2004.

LANDFIELD, P. W.; APPLGATE, M. D.; SCHMITZER-OSBORNE, S. E.; NAYLOR, C. E. Phosphate/calcium alterations in the first stages of Alzheimer's disease: implications for etiology and pathogenesis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 106, n. 2, p. 221–229, 1991.

LANGER, H. F.; CHAVAKIS, T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 7, p. 1211–1220, 2009.

LARSSON, K. A.; EKLUND, A. G.; HANSSON, L. O.; ISAKSSON, B. M. MALMBERG, P. O. Swine dust causes intense airways inflammation in healthy subjects. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 150, n. 4, p. 973–977, 1994.

LAYÉ, S.; PARNET, P.; GOUJON, E.; DANTZER, R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. **Molecular Brain Research**, v. 27, n. 1, p. 157–162, 1994.

LEE, J. I.; BURCKART, G. J. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 981–993, 1998.

LEE, W. L.; DOWNEY, G. P. Neutrophil activation and acute lung injury. **Current Opinion in Critical Care**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2001.

LESER, H. G.; GROSS, V.; SCHEIBENBOGEN, C.; HEINISCH, A.; SALM, R.; LAUSEN, M.; RÜCKAUER, K.; ANDREESSEN, R.; FARTHMAN, E. H.; SCHÖLMERICH, J. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 101, n. 3, p. 782–785, 1991.

LEVAN, T. D.; BLOOM, J. W.; BAILEY, T. J.; KARP, C. L.; HALONEN, M.; MARTINEZ, F. D.; VERCELLI, D. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 10, p. 5838–5844, 2001.

LEWANDOWSKI, K.; LEWANDOWSKI, M. Epidemiology of ARDS. **Minerva Anestesiologica**, v. 72, n. 6, p. 473–477, 2006.

LICHTMAN, A. H.; FISHER, J.; MARTIN, B. R. Precipitated cannabinoid withdrawal is reversed by Delta(9)-tetrahydrocannabinol or clonidine. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 69, n. 1-2, p. 181–188, 2001.

LIEDTKE, C.; TRAUTWEIN, C. The role of TNF and Fas dependent signaling in animal models of inflammatory liver injury and liver cancer. **European Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 6-7, p. 582–589, 2012.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180–185, 1987.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LONG, J. Z.; LI, W.; BOOKER, L.; BURSTON, J. J.; KINSEY, S. G.; SCHLOSBERG, J. E.; PAVÓN, F. J.; SERRANO, A. M.; SELLEY, D. E.; PARSONS, L. H.; LICHTMAN, A. H.; CRAVATT, B. F. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 1, p. 37–44, 2009.

LONG, J. Z.; NOMURA, D. K.; CRAVATT, B. F. Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism. **Chemistry & Biology**, v. 16, n. 7, p. 744–753, 2009.

LOONEY, M. R.; ROUBINIAN, N.; GAJIC, O.; GROPPER, M. A.; HUBMAYR, R. D.; LOWELL, C. A.; BACCHETTI, P.; WILSON, G.; KOENIGSBERG, M.; LEE, D. C.; WU, P.; GRIMES, B.; NORRIS, P. J.; MURPHY, E. L.; GANDHI, M. J.; WINTERS, J. L.; MAIR, D. C.; SCHULLER, R. M.; HIRSCHLER, N. V.; ROSEN, R. S.; MATTHAY, M. A.; TOY, P. Prospective Study on the Clinical Course and Outcomes in Transfusion-Related Acute Lung Injury. **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 7, p. 1676–1687, 2014.

LUPIEN, S. J.; MCEWEN, B. S. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. **Brain Research Reviews**, v. 24, n. 1, p. 1–27, 1997.

LUSTER, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 7, p. 436–445, 1998.

LUSTIG, S.; DANENBERG, H. D.; KAFRI, Y.; KOBILER, D.; BEN-NATHAN, D. Viral neuroinvasion and encephalitis induced by lipopolysaccharide and its mediators. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 3, p. 707–712, 1992.

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. Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons. **Neuroscience Letters**, v. 148, n. 1-2, p. 173–176, 1992.

MALLAT, Z.; BESNARD, S.; DURIEZ, M.; DELEUZE, V.; EMMANUEL, F.; BUREAU, M. F.; SOUBRIER, F.; ESPOSITO, B.; DUEZ, H.; FIEVET, C.; STAELS, B.; DUVERGER, N.; SCHERMAN, D.; TEDGUI, A. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 85, n. 8, p. e17–24, 1999. Disponível em: < <http://circres.ahajournals.org/content/85/8/e17.long>>. Acesso em: 10 out. 2014.

MASSI, P.; FUZIO, D.; VIGANÒ, D.; SACERDOTE, P.; PAROLARO, D. Relative involvement of cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors in the Delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced inhibition of natural killer activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 3, p. 343–347, 2000.

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

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **American journal of physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 295, n. 3, p. L379–399, 2008.

MAURER, M.; VON STEBUT, E. Macrophage inflammatory protein-1. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 10, p. 1882–1886, 2004.

MCEWEN, B. S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, p. 33–44, 1998.

MCEWEN, B. S.; BIRON, C. A.; BRUNSON, K. W.; BULLOCH, K.; CHAMBERS, W. H.; DHABHAR, F. S.; GOLDFARB, R. H.; KITSON, R. P.; MILLER, A. H.; SPENCER, R. L.; WEISS, J. M. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. **Brain Research. Brain Research Reviews**, v. 23, n. 1-2, p. 79–133, 1997.

MCEWEN, B. S.; SAPOLSKY, R. M. Stress and cognitive function. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 5, n. 2, p. 205–216, 1995.

MCEWEN, B. S.; STELLAR, E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 153, n. 18, p. 2093–2101, 1993.

MCHUGH, D.; TANNER, C.; MECHOULAM, R.; PERTWEE, R. G.; ROSS, R. A. Inhibition of human neutrophil chemotaxis by endogenous cannabinoids and phytocannabinoids: evidence for a site distinct from CB1 and CB2. **Molecular Pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 441–450, 2008.

MECHOULAM, R.; BEN-SHABAT, S.; HANUS, L.; LIGUMSKY, M.; KAMINSKI, N. E.; SCHATZ, A. R.; GOPHER, A.; ALMOG, S.; MARTIN, B. R.; COMPTON, D. R.; 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.

MINAMI, M.; KURAISHI, Y.; YAMAGUCHI, T.; NAKAI, S.; HIRAI, Y.; SATOH, M. Immobilization stress induces interleukin-1 beta mRNA in the rat hypothalamus. **Neuroscience Letters**, v. 123, n. 2, p. 254–256, 1991.

MIYAN, J. A.; BROOME, C. S.; AFAN, A. M. Coordinated host defense through an integration of the neural, immune and haemopoietic systems. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 297–304, 1998.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 240–273, 2009.

MORGADO, I. The psychobiology of learning and memory: fundamentals and recent advances. **Revista de Neurologia**, v. 40, n. 5, p. 289–297, 2005.

MOSER, B.; WOLF, M.; WALZ, A.; LOETSCHER, P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 2, p. 75–84, 2004.

MUL, F. P.; ZUURBIER, A. E.; JANSSEN, H.; CALAFAT, J.; WETERING, S. V.; HIEMSTRA, P. S.; ROOS, D.; HORDIJK, P. L. Sequential migration of neutrophils across monolayers of endothelial and epithelial cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 68, n. 4, p. 529–537, 2000.

MUNCK, A.; GUYRE, P. M.; HOLBROOK, N. J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 1, p. 25–44, 1984.

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.

NEWSHOLME, P.; CURI, R.; PITHON CURI, T. C.; MURPHY, C. J.; GARCIA, C.; PIRES DE MELO, M. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, n. 6, p. 316–324, 1999.

NICOD, L. P. Cytokines. 1. Overview. **Thorax**, v. 48, n. 6, p. 660–667, 1993.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nature Reviews. Immunology**, v. 7, n. 6, p. 425–458, 2007.

OKA, S.; WAKUI, J.; IKEDA, S.; YANAGIMOTO, S.; KISHIMOTO, S.; GOKOH, M.; NASUI, M.; SUGIURA, T. Involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in oxazolone-induced contact dermatitis in mice. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 12, p. 8796–8805, 2006.

OLIVEIRA, R. H. R.; BASILLE FILHO, A. Incidence of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in the intensive care unit of a university hospital: a prospective study. **Jornal Brasileiro De Pneumologia : Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 32, n. 1, p. 35–42, 2006.

OPDENAKKER, G.; FIBBE, W. E.; VAN DAMME, J. The molecular basis of leukocytosis. **Immunology Today**, v. 19, n. 4, p. 182–189, 1998.

PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 4, p. 502–548, 2001.

PAINE, T. F. Illness in man following inhalation of *Serratia marcescens*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 79, n. 3, p. 226–232, 1996.

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.; DE OLIVEIRA MASSOCO, C.; ROBESPIERRE DE SOUZA, W. 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.

PEDRUZZI, L. M.; STOCKLER-PINTO, M. B.; LEITE, M.; MAFRA, D. Nrf2-keap1 system versus NF- κ B: the good and the evil in chronic kidney disease? **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2461–2466, 2012.

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.

PIAZZA, P. V.; LE MOAL, M. Glucocorticoids as a biological substrate of reward: physiological and pathophysiological implications. **Brain Research Reviews**, v. 25, n. 3, p. 359–372, 1997.

PITOSI, F.; DEL REY, A.; KABIERSCH, A.; BESEDOVSKY, H. Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. **Journal of Neuroscience Research**, v. 48, n. 4, p. 287–298, 1997.

PLIYEV, B. K. Chemotactically active proteins of neutrophils. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 73, n. 9, p. 970–984, 2008.

PLOTSKY, P. M.; CUNNINGHAM, E. T.; WIDMAIER, E. P. Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. **Endocrine Reviews**, v. 10, n. 4, p. 437–458, 1989.

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

REMICK, D. G.; BOLGOS, G.; COPELAND, S.; SIDDIQUI, J. Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 5, p. 2751–2757, 2005.

REUTERSHAN, J.; LEY, K. Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. **Critical care**, v. 8, n. 6, p. 453–461, 2004.

RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; VITORETTI, L. B.; MARIANO-SOUZA, D. P.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; AKAMINE, A. T.; ALMEIDA, V. I.; QUEVEDO, J.; DAL-PIZZOL, F.; HALLAK, J. E.; ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A.; PALERMO-NETO, J. Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 678, n. 1-3, p. 78–85, 2012.

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.

RINCON, M.; IRVIN, C. G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 9, p. 1281–1290, 2012.

RIOS-SANTOS, F.; BENJAMIM, C. F.; ZAVERY, D.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. A critical role of leukotriene B4 in neutrophil migration to infectious focus in cecal ligation and puncture sepsis. **Shock**, v. 19, n. 1, p. 61–65, 2003.

RITTER, S.; WATTS, A. G.; DINH, T. T.; SANCHEZ-WATTS, G.; PEDROW, C. Immunotoxin lesion of hypothalamically projecting norepinephrine and epinephrine neurons differentially affects circadian and stressor-stimulated corticosterone secretion. **Endocrinology**, v. 144, n. 4, p. 1357–1367, 2003.

RIVIER, C.; VALE, W. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. **Nature**, v. 305, n. 5932, p. 325–327, 1983.

ROCCO, P. R. M.; PELOSI, P. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: myth or reality? **Current Opinion In Critical Care**, v. 14, n. 1, p. 50–55, 2008.

ROCHON, Y. P.; FROJMOVIC, M. M. A model for the recruitment of neutrophils at sites of inflammation. Physiological relevance of in vivo neutrophil aggregation. **Medical Hypotheses**, v. 38, n. 2, p. 132–138, 1992.

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

ROOZENDAAL, B. 1999 Curt P. Richter award. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 25, n. 3, p. 213–238, 2000.

