



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Camila Fernandes de Souza

Envolvimento dos receptores canabinoides do tipo 2 (CB2) no processo inflamatório pulmonar associado à pneumosepse

Florianópolis
2021

Camila Fernandes de Souza

Envolvimento dos receptores canabinoides do tipo 2 (CB2) no processo inflamatório pulmonar associado à pneumosepse

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia
Orientador: Profa. Regina de Sordi, Dra.

Florianópolis
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Souza, Camila Fernandes de
Envolvimento dos receptores canabinoides do tipo 2
(CB2) no processo inflamatório pulmonar associado à
pneumosepse / Camila Fernandes de Souza ; orientador,
Regina de Sordi, 2021.
63 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. pneumosepse. receptor canabinoide
do tipo 2. inflamação.. I. Sordi, Regina de. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia. III. Título.

Camila Fernandes de Souza
**Título: Envolvimento dos receptores canabinoides do tipo 2 (CB2) no processo
inflamatório pulmonar associado à pneumosepse**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Aleksander Roberto Zampronio, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal do Paraná

Prof.(a) Alfeu Zanotto Filho, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Prof. Rui Daniel Schroder Prediger, Dr.
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Regina de Sordi, Dr.(a)
Orientador(a)

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado à minha vó Elisa em forma de gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a todas as oportunidades que a vida me trouxe, o caminho que percorri e onde estou hoje, e cada uma das pessoas que estiveram ao meu lado.

A minha Vó Elisa (*in memoriam*), que sempre foi meu porto seguro, meu lugar de paz em meio ao caos, e meu maior orgulho e inspiração. Obrigada por toda dedicação em minha criação e por me mostrar o caminho da Fé e o amor de Deus. Como uma das ironias da vida, você se foi aos 94 anos devido a um quadro de sepse. Te amarei eternamente!

A minha mãe Teresinha, que com seu amor e dedicação, não mediu esforços para me ajudar a chegar até aqui. Você me apoia e me escuta nos momentos mais difíceis e renova minhas energias para eu continuar adiante.

Ao meu companheiro de vida Felipe, que é meu maior apoiador e incentivador, obrigada por acreditar em mim. Sem você este trabalho e muitos dos meus sonhos não se realizariam. Você faz a minha vida mais feliz todos os dias!

A minha irmã Nicolý, que além de sempre me ouvir, me aconselhar e aturar meus piores momentos, me ajudou na realização da parte experimental deste trabalho como aluna de iniciação científica. Seu apoio foi essencial para que eu chegasse até aqui.

A minha irmã Sabrina, que mesmo longe se faz presente em todos os dias da minha vida. Obrigado pelo apoio e por estar comigo sempre que eu precisei. Você é uma inspiração como pessoa, e especialmente como mãe, agradeço por me dar como presente minha afilhada Yasmin, seu amor e alegria fazem minha vida mais feliz.

A toda minha família que mesmo longe se fazem presente, sempre me acolhem e me fazem feliz, obrigado por estarem comigo em todas as etapas da minha vida.

A professora Regina obrigada pela oportunidade de ser sua aluna de mestrado e me orientar no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por compartilhar comigo de toda sua experiência, por todos os ensinamentos e por ser uma grande incentivadora. Obrigada também por toda compreensão, pelas conversas/desabafos e conselhos de vida que levarei pra sempre comigo.

Ao professor Jamil Assreuy pela oportunidade de me orientar na minha iniciação científica e me permitir conhecer esse universo da pesquisa e farmacologia, obrigada pela orientação, pelas boas conversas e discussões, e agradeço por compartilhar de todo seu conhecimento e dedicação.

Aos companheiros de laboratório: Adriane Madeira, obrigada por toda ajuda nas horas de sufoco, pela companhia, pelos melhores biscoitos e trufas, por ser essa mãezona e amiga! Filipe, obrigada por compartilhar comigo toda sua experiência com experimentos e conhecimento. Thiele, obrigada por todas as dicas com blots e pela ajuda na realização dos experimentos, sua ajuda foi essencial para realização deste trabalho. Gustavo, obrigada por ajudar e compartilhar dicas para realização do protocolo de extração núcleo/citoplasma. Daiane Bobermin, obrigada por sempre estar disposta em ajudar e pela parceria. Bruna Barcelos agradeço a parceria nas

coletas, nossos desabafos e conversas. Clarissa, Deborah, Veronica, Jheniffer, Jaine, Rafaela e todos que fizeram parte da minha trajetória no NOLab/LabCaRe. E em especial a Malu agradeço por todo apoio, incentivo e bons momentos de descontração, obrigada por muitas vezes me fazer lembrar que a vida pode ser vivida de maneira leve e feliz, sempre!