ROTHWELL, N. J.; HOPKINS, S. J. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 3, p. 130–136, 1995.

RYLANDER, R.; BAKE, B.; FISCHER, J. J.; HELANDER, I. M. Pulmonary function and symptoms after inhalation of endotoxin. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 140, n. 4, p. 981–986, 1989.

SÁ-ROCHA, V. M.; SÁ-ROCHA, L. C.; 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.; MASSI, P.; PANERAI, A. E.; PAROLARO, D. In vivo and in vitro treatment with the synthetic cannabinoid CP55, 940 decreases the in vitro migration of macrophages in the rat: involvement of both CB1 and CB2 receptors. **Journal of Neuroimmunology**, v. 109, n. 2, p. 155–163, 2000.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 10, p. 452–460, 2011.

SANCÉAU, J.; KAISHO, T.; HIRANO, T.; WIETZERBIN, J. Triggering of the human interleukin-6 gene by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in monocytic cells involves cooperation between interferon regulatory factor-1, NF kappa B, and Sp1 transcription factors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 46, p. 27920–27931, 1995.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, 2000.

SAVINAINEN, J. R.; JÄRVINEN, T.; LAINE, K.; LAITINEN, J. T. Despite substantial degradation, 2-arachidonoylglycerol is a potent full efficacy agonist mediating CB(1) receptor-dependent G-protein activation in rat cerebellar membranes. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 3, p. 664–672, 2001.

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

SCHLOSBERG, J. E.; CARLSON, B. L. A.; RAMESH, D.; ABDULLAH, R. A.; LONG, J. Z.; CRAVATT, B. F.; LICHTMAN, A. H. Inhibitors of endocannabinoid-metabolizing enzymes reduce precipitated withdrawal responses in THC-dependent mice. **The AAPS Journal**, v. 11, n. 2, p. 342–52, 2009.

SCHOENHAUT, D. S.; CHUA, A. O.; WOLITZKY, A. G.; QUINN, P. M.; DWYER, C. M.; MCCOMAS, W.; FAMILLETTI, P. C.; GATELY, M. K.; GUBLER, U. Cloning and expression of murine IL-12. **Journal of Immunology**, v. 148, n. 11, p. 3433–3440, 1992.

SCHÜTTE, H.; LOHMEYER, J.; ROSSEAU, S.; ZIEGLER, S.; SIEBERT, C.; KIELISCH, H.; PRALLE, H.; GRIMMINGER, F.; MORR, H.; SEEGER, W. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. **The European Respiratory Journal**, v. 9, n. 9, p. 1858–1867, 1996.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 197–223, 2005.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 10, n. 2, p. 230–231, 1998.

SHEVACH, E. M. Elimination of specific immunoreactive T lymphocytes with 5-bromodeoxyuridine and light. **Methods in Enzymology**, v. 108, p. 262–270, 1984.

SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H.; NAGAI, Y.; FUKUDOME, K.; MIYAKE, K.; KIMOTO, M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 11, p. 1777–1782, 1999.

SHIMIZU, M.; HASEGAWA, N.; NISHIMURA, T.; ENDO, Y.; SHIRAISHI, Y.; YAMASAWA, W.; KOH, H.; TASAKA, S.; SHIMADA, H.; NAKANO, Y.; FUJISHIMA, S.; YAMAGUCHI, K.; ISHIZAKA, A. Effects of TNF-alpha-converting enzyme inhibition on acute lung injury induced by endotoxin in the rat. **Shock**, v. 32, n. 5, p. 535–540, 2009.

SICA, A.; WANG, J. M.; COLOTTA, F.; DEJANA, E.; MANTOVANI, A.; OPPENHEIM, J. J.; LARSEN, C. G.; ZACHARIAE, C. O.; MATSUSHIMA, K. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 8, p. 3034–3038, 1990.

SIMON, S. I.; CHAMBERS, J. D.; BUTCHER, E.; SKLAR, L. A. Neutrophil aggregation is beta 2-integrin- and L-selectin-dependent in blood and isolated cells. **Journal of Immunology**, v. 149, n. 8, p. 2765–2771, 1992.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 10, n. 2, p. 89–102, 2010.

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.

SMITH, S. R.; DENHARDT, G.; TERMINELLI, C. The anti-inflammatory activities of cannabinoid receptor ligands in mouse peritonitis models. **European Journal of Pharmacology**, v. 432, n. 1, p. 107–119, 2001.

SMITH, S. R.; TERMINELLI, C.; DENHARDT, G. Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-

inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 293, n. 1, p. 136–150, 2000.

SMITH, S. R.; TERMINELLI, C.; DENHARDT, G. Modulation of cytokine responses in *Corynebacterium parvum*-primed endotoxemic mice by centrally administered cannabinoid ligands. **European Journal of Pharmacology**, v. 425, n. 1, p. 73–83, 2001.

SPADARO, F.; DUNN, A. J. Intracerebroventricular administration of interleukin-1 to mice alters investigation of stimuli in a novel environment. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 4, n. 4, p. 308–322, 1990.

STANKEVICIUS, D.; RODRIGUES-COSTA, E. C.; CAMILO FLÓRIO, J.; PALERMONETO, J. Neuroendocrine, behavioral and macrophage activity changes induced by picrotoxin effects in mice. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 2, p. 300–308, 2008.

STELLA, N.; SCHWEITZER, P.; PIOMELLI, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. **Nature**, v. 388, n. 6644, p. 773–778, 1997.

STEVENS-FELTEN, S. Y.; BELLINGER, D. L. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid organs. **Chemical Immunology**, v. 69, p. 99–131, 1997.

STORR, M. A.; KEENAN, C. M.; EMMERDINGER, D.; ZHANG, H.; YÜCE, B.; SIBAEV, A.; MASSA, F.; BUCKLEY, N. E.; LUTZ, B.; GÖKE, B.; BRAND, S.; PATEL, K. D.; SHARKEY, K. A. Targeting endocannabinoid degradation protects against experimental colitis in mice: involvement of CB1 and CB2 receptors. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, n. 8, p. 925–936, 2008.

SUGIURA, T.; KODAKA, T.; NAKANE, S.; MIYASHITA, T.; KONDO, S.; SUHARA, Y.; TAKAYAMA, H.; WAKU, K.; SEKI, C.; BABA, N.; ISHIMA, Y. Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 5, p. 2794–2801, 1999.

SUGIURA, T.; KONDO, S.; KISHIMOTO, S.; MIYASHITA, T.; NAKANE, S.; KODAKA, T.; SUHARA, Y.; TAKAYAMA, H.; WAKU, K. Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. **The Journal of BIOLOGICAL CHEMistry**, v. 275, n. 1, p. 605–612, 2000.

SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; NAKANE, S.; SHINODA, A.; ITOH, K.; YAMASHITA, A. WAKU, K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 215, n. 1, p. 89–97, 1995.

SZARKA, R. J.; WANG, N.; GORDON, L.; NATION, P. N.; SMITH, R. H. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. **Journal of Immunological Methods**, v. 202, n. 1, p. 49–57, 1997.

TAGAY, S.; HERPERTZ, S.; LANGKAFEL, M.; SENF, W. Posttraumatic stress disorder in a psychosomatic outpatient clinic. Gender effects, psychosocial functioning, sense of coherence, and service utilization. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 58, n. 5, p. 439–446, 2005.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 335–376, 2003.

TANNO, A. P.; MARCONDES, F. K. Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 3, p. 273–289, 2002.

TASAKA, S.; HASEGAWA, N.; ISHIZAKA, A. Pharmacology of acute lung injury. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 15, n. 2, p. 83–95, 2002.

THAYER, J. F.; STERNBERG, E. M. Neural aspects of immunomodulation: focus on the vagus nerve. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 8, p. 1223–1228, 2010.

TOGBE, D.; SCHNYDER-CANDRIAN, S.; SCHNYDER, B.; DOZ, E.; NOULIN, N.; JANOT, L.; SECHER, T.; GASSE, P.; LIMA, C.; COELHO, F. R.; VASSEUR, V.; ERARD, F.; RYFFEL, B.; COUILLIN, I.; MOSER, R. Toll-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, n. 6, p. 387–391, 2007.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 13, p. 251–276, 1995.

TSUSHIMA, K.; KING, L. S.; AGGARWAL, N. R.; GORORDO, A.; D'ALESSIO, F. R.; KUBO, K. Acute lung injury review. **Internal Medicine**, v. 48, n. 9, p. 621–630, 2009.

TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. L. Sprague-Dawley rats obtained from different vendors exhibit distinct adrenocorticotropin responses to inflammatory stimuli. **Neuroendocrinology**, v. 70, n. 3, p. 186–195, 1999.

VASEGHI, G.; RABBANI, M.; HAJHASHEMI, V. The CB(1) receptor antagonist, AM281, improves recognition loss induced by naloxone in morphine withdrawal mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 111, n. 3, p. 161–165, 2012.

WALKER, E.; MITTAL, V.; TESSNER, K. Stress and the hypothalamic pituitary adrenal axis in the developmental course of schizophrenia. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 4, p. 189–216, 2008.

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

WEINACKER, A. B.; VASZAR, L. T. Acute respiratory distress syndrome: physiology and new management strategies. **Annual Review of Medicine**, v. 52, p. 221–237, 2001.

- WEXLER, B. C.; DOLGIN, A. E.; TRYCZYNSKI, E. W. Effects of a bacterial polysaccharide (piromen) on the pituitary-adrenal axis: further aspects of hypophyseal-mediated control of response. **Endocrinology**, v. 61, n. 5, p. 488–499, 1957.
- WILSON, D. M.; VARVEL, S. A.; HARLOE, J. P.; MARTIN, B. R.; LICHTMAN, A. H. SR 141716 (Rimonabant) precipitates withdrawal in marijuana-dependent mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 85, n. 1, p. 105–113, 2006.
- YOSHIMURA, T.; MATSUSHIMA, K.; TANAKA, S.; ROBINSON, E. A.; APPELLA, E.; OPPENHEIM, J. J.; LEONARD, E. J. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9233–9237, 1987.
- ZAGER, A.; ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S.; PALERMO-NETO, J. Maternal Immune Activation Increases the Corticosterone Response to Acute Stress without Affecting the Hypothalamic Monoamine Content and Sleep Patterns in Male Mice Offspring. **Neuroimmunomodulation**, v. 21, n. 1, p. 37–44, 2013.
- ZARBOCK, A.; DISTASI, M. R.; SMITH, E.; SANDERS, J. M.; KRONKE, G.; HARRY, B. L.; VIETINGHOFF, S.; BUSCHER, K.; NADLER, J. L.; LEY, K. Improved survival and reduced vascular permeability by eliminating or blocking 12/15-lipoxygenase in mouse models of acute lung injury (ALI). **Journal of Immunology**, v. 183, n. 7, p. 4715–4722, 2009.
- ZHANG, S.-Y.; JOUANGUY, E.; SANCHO-SHIMIZU, V.; BERNUTH, H.; YANG, K.; ABEL, L.; PICARD, C.; PUEL, A.; CASANOVA, J. L. Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. **Immunological Reviews**, v. 220, p. 225–236, 2007.
- ZHAO, Y.; YUAN, Z.; LIU, Y.; XUE, J.; TIAN, Y.; LIU, W.; ZHANG, W.; SHEN, Y.; XU, W.; LIANG, X.; CHEN, T. Activation of cannabinoid CB2 receptor ameliorates atherosclerosis associated with suppression of adhesion molecules. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 292–298, 2010.
- ZHU, S.; WANG, J.; ZHANG, Y.; LI, V.; KONG, J.; HE, J.; LI, X. M. Unpredictable chronic mild stress induces anxiety and depression-like behaviors and inactivates AMP-activated protein kinase in mice. **Brain Research**, v. 1576, p. 81–90, 2014.

APÊNDICE A

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Monoacylglycerol Lipase (MAGL) Inhibition Attenuates Acute Lung Injury in Mice

Carolina Costola-de-Souza¹, Alison Ribeiro¹, Viviane Ferraz-de-Paula², Atilio Sersun Calefi¹, Thiago Pinheiro Arrais Aloia¹, João Antonio Gimenes-Júnior³, Vinicius Izidio de Almeida¹, Milena Lobão Pinheiro¹, João Palermo-Neto^{1*}

1 Neuroimmunomodulation research group, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Laboratory of Experimental Toxicology, Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Endocannabinoid signaling is terminated by enzymatic hydrolysis, a process that, for 2-Arachidonoylglycerol (2-AG), is mediated by monoacylglycerol lipase (MAGL). The piperidine carbamate, 4-nitrophenyl-4-(dibenzo[d][1,3]dioxol-5-yl (hydroxy) methyl) piperidine-1-carboxylate (JZL184), is a drug that inhibits MAGL and presents high potency and selectivity. Thus, JZL184 increases the levels of 2-AG, an endocannabinoid that acts on the CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors. Here, we investigated the effects of MAGL inhibition, with a single dose (16 mg/kg, intraperitoneally (i.p.)) of JZL184, in a murine model of lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury (ALI) 6, 24 and 48 hours after the inflammatory insult. Treatment with JZL184 decreased the leukocyte migration into the lungs as well as the vascular permeability measured through the bronchoalveolar lavage fluid (BAL) and histological analysis. JZL184 also reduced the cytokine and chemokine levels in the BAL and adhesion molecule expression in the blood and BAL. The CB₁ and CB₂ receptors were considered involved in the anti-inflammatory effects of JZL184 because the AM281 selective CB₁ receptor antagonist (1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-(4-morpholinyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide) and the AM630 selective CB₂ receptor antagonist ([6-iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1H-indol-3-yl](4-methoxyphenyl)-methanone) blocked the anti-inflammatory effects previously described for JZL184. It was concluded that MAGL inhibition, and consequently the increase in 2-AG levels, produced anti-inflammatory effects in a murine model of LPS-induced ALI, a finding that was considered a consequence of the activation of the CB₁ and CB₂ receptors.

Citation: Costola-de-Souza C, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Calefi AS, Aloia TPA, et al. (2013) Monoacylglycerol Lipase (MAGL) Inhibition Attenuates Acute Lung Injury in Mice. PLoS ONE 8(10): e77706. doi:10.1371/journal.pone.0077706

Editor: Marco Idzko, University Hospital Freiburg, Germany

Received: May 17, 2013; **Accepted:** September 13, 2013; **Published:** October 25, 2013

Copyright: © 2013 Costola-de-Souza et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processes: 2009/51886-3 and 2011/10181-7) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Process: 300764/2010-3). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jpalermo@usp.br

Introduction

The discovery of the CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors and their major ligands N-arachidonylethanolamide (anandamide) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) led to the characterization of the endocannabinoid system [1][2][3][4]. This system has become a subject of great interest in pharmacology due to its remarkable distribution in mammals and its capacity to play a modulating role in diverse physiological functions including immunomodulation and inflammation [5]. 2-AG and anandamide are regulated by the catabolic enzymes monoacylglycerol lipase (MAGL) [4] and fatty acid amide hydrolase (FAAH) [6], respectively.

To investigate the MAGL role in endocannabinoid metabolism and signaling *in vivo*, Long et al. (2009) [7] described in mice a potent and selective inhibitor for this enzyme termed 4-nitrophenyl-4-(dibenzo[d][1,3]dioxol-5-yl (hydroxy) methyl) piperidine-1-carboxylate (JZL184) that decreases the 2-AG hydrolysis in both the Central Nervous System (CNS) and in the peripheral tissues, including in the lungs [8]. JZL184 has also been shown to have potent immunosuppressive and anti-inflammatory properties in some rodent models of inflammation [9][10]. Employing this drug (16 mg/kg, given systemically), a remarkable variety of CB₁-dependent effects such as analgesia, hypomotility and hypothermia were shown in mice [7]. Using JZL184 (8 mg/kg i.p.), Busquets-Garcia et al. (2011) [11] highlighted the

anxiolytic effects of this drug in mice and suggested that the observed effects might have been induced by 2-AG actions on the CB₂ receptors; an antinociceptive effect related to the CB₁ and the CB₂ receptor activation has also been reported in mice [11].

Acute lung injury (ALI) and its most severe form, acute respiratory distress syndrome (ARDS) in humans, is a lung disease with an acute onset that is characterized by bilateral pulmonary infiltrates with neutrophil accumulation [12][13]. ALI has been shown to result in persistent respiratory failure and prolonged dependence on mechanical ventilation, increased susceptibility to multi-organ dysfunction and mortality [14]. Despite numerous innovations in intensive care medicine, the ALI-related mortality rate has been reported to vary by approximately 40% [14][15].

Although the search for the effects of endocannabinoids such as anandamide and 2-AG on immunity has received considerable research attention, the effects of MAGL inhibition on inflammation models are still unclear. This work was designed to investigate the potential anti-inflammatory effect of MAGL inhibition in a murine model of LPS-induced ALI using JZL184 as a pharmacological tool. Elucidating the roles of CB₁ and CB₂ cannabinoid receptor activation on JZL184 effects was also an objective of this work.

Materials and Methods

Animals

Male C57BL/6 mice from our own colony, weighing 22–28 g and approximately 60 days old, were used. The animals were housed under conditions of controlled temperature (22–26 °C) and artificial light (12-h light/12-h dark, lights on at 7:00 a.m.), with free access to rodent chow and water. The experiments were performed in a different room at the same temperature as the animal colony. The animals were transferred and maintained in their home cages 7 days before the beginning of the experiments. This study protocol was approved by the Bioethical Committee of Care and Use of Laboratory Animal Resource of the School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Brazil (permit number: 2255/2011); the guidelines are similar to the guidelines of the National Institutes of Health (NIH), USA. All surgery was performed under ketamine and xylazine anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

Drugs

The JZL184 (piperidine carbamate 4-nitrophenyl-4-(dibenzo[d][1,3]dioxol-5-yl (hydroxy) methyl) piperidine-1-carboxylate) (Cayman Chemical, MI, USA) vehicle was prepared in 15% dimethyl sulfoxide (DMSO), 4.25% Tween 80, 4.25% polyethylene glycol (PEG) 400 and 76.5% saline. The AM281 (1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-4-morpholinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide) (Sigma Aldrich, St Louis, USA) vehicle and the AM630 ([6-iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1H-indol-3-yl](4-methoxyphenyl)-methanone) vehicle (Tocris Bioscience, Bristol, UK) were prepared in 10% DMSO, 10% Tween 80 and 80% saline.

Experimental protocol and group formation

Two experiments were conducted in accordance with the Good Laboratory Practice (GLP) protocols and quality assurance methods. The first experiment was performed to investigate the possible effects of JZL184 on ALI. For that purpose, 61 mice were randomly assigned into four groups: control (C1 and C2) and experimental (E1 and E2) groups. The JZL184 was intraperitoneally (i.p.) administered at a single dose of 16 mg/kg (0.1 mL/10 g weight) to the animals of the experimental groups. The control groups received a similar volume of JZL184 vehicle alone. Sixty minutes after treatment, ALI was induced, as described below. Mice were analyzed 6, 24 and 48 hours after the LPS (C2 and E2 groups) or the saline (C1 and E1 groups) intranasal (i.n.) instillation.

The participation of the CB₁ or the CB₂ receptors in the JZL184-induced effects on ALI was assessed in the second experiment, which used 99 mice. As in the first experiment, the animals were divided into two experimental (E1 and E2) and two control (C1 and C2) groups that received i.p. JZL184 (16 mg/kg) or a similar volume of its vehicle (0.1 mL/10 g). Within each of these 4 groups, the animals were again divided into 3 groups that received one of the following treatments i.p. 30 minutes before JZL184 or the JZL184 vehicle: AM281 (2.5 mg/kg), AM630 (2.5 and 5.0 mg/kg) or AM281 and AM630 vehicle (0.1 mL/10 g). The ALI was induced 60 minutes after the JZL184 or JZL184 vehicle treatment, and the mice were analyzed 6, 24 and 48 hours later.

The doses and the treatments were based on the following past literature: for JZL184 [7][8], for AM281 [16] and for AM630 [17][18].

Acute lung injury (ALI)

ALI was performed according to previous work from our laboratory [13]. The mice were anesthetized with ketamine and xylazine injected i.p. (100 and 10 mg/kg, respectively) before intranasal instillation of LPS. *Escherichia coli* LPS (O55:B5 L2880, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) at a concentration of 100 µg/mL or sterile 0.9% saline were intranasally instilled into the mice (1 µL/g of mouse body weight). Six, twenty-four and forty-eight hours after the induction of inflammation, mice were anesthetized and killed by exsanguination through the inferior vena cava for the bronchoalveolar lavage fluid (BAL), blood and bone marrow collected and analysis.

Leukocyte trafficking

Blood. Blood studies were performed as described by Ligeiro-Oliveira et al. (2004)[19]. The mice were anesthetized as described above, and the samples of the blood were taken from the abdominal vena cava with plastic syringes containing 10 µL of 10% EDTA and subsequently diluted 1:20 in Turk's fluid (3% acetic acid). The total number of cells present in the blood was counted with the aid of a light microscope in Neubauer chambers. Differential leukocyte counts were performed on smears stained with Rosenfeld's dye using standard morphological criteria.

Bronchoalveolar lavage fluid (BAL). BAL was performed according to Tavares de Lima, Sirois and Jancar (1992)[20]. After exsanguination, the BAL was collected. The lungs were

flushed with 1.5 mL of phosphate-buffered saline (PBS) solution through the use of a cannula inserted by tracheostomy. After collection, the BAL fluid was centrifuged at 250 x g for 5 min. The supernatant was stored, and the remaining cell pellet was resuspended in 1 mL of PBS solution. Total leukocyte counts were performed by adding 10 μ L of crystal violet to 90 μ L of the cell suspension. Neubauer chambers were used for cell counting under a light microscope. The differential cell count was carried out on the cytocentrifuged (250 x g for 5 min) (FANEM, São Paulo, Brazil) cell suspension (100 μ L) stained with Rosenfeld's dye using standard morphological criteria.

Bone marrow. The percentage of granulocytes in the bone marrow was quantified from the femoral marrow lavage fluid that was obtained as described by Ligeiro-Oliveira (2004)[19]. Briefly, mice had their femurs removed and both epiphyses were cut off. A needle connected to a plastic syringe containing PBS (5 mL) was inserted into each femoral marrow to allow cell removal by flushing. The cell suspension was centrifuged at 250 x g for 5 min; the cell pellet obtained was resuspended for the total leukocyte count as describe above for the BAL. To analyze the percentage of granulocytes in the bone marrow, the cells were adjusted to 1×10^6 and were incubated with FITC-conjugated anti-mouse Ly6G, clone 1A8 (Granulocytes, Biolegend, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. A flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) was used to analyze the granulocyte expression. FlowJo® software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA) was used to analyze the data.

Histological analysis

Histological analysis was performed according to [21,22] modified. The left lung was prepared, cut into 5 μ m and hematoxylin and eosin (H.E.) stained as previously described [23] modified. From each sample four representative photos were taken (magnification x200). Five high power fields were randomly assigned to each photo. Subsequently, alveolar wall thickness was analyzed by ImageJ software (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). For each high power fields, a modified ALI score was used to determine the degree of lung damage: In brief, (a) thickness of the alveolar walls, (b) infiltration or aggregation of inflammatory cells, (c) hemorrhage and (d) alveolar congestion were rated in a blinded classification. Each sample was graded according to the point scale: 0: minimal damage, 1: mild damage, 2: moderate damage, 3: severe damage, 4: maximal damage. The samples were evaluated by two professional and the degree of ALI was assessed by the sum of scores, ranging from 0 to 16. The average of the sum of each reading was compared among groups.