As minhas amigas de infância, que estão presente na minha vida até hoje, Iza e Manu, obrigada por entenderem que a distância é um pequeno detalhe perto da grandeza da nossa amizade. As minhas colegas de faculdade, Adri e Amanda, nossa parceria tornou a graduação mais leve e divertida, agradeço por cultivarmos até hoje essa amizade.

Aos professores da Pós graduação, que serão sempre inspiração e motivo de muito orgulho, obrigado por todos os ensinamentos. Agradeço também aos demais professores, colegas e servidores da Universidade Federal de Santa Catarina, Hospital Universitário, LAMEB e ao CNPQ.

Agradeço aos membros da banca pela disponibilidade em avaliarem este trabalho. Obrigada!

RESUMO

A sepse é uma condição grave que ocorre devido a uma resposta desregulada do hospedeiro frente a uma infecção, que leva a lesão tecidual e disfunção orgânica. Embora essencial para resolução do quadro infeccioso, a ativação e liberação excessiva de mediadores inflamatórios se torna prejudicial ao hospedeiro, sendo responsável em grande parte pela disfunção orgânica. Os receptores canabinoides do tipo 2 (CB2) estão abundantemente expressos nas células imunes e possuem efeitos modulatórios na resposta imune. A densidade destes receptores difere em determinadas patologias e também em relação aos sexos. Portanto, o presente estudo avaliou a resposta inflamatória e a densidade dos receptores CB2 em camundongos machos e fêmeas submetidos ao modelo de sepse induzido por pneumonia, e também investigou o envolvimento dos receptores CB2 no processo inflamatório pulmonar associado à sepse. Para isso, a sepse foi induzida em camundongos Swiss machos e fêmeas pela inoculação intratraqueal de 3×10^8 UFC de *Klebsiella pneumoniae*. Para avaliar parâmetros relacionados ao desenvolvimento da sepse nos animais, pulmão, sangue e lavado broncoalveolar (BAL) foram coletados 6, 24 e 48 horas após a cirurgia. Os animais machos e fêmeas sépticos apresentaram leucopenia, aumento no número de células polimorfonucleares e aumento na quantidade de proteína no BAL, sobretudo, não foi observada diferença na mortalidade dos animais. Através da metodologia de *western blotting*, foi mostrado que machos sépticos apresentam redução significativa na densidade do receptor CB2 no tecido pulmonar em 24 e 48 horas após indução do quadro quando comparado com animais controle, sendo que essa redução não foi observada em fêmeas. Com base nestes dados, camundongos machos foram tratados com 3 mg/kg do agonista CB2, AM1241, 6 e 12 horas após a indução da cirurgia. Depois de 24 horas foram avaliados parâmetros relacionados a resposta inflamatória no foco infeccioso e vias de sinalização. O tratamento com agonista CB2, AM1241, diminuiu a migração de células polimorfonucleares para o foco infeccioso e a formação de edema pulmonar, reduziu o número de UFC e a atividade da enzima mieloperoxidase. Além disso, foi mostrado através da metodologia de *western blotting* no tecido pulmonar que o tratamento promoveu redução na densidade da enzima NOS-2 e a translocação do p65-NFκB para o núcleo. Estes resultados mostram que a ativação dos receptores CB2 pode ser benéfica na sepse ao atenuar o processo hiperinflamatório que pode ser prejudicial ao hospedeiro. Portanto, a intervenção farmacológica com agonistas de receptores CB2 pode ser uma nova estratégia terapêutica como coadjuvante no tratamento da sepse.

Palavras-chave: pneumosepse. receptor canabinoide do tipo 2. inflamação.