Cytokine and chemokine analysis

A BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences, San Jose, USA) was used to measure the IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α , and IL-12p70 in the animals' BAL supernatant. The assays were performed according to the manufacturer's instructions.

Protein analysis in the BAL

The BAL supernatant aliquots were placed in a 96-well ELISA plate (10 μ L/well), and 250 μ L of Bradford reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was added to each well; after a 30 min incubation period, the absorbance was measured at 595 nm. A standard curve using bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was obtained by plotting the net absorbance vs. the protein concentration (1.500 - 100 μ g/mL) to determine the protein concentration in the samples.

Adhesion molecule expression

The recovered BAL cells were adjusted to 1×10^6 cells and stained with APC-conjugated anti-mouse CD62L (L-selectin), clone MEL-14 (Biolegend, CA, USA); FITC-conjugated anti-mouse CD18 (beta2-integrin), clone M18/2 (eBioscience, CA, USA); and PE-conjugated anti-mouse CD31 (PECAM), clone 390 (Biolegend, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. A flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) was used to analyze the molecular cell surface expression. FlowJo® software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA) was used to analyze the data.

Statistical analysis

GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, Inc.) was used for statistical analysis. Parametric data were analyzed by one-way ANOVA followed by a Tukey-Kramer test for multiple comparisons. Non-parametric data were analyzed by a Mann Whitney U test for two-group comparisons or by a Kruskal-Wallis followed by Dunn's tests for multiple comparisons. The BAL protein concentration data were first analyzed by normalizing to the percentage of control (vehicle + saline) and were then compared to the C2 (vehicle + LPS) and the E2 (JZL184+LPS) groups using the non-parametric tests. In all experiments, $p \leq 0.05$ was considered significant. Data are presented as the mean \pm S.D.

Results

In both experiments, no differences were found in mice that received intranasal saline, whether they were treated (E1) or not (C1) with JZL184 (data not shown), i.e., JZL184 induced no effects in the absence of LPS-induced ALI.

Treatment with JZL184 decreased leukocyte migration

BAL. First, we investigated the effects of MAGL inhibition (JZL184 16 mg/kg) on leukocyte migration into the murine lungs at 6, 24 and 48 hours after the LPS-induced ALI. It is noteworthy that the LPS instillation was effective in inducing lung inflammation, as observed by the number of leukocytes present in the BAL, 6 (F (2,17) = 48.16; $p < 0.0001$), 24 (F (2,17) = 49.44; $p < 0.0001$) and 48 (F (2,18) = 23.19; $p < 0.0001$) hours after the LPS nasal instillation (Figure 1A). Treatment with JZL184 decreased the leukocyte counts in the BAL at 6 (F (2,17) = 48.16; $p < 0.0001$), 24 (F (2,17) = 49.44; $p < 0.0001$) and 48 (F (2,18) = 23.19; $p < 0.0001$) hours after LPS-induced ALI (Figure 1A).

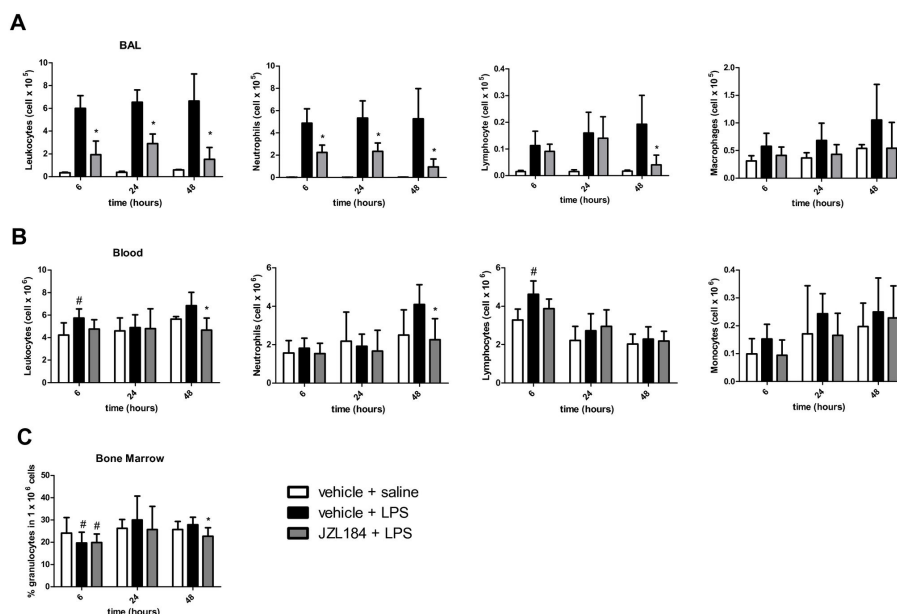


Figure 1. JZL184 effects in leukocyte migration into the lungs. (A) Total and differential leukocyte count in the bronchoalveolar lavage fluid, (B) Total and differential leukocyte count in the blood and (C) Percentage of granulocytes in the bone marrow. Data are presented as mean \pm S.D., $n=5-9$ mice/group. * $p<0.05$, in relation to C2 group and # $p<0.05$ in relation to C1 group. One-way ANOVA and Tukey-Kramer tests.

doi: 10.1371/journal.pone.0077706.g001

Differential analysis of the leukocytes found in the BAL of JZL184-treated mice showed that treatment decreased the neutrophil counts at 6 (F (2,17) = 46.02; $p < 0.0001$), 24 (F (2,17) = 37.04; $p < 0.0001$) and 48 (F (2,18) = 14.70; $p < 0.0001$) hours after LPS-induced ALI, as well as the lymphocyte counts at 48 hours (F (2,18) = 9.926; $p < 0.001$) after LPS instillation (Figure 1A). No differences were found in the macrophage count in the BAL taken at 6, 24 and 48 hours after LPS nasal instillation (Figure 1A).

Blood. The effects of MAGL inhibition, by 16 mg/kg JZL184, were also analyzed in the blood at 6, 24 and 48 hours after LPS-induced ALI. An increase in leukocyte count (F (2,17) = 4.294; $p < 0.05$), mainly of lymphocytes (F (2,17) = 6.923; $p < 0.001$), was evident in the blood of the C2 group at 6 hours after LPS instillation (Figure 1B); at this moment, this increase was not abrogated by the JZL184 treatment (Figure 1B). However, in relation to data taken in the C2 group, the JZL184 treatment decreased the leukocyte (F (2,18) = 8.544; $p < 0.001$) and neutrophil (F (2,18) = 6.514; $p < 0.001$) counts in the blood 48 hours after the ALI induction (Figure 1B).

No differences were found for the monocyte counts in the blood in all periods evaluated (Figure 1B), as well as for the total and differential leukocyte counts in the blood taken 24 hours after the LPS intranasal instillation (Figure 1B).

Bone marrow. The mice in the C2 group exhibited a decreased expression of granulocytes in the bone marrow 6 hours after the LPS-induced ALI (F (2,17) = 6.212; $p < 0.05$) (Figure 1C); this finding was not abrogated by the JZL184 treatment as observed in the mice of the E2 group (F (2,17) = 6.212; $p < 0.05$) (Figure 1C). Further analysis showed that 48 hours after the LPS intranasal instillation, the expression of granulocytes in the bone marrow of the mice of the E2 group was smaller than the expression measured in the C2 group (F (2,17) = 3.553; $p < 0.05$) (Figure 1C). However, no differences were found in the granulocyte expression in the bone marrow 24 hours after LPS intranasal instillation (Figure 1C).

Treatment with JZL184 decreased lung damage

In the presented model of acute lung injury, H.E. staining of lung sections showed that, as compared to control condition

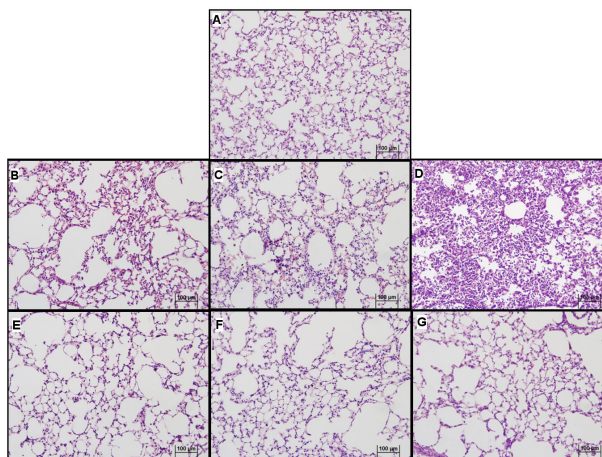


Figure 2. JZL184 effects on lung architecture in LPS-induced lung damage. (A) Non inflamed control; (B) Inflamed control 6 hours, (C) Inflamed control 24 hours and (D) Inflamed control 48 hours after LPS intranasal instillation; (E) JZL184 treated animals 6 hours, (F) JZL184 treated animals 24 hours and (G) JZL184 treated animals 48 hours after LPS intranasal instillation. Sections from the left lung lobe were stained with hematoxylin and eosin. Representative pictures are shown for each experimental group (magnification = 200X).

doi: 10.1371/journal.pone.0077706.g002

(Figure 2A), LPS treatment clearly stimulated the formation of hemorrhage, alveolar congestion and, mainly, increase in thickness of the alveolar walls and infiltration or aggregation of inflammatory cells (Figure 2B-D). These changes were found more pronounced over time (Figure 2B-D). In sharp contrast, the JZL184 treatment reduced LPS-induced lung damage in all evaluated periods, reflected mainly by the prevent an increase in thickness of the alveolar walls and infiltration or aggregation of inflammatory cells (Figure 2E-G). These findings were confirmed by quantitative analyse and by ALI score: JZL184 treatment prevented alveolar wall thickening (F (1,11) = 130.3; $p < 0.0001$ 6 hours; F (1,10) = 105.7; $p < 0.0001$ 24 hours and F (1,10) = 220.7; $p < 0.0001$ 48 hours after LPS intranasal instillation) (Figure 3A) and prevented further damage tissue (U = 8.0; $p < 0.001$ 6 hours; U = 8.0; $p < 0.001$ 24 hours and U = 5.0; $p < 0.05$ 48 hours after LPS intranasal instillation) (Figure 3B), respectively.

Treatment with JZL184 changed the adhesion molecule expression in the neutrophils of the bronchoalveolar lavage fluid and blood

We next investigated the expression of the adhesion molecules (L-selectin, β 2-integrin and PECAM) in the leukocytes recovered from the blood and the BAL of mice treated or not with JZL184. In relation to the animals of the C2 group, the JZL184 treatment decreased the β 2-integrin expression (U = 8.0; $p < 0.05$) (Figure 4A); however, at the

same time, this treatment increased the L-selectin expression (U = 9.0; $p < 0.05$) (Figure 4B) in the neutrophils taken from the blood 6 hours after LPS-induced ALI. No differences were found for PECAM expression in the neutrophils of the blood taken in all periods analyzed (data not shown) or in β 2-integrin and L-selectin expression at 24 and 48 hours after LPS intranasal instillation (Table 1). Furthermore, it was also observed that MAGL inhibition by JZL184 decreased the β 2-integrin expression (U = 7.0; $p < 0.001$) in neutrophils in the BAL 48 hours after LPS-induced ALI (Figure 4C). However, significant difference were not found for both L-selectin (Table 1) and PECAM (data not shown) expression in the neutrophils taken from BAL in all of the periods analyzed.

Treatment with JZL184 decreased vascular permeability

Vascular permeability within the lungs was measured by the albumin concentration in the BAL. It was shown that JZL184 decreased the protein concentration in the BAL in relation to mice in the C2 group at 6 (U = 3.0; $p < 0.05$) and 48 (U = 4.0; $p < 0.001$) hours after LPS-induced ALI (Figure 5).

Treatment with JZL184 decreased the production of pro-inflammatory cytokines/chemokines in the bronchoalveolar lavage fluid

In relation to mice in the C1 group, large increases in the TNF- α and IL-6 concentrations were observed in the C2 group

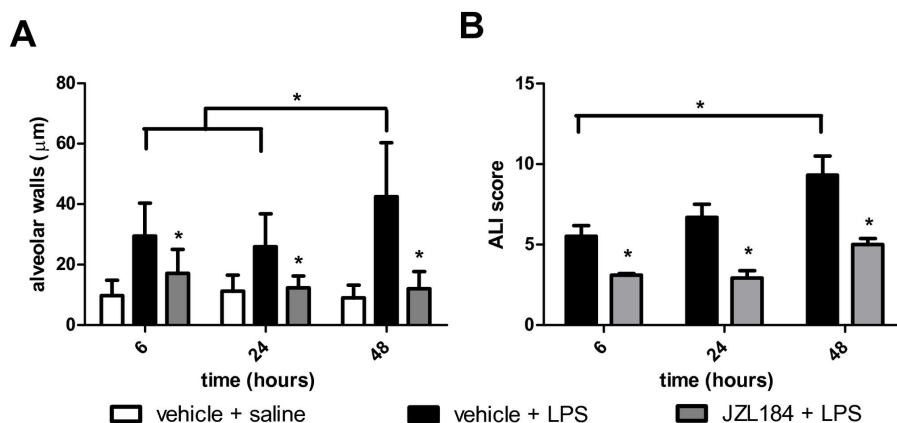


Figure 3. JZL184 effects LPS-induced lung damage. (A) Alveolar wall thickness and (B) ALI score. Data are presented as mean \pm S.D., n=5-6 mice/group. * $p < 0.05$, in relation to C2 group. (A) One-way ANOVA and Tukey-Kramer tests; (B) Mann Whitney U test for two group comparison.

doi: 10.1371/journal.pone.0077706.g003

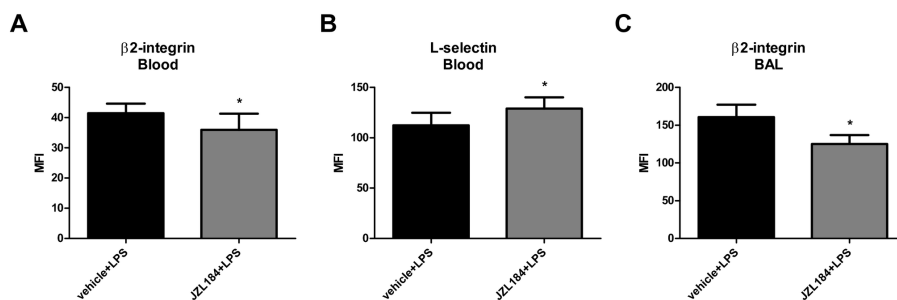


Figure 4. JZL184 effects in adhesion molecules expression in LPS-induced ALI. (A) $\beta 2$ -integrin and (B) L-selectin in the blood 6 hours after LPS-induced ALI. (C) $\beta 2$ -integrin in the bronchoalveolar lavage fluid 48 hours after LPS-induced ALI. Data are mean \pm S.D., n=5-9 mice/group. * $p < 0.05$ in relation to C2 group. Mann Whitney U test for two group comparison.

doi: 10.1371/journal.pone.0077706.g004

6 hours after the LPS-induced ALI (Figure 6A-B). Gradual reductions in the TNF- α and IL-6 concentrations were detected at 24 and 48 hours after the LPS intranasal instillation (Figure 6A-B). However, at the same time, a gradual increase in the MCP-1 concentration was observed in the BAL in animals of the C2 group in all of the evaluated periods (Figure 6C). The JZL184 treatment decreased the TNF- α concentration at 24 (U = 3.0; $p < 0.05$) and 48 (U = 4.0; $p < 0.001$) hours after LPS-induced ALI (Figure 6A), as well as the IL-6 concentration at 6 (U = 2.0; $p < 0.05$), 24 (U = 6.0; $p < 0.05$) and 48 (U = 9.0; $p <$

0.05) hours after LPS-induced ALI (Figure 6B). Further analysis showed that JZL184 treatment (E2 group) also exhibited a reduced MCP-1 concentration 6 (U = 4.0; $p < 0.001$) and 48 (U = 7.0; $p < 0.05$) hours after LPS-induced ALI (Figure 6C). Statistically significant differences were not observed among the groups for the IL-10, IFN- γ and IL-12p70 concentrations measured in the BAL of mice taken at 6, 24 and 48 hours after the LPS intranasal instillation (Table 2).

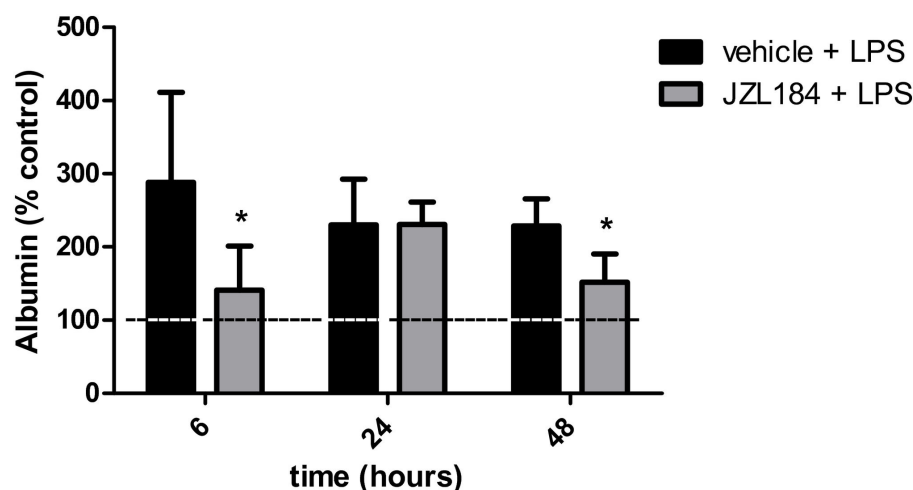


Figure 5. JZL184 effects on albumin concentration in the bronchoalveolar lavage fluid. Data are mean \pm S.D., $n=5-8$ mice/group. * $p<0.05$ in relation to C2 group. Mann Whitney U test for two groups comparisons. Data are normalized to protein of control. doi: 10.1371/journal.pone.0077706.g005

Table 1. Adhesion molecules expression in the BAL and blood of mice 6, 24 and/or 48 hours after LPS-induced acute lung injury.

Analyzed material	Adhesion molecule	Time after LPS instillation	Time after LPS	
			Vehicle + LPS	JZL184 + LPS
BAL	B2-integrin	6 hours	110.3 \pm 3.724	107.1 \pm 4.638
	L-selectin	6 hours	32.74 \pm 4.794	32.54 \pm 4.104
	B2-integrin	24 hours	66.34 \pm 4.885	60.40 \pm 6.251
BAL	L-selectin	24 hours	19.40 \pm 0.9345	18.40 \pm 1.578
	L-selectin	48 hours	17.50 \pm 1.442	18.05 \pm 1.943
	B2-integrin	24 hours	40.50 \pm 2.606	42.35 \pm 4.270
Blood	L-selectin	24 hours	19.70 \pm 1.457	19.00 \pm 3.616
	B2-integrin	48 hours	81.57 \pm 9.448	79.90 \pm 7.754
	L-selectin	48 hours	47.29 \pm 6.498	46.91 \pm 3.798

Data are mean \pm S.D., $n=5-9$ mice/group. Mann Whitney U test for two groups comparisons.

doi: 10.1371/journal.pone.0077706.t001

CB₁ and CB₂ receptor antagonism attenuated the anti-inflammatory effects induced by JZL184 on ALI

The roles of the CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors in the anti-inflammatory effects of JZL184 were next analyzed using AM281 (a CB₁ receptor antagonist) and AM630 (a CB₂ receptor antagonist) as pharmacological tools. The data showed that the AM281 and AM630 treatments partially abrogated the JZL184-induced actions on leukocyte migration into the lungs 6 hours

after LPS instillation ($F(5,28) = 13.53$) (Figure 7A). However, only the AM630 treatment abrogated the JZL184-induced inhibition of leukocyte migration into the lungs at 24 ($F(5,28) = 23.33$; $p < 0.05$) and 48 ($F(5,25) = 13.73$; $p < 0.001$) hours after LPS intranasal instillation (Figure 7A). Further analysis revealed that the AM281 and AM630 treatments partially reverted both the JZL184-induced actions on the leukocyte count in the blood ($F(5,25) = 3.61$) (Figure 7B) and the percentage of granulocytes in the bone marrow ($F(5,25) = 6.336$) (Figure 7D) at 48 hours after LPS-induced ALI. It was also shown that the JZL184-induced actions on the neutrophil count in the blood were partially reversed by the AM281 treatment ($F(5,25) = 7.498$) (Figure 7C).

The JZL184 effects in prevented alveolar wall thickening and the lung damage was reversed with AM630 (5mg/kg) treatment 6 hours after LPS intranasal instillation ($F(5,29) = 61.23$; $p < 0.0001$ and $KW = 21.44$; $p < 0.05$) (Figure 8A-B).

Further analysis showed that the JZL184-induced actions on the expression of adhesion molecules in the blood and in the BAL were reduced or abrogated by the use of both AM281 and AM630. Thus, AM281 reduced the JZL184-induced inhibition of $\beta 2$ -integrin expression in the blood 6 hours after ALI ($KW = 20.30$) (Figure 9A). Furthermore, AM630 and AM281 reduced the JZL184-induced increase of L-selectin expression ($KW = 24.65$) (Figure 9B) in the blood 6 hours after LPS-induced ALI. The JZL184-induced decrease in the $\beta 2$ -integrin expression in the BAL was also reduced by AM281 ($KW = 20.39$) and reverted by AM630 ($KW = 20.39$; $p < 0.0001$ for 5.0 mg/kg dose

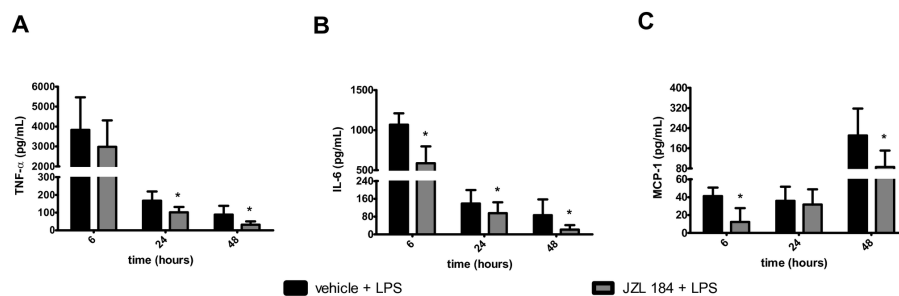


Figure 6. JZL184 effects in cytokines/chemokines concentration in the bronchoalveolar lavage fluid. (A) TNF- α , (B) IL-6 and (C) MCP-1. Data are mean \pm S.D., n=5-8 mice/group. * p <0.05 in relation to C2 group. Mann Whitney U test for two groups comparisons.

doi: 10.1371/journal.pone.0077706.g006

and KW = 20.39; p <0.05 for 2.5 mg/kg dose) treatments (Figure 9C).

As depicted in Figure 10, the AM281 (KW = 21.04) and the AM630 (KW = 13.84) treatments attenuated the JZL184-induced effects on the lungs' vascular permeability at 6 and 48 hours after LPS-induced ALI, respectively.