ABSTRACT

Sepsis is a severe condition that occurs due to a dysregulated host response to infection, which leads to tissue damage and organ dysfunction. While essential for resolution of the infectious condition, the activation and excessive release of inflammatory mediators becomes detrimental to the host and is largely responsible for organ dysfunction. Cannabinoid receptors type 2 (CB2) are abundantly expressed on immune cells and have modulatory effects on the immune response. The density of these receptors differs in certain pathologies and also in relation to gender. Therefore, the present study evaluated the inflammatory response and CB2 receptor density in male and female mice submitted to pneumonia-induced sepsis model, and also investigated the involvement of CB2 receptors in the lung inflammatory process associated with sepsis. To this end, sepsis was induced in male and female Swiss mice by intratracheally inoculation of *Klebsiella pneumoniae* (3×10^8 UFC). To evaluate parameters related to the development of sepsis in the animals, lung, blood and bronchoalveolar lavage (BAL) were collected 6, 24 and 48 hours after surgery. The septic male and female animals showed leukopenia, increased number of polymorphonuclear cells, and increased amount of protein in BAL. No difference was observed in the mortality of the animals. Through the western blotting methodology, it was shown that septic males presented a significant reduction in the density of CB2 receptors in the lung tissue 24 and 48 hours after sepsis induction, what was not observed in female mice. Based on these data, male mice were treated with 3 mg/kg of the CB2 agonist, AM1241, 6 and 12 hours after induction of surgery. After 24 hours, parameters related to inflammatory response in the infectious focus and signaling pathways were evaluated. The treatment with CB2 agonist, AM1241, decreased the migration of polymorphonuclear cells to the infectious focus and the formation of pulmonary edema, reduced the number of CFU and the activity of myeloperoxidase enzyme. In addition, through the western blotting methodology in the lung tissue, it was shown that the treatment promoted a reduction in NOS-2 enzyme density and the translocation of p65-NF κ B to the nucleus. These results show that CB2 receptor activation may be beneficial in sepsis by attenuating the hyperinflammatory process, and therefore, pharmacological intervention with CB2 agonists may be a new therapeutic approach as an adjuvant drug to treat sepsis.