Finally, it was observed that both the AM281 and/or AM630 treatments attenuated the JZL184-induced actions on the following pro-inflammatory cytokine/chemokine concentrations measured in the BAL 6, 24 or 48 hours after LPS-induced ALI: TNF- α (KW = 13.33, 24 hours and KW = 21.05, 48 hours after LPS instillation) (Figure 11A), IL-6 (KW = 13.27, 6 hours, KW = 19.80, 24 hours and KW = 22.02, 48 hours after LPS instillation) (Figure 11B) and MCP-1 (KW = 20.43, 6 hours and KW = 19.10, 48 hours after LPS instillation) (Figure 11C).

Discussion

JZL184 is commonly known as a highly efficacious and selective inhibitor of MAGL, a 2AG-degrading enzyme [7]; it has been reported that JZL184 has potent immunosuppressive and anti-inflammatory properties [9]. We are now reporting that a single dose of JZL184 (16 mg/kg, i.p.) is able to decrease several lung inflammation parameters during the course of a murine model of LPS-induced ALI, specifically leukocyte migration (neutrophils, lymphocytes and macrophages) to the lungs, adhesion molecule expression in the BAL and blood, vascular permeability and cytokine/chemokine production in the BAL. We also showed that signaling through the CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors might have a relevant role in the anti-inflammatory effects now being reported for JZL184.

Organ dysfunction and failure from inflammatory response continues to be the major problem after injury in many clinical conditions such as sepsis, acute pancreatitis and hemorrhagic shock [24]. In humans, the acute lung injury (ALI) that manifests clinically as acute respiratory distress syndrome (ARDS), a major component of multiple organ dysfunction

Table 2. Cytokines and chemokines concentrations in the BAL 6, 24 and/or 48 hours after LPS-induced acute lung injury.

Cytokines / Chemokines	Time after LPS instillation	Vehicle + LPS (pg/mL)	JZL184 + LPS (pg/mL)
TNF- α	6 hours	3836 \pm 1631	2984 \pm 1329
IL-10	6 hours	1.492 \pm 3.654	2.690 \pm 4.624
IFN- γ	6 hours	1.150 \pm 0.6314	0.3386 \pm 0.5786
IL-12p70	6 hours	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
MCP-1	24 hours	35.91 \pm 15.82	37.01 \pm 10.95
IL-10	24 hours	7.667 \pm 5.777	8.683 \pm 4.226
IFN- γ	24 hours	0.3143 \pm 0.5383	0.6200 \pm 0.5803
IL-12p70	24 hours	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
IL-10	48 hours	4.337 \pm 5.504	6.349 \pm 5.340
IFN- γ	48 hours	1.984 \pm 2.133	1.135 \pm 0.7783
IL-12p70	48 hours	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

Data are mean \pm S.D. Mann Whitney U test for two groups comparisons.

doi: 10.1371/journal.pone.0077706.t002

syndrome, is described as "syndrome of inflammation and increased capillary endothelial permeability" [25,26]. Inflammatory mediators play a key role in the pathogenesis of ARDS, which is the primary cause of death in these conditions [24].

Neutrophil influx into the interstitium and the bronchoalveolar space is considered a keystone for the progression of ALI [12]. We found that JZL184 treatment decreased total leukocyte migration into the lungs of mice at 6, 24 and 48 hours after LPS-induced ALI, as shown by the BAL leukocyte count and ALI score. Specifically, we observed that the neutrophils and the lymphocytes were greatly reduced in the BAL taken from JZL184-treated mice in relation to the inflamed non-treated mice. Leukocyte migration into the site of inflammation is known to be important because the presence of high amounts

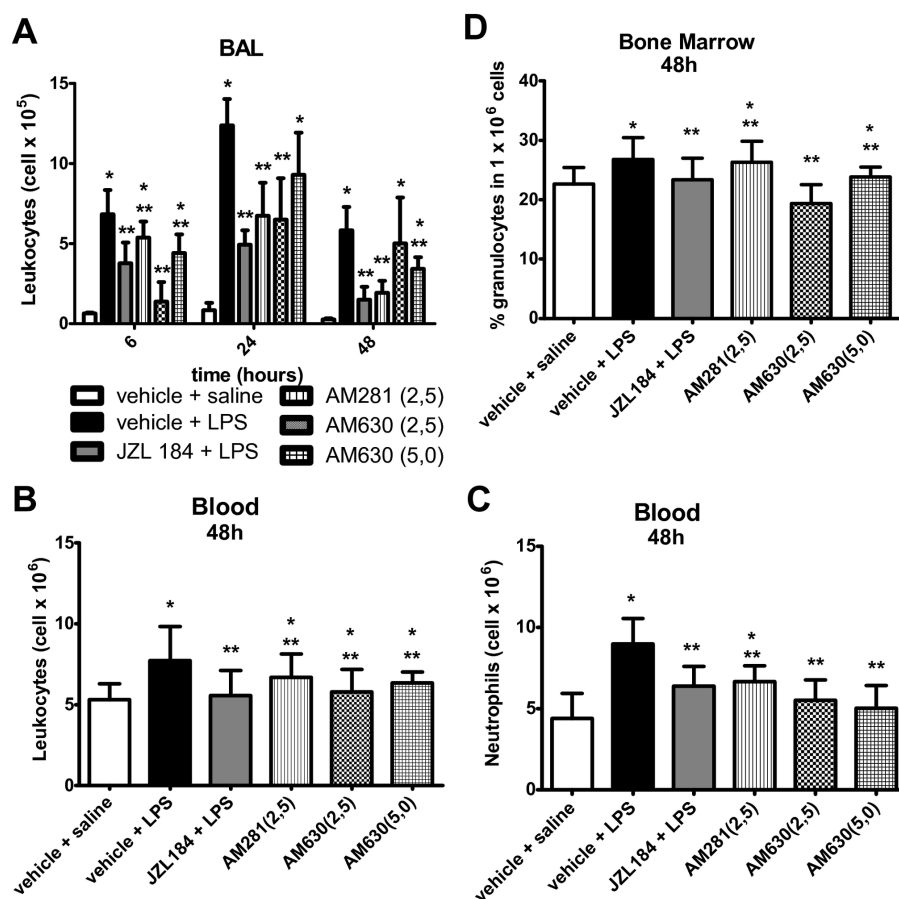


Figure 7. CB1 and CB2 receptors participation in leukocyte migration into the lungs. (A) Leukocyte count in the bronchoalveolar lavage fluid, (B) Leukocyte count in the blood, (C) neutrophils count in the blood and (D) the percentage of granulocytes in the bone marrow. Data are mean \pm S.D., n=5-8 mice/group. * and **p<0.05. One-way ANOVA and Tukey-Kramer tests.

doi: 10.1371/journal.pone.0077706.g007

of inflammatory cells, especially neutrophils, might damage the lung tissue [27]. Thus, it appears feasible to suggest that a reduction in the inflammatory process, induced by JZL184 in mice, could decrease ALI lung damage.

In the presence of an inflammatory process, the blood cells are immediately recruited to the site of inflammation; the bone marrow produces the largest quantity of leukocytes that

migrate to the bloodstream and are directed to the inflammatory focus [28].

The control mice treated with LPS exhibited an increased number of lymphocytes in their blood 6 hours after the LPS instillation; the JZL184-treated animals exhibited a decrease in this neutrophil number in the blood 48 hours after LPS-induced ALI. It is known that the inflammatory process begins at the

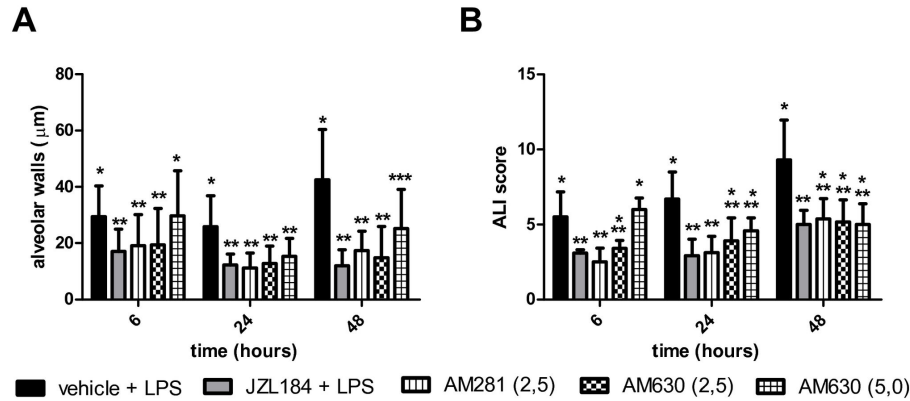


Figure 8. CB1 and CB2 receptors participation in LPS-induced lung damage. (A) Alveolar wall thickness and (B) ALI score. Data are presented as mean ± S.D., n=5-8 mice/group. * and **p<0.05. (A) One-way ANOVA and Tukey-Kramer tests; (B) Kruskal-Wallis and Dunn's tests for multiples comparisons. doi: 10.1371/journal.pone.0077706.g008

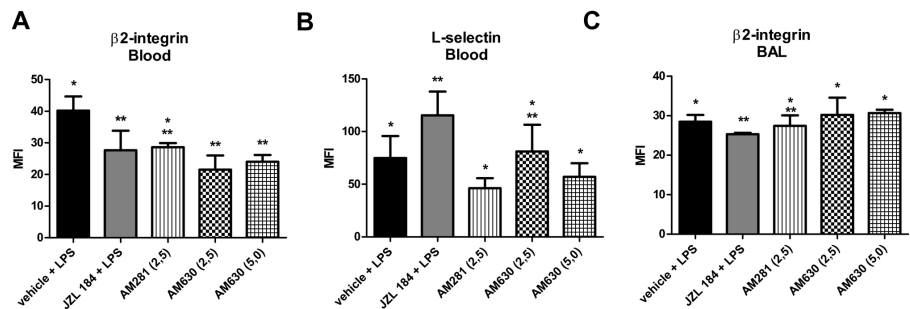


Figure 9. CB1 and CB2 receptors participation in adhesion molecules expression in LPS-induced ALI. (A) β 2-integrin in the blood 6 hours after LPS-induced ALI, (B) L-selectin in the blood 6 hours after LPS-induced ALI and (C) β 2-integrin in the bronchoalveolar lavage fluid 48 hours after LPS-induced ALI. Data are mean ± S.D., n=5-8 mice/group. * and **p<0.05. Kruskal-Wallis and Dunn's tests for multiples comparisons. doi: 10.1371/journal.pone.0077706.g009

microcirculation site, specifically by the formation of the intercellular spaces that are responsible for the increased microvascular permeability observed during the course of ALI [29]. Thus, it appears that a reduction in the epithelial cell barrier function might have facilitated the influx of a fluid rich in cells and macromolecules into the lung alveolar space. Indeed, we showed that MAGL inhibition by JZL184 reduced the vascular permeability to protein influx into the BAL at 6 and 48 hours after LPS instillation, a fact that might have contributed to

the observed decrease in lung inflammation. In our experimental model, JZL184 also induced a decrease in the number of granulocytes produced in the bone marrow in relation to the inflamed control lung.

Neutrophil migration into the lungs is not sufficient to cause ALI; neutrophil activation and pro-inflammatory cytokine release are also required [12]. To initiate the inflammatory process, the immune system cells produce and release cytokines and

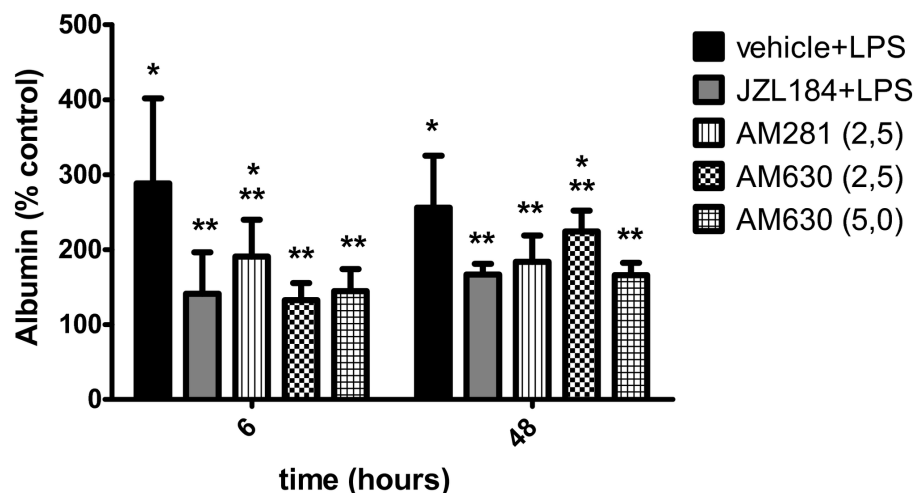


Figure 10. CB1 and CB2 receptors participation on albumin concentration in the bronchoalveolar lavage fluid. Data are mean \pm S.D., n=5-8 mice/group. * and **p<0.05. Kruskal-Wallis and Dunn's tests for multiples comparisons.

doi: 10.1371/journal.pone.0077706.g010

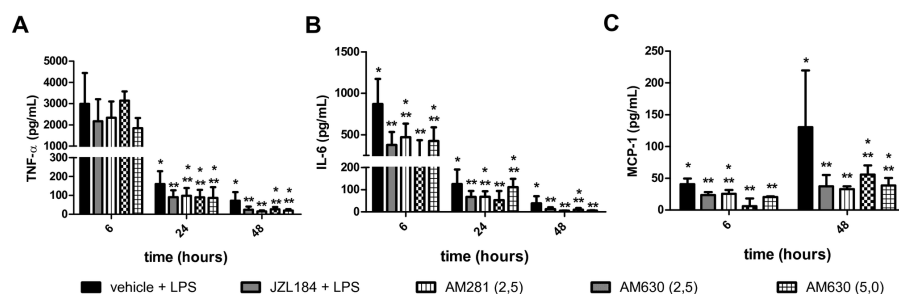


Figure 11. CB1 and CB2 receptors participation in cytokine/chemokine concentrations in the bronchoalveolar lavage fluid. (A) TNF- α , (B) IL-6 and (C) MCP-1. Data are mean \pm S.D., n=5-8 mice/group. * and **p<0.05. Kruskal-Wallis and Dunn's tests for multiples comparisons.

doi: 10.1371/journal.pone.0077706.g011

chemokines to recruit inflammatory cells to the site of inflammation.

TNF- α is released during the first 30–90 min after exposure to LPS and in turn activate a second level of inflammatory cascades including cytokines, lipid mediators, and reactive oxygen species, as well as up-regulating cell adhesion molecules that result in the initiation of inflammatory cell migration into tissues [30]. TNF- α is present in the

bronchoalveolar lavage fluid of patients at risk for ARDS and with established ARDS [31]. Interleukin 6 (IL-6) is produced by a wide range of cells including monocytes/macrophages, endothelial cells, fibroblasts, and smooth muscle cells in response to stimulation by endotoxin, IL-1 β , and TNF- α [30,32–34]. Circulating levels of IL-6 have been shown to be excellent predictors of the severity of ARDS of different aetiologies such as sepsis [35] and acute pancreatitis [36].

Chemokines can be classified as constitutive (developmentally regulated) or inducible (inflammatory). Chemokines have chemotactic and activating effects on leukocyte subsets, which provide a key stimulus for directing leukocytes to areas of injury [24].

Treatment with JZL184 has been reported to block cytokine expression in the gut or blood in a gastric inflammation model [9][10]. A reduction in pro-inflammatory cytokine (TNF- α and IL-6) and chemokine (MCP-1) production in JZL184-treated mice in relation to the inflamed control group was presently observed. These results appear to be extremely important because cytokines and chemokines are essential for both inflammation establishment and phagocyte activation. This action might explain the presently observed reduction in leukocyte migration into the lungs. MCP-1, also known as CCL2, is a molecule that attracts monocytes and lymphocytes as well as neutrophils to the site of inflammation [37]. Thus, it is reasonable to suggest that JZL184, by reducing MCP-1 in the BAL, decreased the total leukocyte count in the BAL.

Our data suggest that the inhibition of adhesion molecules by JZL184 might have been involved in the anti-inflammatory effects presently being reported. Leukocyte migration into inflamed tissues involves complex interactions of leukocytes with the endothelium through the regulated expression of surface adhesion molecules. In the present study, we showed that JZL184 treatment (1) decreased the cellular expression of β 2-integrin in the blood 6 hours after the LPS-induced ALI (2), increased the cellular expression of L-selectin in the blood 6 hours after the LPS instillation, and (3) decreased the cellular expression of β 2-integrin in the BAL 48 hours after the induction of inflammation. Together, these facts appear to justify the less intense inflammatory response observed in the mice of the JZL-treated group in relation to those of the inflamed control group. Indeed, β 2-integrin and L-selectin are known to increase the leukocyte adhesion process [38][39]. Time course studies of the β 2-integrin and L-selectin expression during inflammation have shown an inverse relationship in the serum, where β 2-integrins are upregulated and L-selectins are downregulated [38][39]. It has been speculated that this inverse relationship is necessary to allow the adhesion of the neutrophils [40]. Taking this fact into account and also the changes observed here in the adhesion molecule expression, it seems possible to suggest that adhesion molecules might have accounted for the reduction in inflammatory cell adhesion in the JZL184-treated mice in the present experiment.

JZL184 is known to exert its effects by inhibiting MAGL, thereby increasing the levels of the endocannabinoid 2-AG [7]. 2-AG and anandamide are signaling lipids that bind to the cannabinoid receptors CB₁ [1] and CB₂ [3]. Activation of the CB₁ and CB₂ receptors has been shown to play an important role in inflammation [9]. Endogenous and exogenous cannabinoid receptor agonists are involved in leukocyte activation and cytokine production in different inflammatory conditions [41–46]. The 2-AG, mainly through the CB₂ receptor, stimulates inflammatory reactions and allergic responses by inducing robust adhesion of leukocytes to vascular endothelial cells [47]. In addition, other non-

hematopoietic cells, such as endothelial cells, can respond to ligands of CB receptors. The CB₁ and CB₂ receptors are expressed during inflammatory angiogenesis; CB₁ receptor appeared to be strongly involved in leukocyte accumulation and cytokine production, CB₂ receptor is mainly linked to a pro-angiogenic response, especially through early neutrophil activation. Double blockade of cannabinoid receptors favored slightly better inhibition of inflammatory angiogenesis [48]. In the skin samples of healthy dogs, CB₁ and CB₂ receptors immunoreactivity was detected in various types of cells in the epidermis and in cells in the dermis, including perivascular cells with mast cell morphology, fibroblasts, and endothelial cells; in the skin samples of dogs with atopic dermatitis, CB₁ and CB₂ immunoreactivity was stronger than it was in skin samples of healthy dogs [49].

Therefore, to evaluate the involvement of the CB₁ and CB₂ receptor activation in the JZL184-induced anti-inflammatory effects, we used the CB₁ (AM281) and CB₂ (AM630) antagonists before the JZL184 treatment. Remarkably, the AM281 or AM630 treatments reduced all of the anti-inflammatory effects of JZL184 reported here, i.e., leukocyte migration into the lungs (from bone marrow to the blood and from the blood to the lungs), the lung damage, adhesion molecule expression, vascular permeability reduction and the production of pro-inflammatory cytokines/chemokines at 6, 24 or 48 hours after LPS-induced ALI. It has been reported that CB₁ and, mainly, CB₂ receptor activation decreased the inflammatory response during drug-induced gastric hemorrhages [10], as well as in models of colitis, a finding also observed during a systemic-induced inflammation in mice [9]. Furthermore, neutrophil migration in humans [50], cytokine/chemokine production in mice [9], vascular permeability in guinea pigs [51] and adhesion molecule expression in mice [52] have also been reported to be reduced by CB₁ or CB₂ activation. Thus, it appears feasible to suggest that the abrogation of the anti-inflammatory effects induced by JZL184 in LPS-induced ALI might have involved CB₁ and CB₂ receptor activation. However, it should not be forgotten that cannabinoid actions can be related to other mechanisms besides CB₁ and CB₂ activation, such as adenosine receptor activation [13] or partial FAAH inhibition by JZL184 administration [7]. Furthermore, beyond the CB₁ and CB₂ receptor participation, other possibilities might also explain the anti-inflammatory effects of JZL184 demonstrated in this work. One possibility may be the release of arachidonic acid from 2-AG and/or anandamide hydrolysis, a fact that would lead to eicosanoid (leukotriene) formation in neutrophils. It has been shown that 2-AG *in vitro* activates human neutrophils, an effect attributable to the leukotriene (LT) B₄ ligation to specific neutrophil receptors (LTB₄ receptors) [53].

Taken together, the present findings showed that a single dose of JZL184, given prior to LPS-induced ALI, resulted in an anti-inflammatory effect. It was also shown that the JZL184 effects on leukocyte migration from the blood to the lungs and from the bone marrow to the blood in the presently used model of ALI relies on adhesion molecule expression and on cytokine/chemokine participation. Finally, it was shown that the CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors appear to be the most likely

mechanism involved in the JZL184 anti-inflammatory effects in the LPS-induced ALI model. Although care should be taken when extrapolating the present data to patients, MAGL inhibition might become, in the future, a useful therapeutic tool for the treatment of inflammatory lung diseases, such as ALI and acute respiratory distress syndrome.

Acknowledgements

The authors thank Laisa Castro de Souza and Guilherme Luiz da Silva for the data collection. The authors also thank

Neuroimmunomodulation research group for the weekly discussions of work.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JPN AR CCS. Performed the experiments: CCS AR VFP ASC TPAA JAGJ VIA MLP. Analyzed the data: CCS AR VFP ASC JPN. Contributed reagents/materials/analysis tools: JPN CCS. Wrote the manuscript: CCS JPN AR.