Keywords: pneumosepsis. cannabinoid receptor type 2. inflammation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da síntese e degradação dos endocanabinoides.....	20
Figura 2 – Representação esquemática da síntese dos endocanabinoides.....	21
Figura 3 – Representação esquemática da via de sinalização dos receptores canabinoides CB1 e CB2.....	22
Figura 4 – Número de publicações ao longo dos anos relacionando sistema endocanabinoide e doenças na base de dados PubMed no período de 1996 a 2020.....	24
Figura 5 – Curva de sobrevivência de camundongos machos e fêmeas inoculados com <i>K pneumoniae</i>	36
Figura 6 – Células do lavado broncoalveolar de camundongos machos inoculados com <i>K pneumoniae</i>	39
Figura 7 – Células do lavado broncoalveolar de camundongos fêmeas inoculados com <i>K pneumoniae</i>	40
Figura 8 – Células do lavado broncoalveolar de camundongos machos e fêmeas inoculados com <i>K pneumoniae</i>	41
Figura 9 – Quantificação de proteínas no lavado broncoalveolar de camundongos machos e fêmeas inoculados com <i>K pneumoniae</i>	42
Figura 10 – Análise por <i>Western blotting</i> dos receptores CB2 no tecido pulmonar.....	43
Figura 11 – Avaliação de células do lavado broncoalveolar de camundongos inoculados com <i>K pneumoniae</i> e tratados com AM1241.....	45
Figura 12 – Avaliação da quantidade de bactérias no lavado broncoalveolar de camundongos inoculados com <i>K pneumoniae</i> e tratados com AM1241.....	46
Figura 13 – Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos de camundongos inoculados com <i>K pneumoniae</i> e tratados com AM1241.....	47
Figura 14 – Avaliação da quantidade de proteínas no lavado broncoalveolar e da atividade da enzima MPO de camundongos inoculados com <i>K pneumoniae</i> e tratados com AM1241.....	48
Figura 15 – Análise por <i>Western blotting</i> da enzima NOS2 no tecido pulmonar de camundongos controles e inoculados com <i>K pneumoniae</i> e tratados com AM1241.....	49
Figura 16 – Análise por <i>Western blotting</i> da expressão e ativação do NFkB no tecido pulmonar de camundongos controles e inoculados com <i>K pneumoniae</i> e tratados com AM1241.....	50
Figura 17 – Representação esquemática dos principais achados do trabalho.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação sequencial de falência de órgãos – SOFA.....	16
Tabela 2 – Principais agonistas e antagonistas canabinoides.....	24
Tabela 3 – Marcadores de disfunção orgânica de camundongos machos inoculados com <i>K. pneumoniae</i>	37
Tabela 4 – Marcadores de disfunção orgânica de camundongos fêmeas inoculados com <i>K. pneumoniae</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,2-DAG 1,2-diacilglicerol
2-AG 2-aracdonilglicerol
5-HT₃ receptor 5-hydroxytryptamine 3
AC Adenilil Ciclase
AEA Aracdoniletanolamida
ALT Alanina Aminotransferase
AM1241 2-iodo-5-nitrofenil-(1-(1-metilpiperidin-2-ilmetil)-1*H*-indol-3-yl)methanone
AM281 [N-(morfolin-4-yl)-1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-1*H*-
pirazole-3-carboxamida]
AM630 6-iodopravadolina
AMPc Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA Análise de variância
APCs Células apresentadoras de antígenos
ApoE Apolipoproteína E
AST Aspartato Aminotransferase
BAL Lavado broncoalveolar
BHI do inglês *Brain Heart Infusion Broth*
BSA do inglês *Bovine serum albumin*
CB1 Receptor canabinoide 1
CB2 Receptor canabinoide 2
CBD Canabidiol
CEUA Comissão de Ética no Uso de animais
CK-MB Isoenzima MB da creatina quinase
CLP do inglês *Cecal Ligation Puncture*
CP55940 5-(1,1-Dimetilheptil)-2-[5-hidroxi-2-(3-hidroxipropil)ciclohexil]fenol
D.O. Densidade óptica
DAGL Diacilglicerol
DMSO Dimetilsulfóxido
DP Desvio padrão
FAAH do inglês *Fatty Acid Amide Hydrolase*
FIO₂ Fração de oxigênio inspirado
GCs Guanilato ciclase solúvel
Gi/0 Proteína G do tipo inibitória
GPR18 G protein-coupled receptor 18
GPR55 G protein-coupled receptor 55
Gq Proteína G ativadora da fosfolipase C
GS Proteína G do tipo estimulatória
HU-210 11-hidroxi- Δ^8 -THC-dimetilptil
i.t. Intraqueal
ICAM-1 do inglês *Intercellular Adhesion Molecule 1*
IL-10 Interleucina-10
IL-18 Interleucina 18
IL-1 β Interleucina-1 β
IL-6 Interleucina 6
INF γ Interferon γ

JWH-133 3-(1,1-Dimethylbutyl)-1-deoxy- Δ^8 -THC, 3-(1,1-Dimethylbutyl)-1-deoxy- Δ^8 tetrahydrocannabinol
Liso-PI Lisofosfolipídio
Liso-PLC Lisofosfolipase C
LPS Lipopolissacarídeo
MAGL Monoacilglicerol lipase
MAPK Proteína quinase ativada por mitógeno
MH Mueller Hinton
MN mononuclear
NAPE-PLD do inglês *NAPE-phospholipase D*
NAPE do inglês *N-acyl-phosphatidylethanolamine*
NAT N-acetiltransferase
NF- κ B Fator nuclear kappa B
NO Óxido nítrico
NO²⁻ Nitrito
NO³⁻ Nitrato
NOS Óxido nítrico sintase
NOS-2 Óxido nítrico sintase induzida
NOx Nitrato e nitrito
PaO₂ pressão arterial de oxigênio
PAMPs do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*
PBS do inglês *Phosphate buffered saline*
PI Fosfatidilinositol
PKA Proteína quinase A
PLA1 Fosfolipase A1
PLC do inglês *Phospholipase C*
PMN polimorfonuclear
PPAR- γ Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTLM do inglês *Phosphatidylethanolamine*
qSOFA do inglês *Quick Sepsis-related Organ Failure Assessment*
RHO-A do inglês *Ras homolog family member A*
SNC Sistema Nervoso Central
SOFA do inglês *Sequential Organ Failure Assessment*
SR141716A N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide hydrochloride
SR144528 N-[(1S)-endo-1,3,3-trimethyl bicyclo[2.2.1]heptan-2-yl]-5-(4-chloro-3-methylphenyl)-1-(4-methylbenzyl)-pyrazole-3-carboxamide
TA Temperatura ambiente
THC Δ -9-tetraidrocanabinol
TLR-4 do inglês *Toll-like receptor 4*
TNF- α Fator de necrose tumoral α
TRPV1 do inglês *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*
UFC Unidades Formadoras de Colônias
UTI Unidade de Terapia Intensiva
VCAM-1 do inglês *Vascular Cell Adhesion Protein 1*
WIN55212 (R)-(+)-[2,3-Dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naftalenilmetanone mesylate