References

- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561–564. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2165569>. Accessed 8 March 2013. doi: 10.1038/346561a0. PubMed: 2165569.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA et al. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (New York, NY)* 258: 1946–1949. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1470919>. Accessed 6 March 2013. doi:10.1126/science.1470919. PubMed: 1470919.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61–65. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7689702>. Accessed 8 May 2013. doi:10.1038/365061a0. PubMed: 7689702.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50: 83–90(95)00109-D. Accessed 8 May 2013. doi: 10.1016/0006-2952(95)00109-D. PubMed: 7605349.
- Di Marzo V, De Petrocellis L (2006) Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu Rev Med* 57: 553–574. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16409166>. Accessed 5 March 2013. doi:10.1146/annurev.med.57.011205.135648. PubMed: 16409166.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA et al. (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384: 83–87. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8900284>. Accessed 8 May 2013. doi:10.1038/384083a0. PubMed: 8900284.
- Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG et al. (2009) Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol* 5: 37–44. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2605181&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 5 March 2013. doi:10.1038/nchembio.129. PubMed: 19029917.
- Long JZ, Nomura DK, Cravatt BF (2009) Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism. *Chem Biol* 16: 744–753. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2867454&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 27 March 2013. doi:10.1016/j.chembiol.2009.05.009. PubMed: 19635411.
- Alhouayek M, Lambert DM, Delzenne NM, Cani PD, Muccioli GG (2011) Increasing endogenous 2-arachidonoylglycerol levels counteracts colitis and related systemic inflammation. *FASEB J* 25: 2711–2721. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21551239>. Accessed 8 May 2013. doi:10.1096/fj.10-176602. PubMed: 21551239.
- Kinsey SG, Nomura DK, O'Neal ST, Long JZ, Mahadevan A et al. (2011) Inhibition of monoacylglycerol lipase attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric hemorrhages in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 338: 795–802. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3164340&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 8 May 2013. doi:10.1124/jpet.110.175778. PubMed: 21659471.
- Busquets-García A, Puighearnan A, Pastor A, De la Torre R, Maldonado R et al. (2011) Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. *Biol Psychiatry* 70: 479–486. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684528>. Accessed 5 March 2013. doi:10.1016/j.biopsych.2011.04.022. PubMed: 21684528.
- Grommes J, Soehnlein O Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med (Camb., Mass)* 17: 293–307. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3060975&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 4 March 2013. PubMed: 21046059.
- Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Vitoretto LB, Mariano-Souza DP et al. (2012) Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. *Eur J Pharmacol* 678: 78–85. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22265864>. Accessed 16 April 2013. doi:10.1016/j.ejphar.2011.12.043. PubMed: 22265864.
- Rubinfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP et al. (2005) Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 353: 1685–1693. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236739>. Accessed 4 March 2013. doi:10.1056/NEJMoa050333. PubMed: 16236739.
- Ware LB, Matthay MA (2000) The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342: 1334–1349. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793167>. Accessed 6 May 2013. doi:10.1056/NEJM200005043421806. PubMed: 10793167.
- Vaseghi G, Rabbani M, Hajhashemi V (2012) The CB(1) receptor antagonist, AM281, improves recognition loss induced by naloxone in morphine withdrawal mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 111: 161–165. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22429707>. Accessed 8 May 2013. PubMed: 22429707.
- Gamaleddin I, Zvonok A, Makriyannis A, Goldberg SR, Le Foll B (2012) Effects of a selective cannabinoid CB2 agonist and antagonist on intravenous nicotine self administration and reinstatement of nicotine seeking. *PLOS ONE* 7: e29900. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3266883&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 14 March 2013. doi:10.1371/journal.pone.0029900. PubMed: 22291896.
- Asghari-Roodsari A, Lesani A, Javadi-Paydar M, Tabatabaeeefar L, Tavangar SM et al. (2010) Tocolytic effect of delta9-tetrahydrocannabinol in mice model of lipopolysaccharide-induced preterm delivery: role of nitric oxide. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif* 17: 391–400. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20228383>. Accessed 30 April 2013. doi:10.1177/1933719109358456. PubMed: 20228383.
- Ligeiro-Oliveira P, Fialho de Araújo M, Lazzarini R, Silva ZL, De Nucci G, et al. (2004) Effects of amphetamine on immune-mediated lung inflammatory response in rats. *Neuroimmunomodulation* 11: 181–190. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15067209>. Accessed 4 April 2013. doi:10.1159/000076767. PubMed: 15067209.
- De Lima WT, Sirois P, Jancar S (1992) Immune-complex alveolitis in the rat: evidence for platelet activating factor and leukotrienes as mediators of the vascular lesions. *Eur J Pharmacol* 213: 63–70. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1323472>. doi: 10.1016/0014-2999(92)90253-T. PubMed: 1323472.
- Faller S, Zimmermann KK, Strosing KM, Engelstaedter H, Buerkle H et al. (2012) Inhaled hydrogen sulfide protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Medical Gas Res* 2: 26. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3472209&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 6 August 2013. doi:10.1186/2045-9912-2-26. PubMed: 23025523.
- Kim K, Kim W, Rhee JE, Jo YH, Lee JH et al. (2010) Induced hypothermia attenuates the acute lung injury in hemorrhagic shock. *J Trauma* 68: 373–381. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996791>. Accessed 6 August 2013. doi:10.1097/TA.0b013e3181a73ee3. PubMed: 19996791.
- Faller S, Foeckler M, Strosing KM, Spassov S, Ryter SW et al. (2012) Kinetic effects of carbon monoxide inhalation on tissue protection in

- ventilator-induced lung injury. *Lab Invest; J Tech Methods Pathol* 92: 999–1012. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22449795>. Accessed 6 August 2013. doi:10.1038/labinvest.2012.55. PubMed: 22449795.
24. Bhatta M, Mochhala S (2004) Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 202: 145–156. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14743496>. Accessed 7 July 2013. doi:10.1002/path.1491. PubMed: 14743496.
 25. Weinacker AB, Vaszar LT (2001) Acute respiratory distress syndrome: physiology and new management strategies. *Annu Rev Med* 52: 221–237. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160776>. Accessed 16 July 2013. doi:10.1146/annurev.med.52.1.221. PubMed: 11160776.
 26. Tasaka S, Hasegawa N, Ishizaka A (2002) Pharmacology of acute lung injury. *Pulm Pharmacol Ther* 15: 83–95. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12090781>. Accessed 13 June 2013. doi:10.1006/pupt.2001.0325. PubMed: 12090781.
 27. Klebanoff SJ (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 77: 598–625. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15689384>. Accessed 3 May 2013. doi:10.1189/jlb.1204697. PubMed: 15689384.
 28. Opendakker G, Fibbe WE, Van Damme J (1998) The molecular basis of leukocytosis. *Immunol Today* 19: 182–189(97)01243-7. Accessed 8 May 2013. doi:10.1016/S0167-5699(97)01243-7. PubMed: 9577095.
 29. Ware LB (2006) Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 27: 337–349. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16909368>. Accessed 2 April 2013. doi:10.1053/s-2006-948288. PubMed: 16909368.
 30. Cohen J (2000) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 406: 885–891. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490963>. Accessed 2 July 2013. doi:10.1038/nature01326. PubMed: 12490963.
 31. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F et al. (2001) Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1896–1903. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734443>. Accessed 16 July 2013. doi:10.1164/ajrccm.164.10.2104013. PubMed: 11734443.
 32. Bhatta M, Neoptolemos JP, Slavina J (2001) Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Curr Opin Invest Drugs (Lond., England)* 2: 496–501. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566005>. Accessed 16 July 2013. PubMed: 11566005.
 33. Bhatta M, Brady M, Shokui S, Christmas S, Neoptolemos JP et al. (2000) Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 190: 117–125. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10657008>. Accessed 16 July 2013. doi:10.1002(SICI)1096-9896(200002)190:2. PubMed: 10657008.
 34. Bhatta M (2002) Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1: 343–351. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561181>. Accessed 16 July 2013. doi:10.2174/1568010023344517. PubMed: 14561181.
 35. Leser HG, Gross V, Scheibnbogen C, Heinisch A, Salm R et al. (1991) Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 101: 782–785. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1907253>. Accessed 16 July 2013. PubMed: 1907253.
 36. Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, Shin J, Nemzek JA (2002) Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock (Augusta, Ga)* 17: 463–467. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069181>. Accessed 16 July 2013. doi:10.1097/00024382-200206000-00004. PubMed: 12069181.
 37. Balamayooran G, Batra S, Balamayooran T, Cai S, Jayaseelan S (2011) Monocyte chemoattractant protein 1 regulates pulmonary host defense via neutrophil recruitment during *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 79: 2567–2577. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3191985&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 8 May 2013. doi:10.1128/IAI.00067-11. PubMed: 21518788.
 38. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC (1989) Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science (New York, NY)* 245: 1238–1241. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2551036>. Accessed 8 May 2013. doi:10.1126/science.2551036. PubMed: 2551036.
 39. Simon SI, Chambers JD, Butcher E, Sklar LA (1992) Neutrophil aggregation is beta 2-integrin- and L-selectin-dependent in blood and isolated cells. *J Immunol (Baltimore, Md)* 149: 2765–2771. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1383326>. Accessed 8 May 2013. PubMed: 1383326.
 40. Rochon YP, Frojmovic MM (1992) A model for the recruitment of neutrophils at sites of inflammation. Physiological relevance of in vivo neutrophil aggregation. *Med Hypotheses* 38: 132–138. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1528157>. Accessed 8 May 2013. doi:10.1016/0306-9877(92)90086-R. PubMed: 1528157.
 41. Smith SR, Terminelli C, Denhardt G (2000) Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 136–150. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10734163>. Accessed 16 July 2013. PubMed: 10734163.
 42. Conti S, Costa B, Colleoni M, Parolaro D, Giagnoni G (2002) Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br J Pharmacol* 135: 181–187. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1573125&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 10 June 2013. doi:10.1038/sj.bjp.0704466. PubMed: 11786493.
 43. Smith SR, Terminelli C, Denhardt G (2001) Modulation of cytokine responses in *Corynebacterium parvum*-primed endotoxemic mice by centrally administered cannabinoid ligands. *Eur J Pharmacol* 425: 73–83. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11672577>. Accessed 16 July 2013. doi:10.1016/S0014-2999(01)0142-6. PubMed: 11672577.
 44. Smith SR, Denhardt G, Terminelli C (2001) The anti-inflammatory activities of cannabinoid receptor ligands in mouse peritonitis models. *Eur J Pharmacol* 432: 107–119. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734194>. Accessed 16 July 2013. doi:10.1016/S0014-2999(01)01477-7. PubMed: 11734194.
 45. Sacerdote P, Massi P, Panerai AE, Parolaro D (2000) In vivo and in vitro treatment with the synthetic cannabinoid CP55,940 decreases the in vitro migration of macrophages in the rat: involvement of both CB1 and CB2 receptors. *J Neuroimmunol* 109: 155–163. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10996217>. Accessed 16 July 2013. doi:10.1016/S0165-5728(00)00307-6. PubMed: 10996217.
 46. Massi P, Fuzio D, Viganò D, Sacerdote P, Parolaro D (2000) Relative involvement of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in the Delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced inhibition of natural killer activity. *Eur J Pharmacol* 387: 343–347. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10650181>. Accessed 16 July 2013. doi:10.1016/S0014-2999(99)00860-2. PubMed: 10650181.
 47. Oka S, Wakui J, Ikeda S, Yanagimoto S, Kishimoto S et al. (2006) Involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in oxazolone-induced contact dermatitis in mice. *J Immunol (Baltimore, Md)* 177: 8796–8805. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17142782>. Accessed 8 July 2013. PubMed: 17142782.
 48. Guabiraba R, Russo RC, Coelho AM, Ferreira MAND, Lopes GAO et al. (2013) Blockade of cannabinoid receptors reduces inflammation, leukocyte accumulation and neovascularization in a model of sponge-induced inflammatory angiogenesis. *Inflammation research*: official journal of the European Histamine Research Society. [et al.] 62: 811–821. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23722450>. Accessed 6 August 2013.
 49. Campora L, Miragliotta V, Ricci E, Cristino L, Di Marzo V et al. (2012) Cannabinoid receptor type 1 and 2 expression in the skin of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. *Am J Vet Res* 73: 988–995. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22738050>. Accessed 16 July 2013. doi:10.2460/ajvr.73.7.988. PubMed: 22738050.
 50. McHugh D, Tanner C, Mechoulam R, Pertwee RG, Ross RA (2008) Inhibition of human neutrophil chemotaxis by endogenous cannabinoids and phytocannabinoids: evidence for a site distinct from CB1 and CB2. *Mol Pharmacol* 73: 441–450. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965195>. Accessed 8 May 2013. PubMed: 17965195.
 51. Fukuda H, Abe T, Yoshihara S (2010) The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 inhibits antigen-induced plasma extravasation in guinea pig airways. *Int Arch Allergy Immunol* 152: 295–300. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150748>. Accessed 8 May 2013. doi:10.1159/000283042. PubMed: 20150748.
 52. Zhao Y, Yuan Z, Liu Y, Xue J, Tian Y et al. (2010) Activation of cannabinoid CB2 receptor ameliorates atherosclerosis associated with suppression of adhesion molecules. *J Cardiovasc Pharmacol* 55: 292–298. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20075743>. Accessed 8 May 2013. doi:10.1097/FJC.0b013e3181d2644d. PubMed: 20075743.
 53. Chouinard F, Lefebvre JS, Navarro P, Bouchard L, Ferland C et al. (2011) The endocannabinoid 2-arachidonoyl-glycerol activates human neutrophils: critical role of its hydrolysis and de novo leukotriene B4 biosynthesis. *J Immunol (Baltimore, Md)* 186: 3188–3196.

Effects of MAGL Inhibition in Acute Lung Injury

Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278347>. Accessed 8 May 2013. PubMed: 21278347.