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Sepse/choque séptico: definição e epidemiologia	15
1.1.1	Fisiopatologia da sepse	16
1.1.2	Modelos para estudo da sepse.....	18
1.2	Sistema endocanabinoide.....	19
1.3	Sistema endocanabinoide em condições patológicas	24
1.3.1	Sistema endocanabinoide e sepse	25
2	HIPÓTESE.....	27
3	OBJETIVOS	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Animais.....	28
4.2	Procedimentos experimentais	28
4.2.1	Modelo experimental de sepse por pneumonia (pneumosepse).....	28
4.2.1.1	<i>Padronização do lote e quantificação da bactéria.....</i>	28
4.2.1.2	<i>Inoculação das bactérias nos animais.....</i>	29
4.2.2	Grupos experimentais e protocolo de tratamento	29
4.2.2.1	<i>Tratamentos farmacológicos</i>	30
4.2.3	Obtenção de amostras de sangue, lavado broncoalveolar e tecidos.....	30
4.2.4	Contagem total e diferencial de células	31
4.2.5	Dosagem de proteínas no lavado broncoalveolar	31
4.2.6	Dosagem de nitrato e nitrito (NOx).....	31
4.2.7	Determinação de marcadores de dano de órgãos	32
4.2.8	Imunoeletroforese - Western blotting.....	32
4.2.8.1	<i>Preparo das amostras – extração total</i>	32
4.2.8.2	<i>Preparo das amostras – extração fração nuclear e citoplasmática.....</i>	32
4.2.8.3	<i>Separação de proteínas e imunodeteção</i>	33

4.2.9	Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias nas amostras de BAL	34
4.2.10	Medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em pulmão	34
4.3	Reagentes.....	35
4.4	Análise estatística	35
5	RESULTADOS	36
5.1	Sobrevida após inoculação de <i>K. pneumoniae</i>	36
5.2	Disfunção orgânica induzida pela pneumosepse	36
5.3	Contagem total e diferencial de células no BAL	38
5.4	Quantificação de proteína no BAL	42
5.5	Densidade de receptores CB2 no tecido pulmonar.....	43
5.6	Efeito do agonista CB2 AM1241 na migração de células no foco infeccioso	44
5.7	Efeito do agonista CB2 AM1241 no crescimento de bactérias no foco infeccioso	46
5.8	Efeito do agonista CB2 AM1241 na contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos.....	47
5.9	Efeito do agonista CB2 AM1241 na quantidade de proteína e atividade da enzima MPO.....	48
5.10	Efeito do agonista CB2 AM1241 na densidade da NOS2.....	49
5.11	Efeito do agonista CB2 AM1241 na ativação da via do NF- κ B.....	50
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÃO.....	57
8	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE/CHOQUE SÉPTICO: DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

A sepse representa uma das maiores causas de internação nas unidades de terapia intensiva (UTI) e é considerada uma das principais causas de morte mundialmente. Em 2017 estimam-se que houveram 11 milhões de mortes decorrentes da sepse em todo o mundo, representando 19,7% das causas de mortalidade global (Rudd *et al.*, 2020). Atualmente as infecções por COVID-19 também aumentaram o número de casos de sepse em todo o mundo (Chen *et al.*, 2020). O Brasil apresenta mortalidade de 200 mil pacientes por ano e a incidência diária é de 36,3 casos para cada 1000 pacientes (Machado *et al.*, 2017). As elevadas taxas de incidência e prevalência de sepse no mundo todo demonstram a relevância desta condição e o motivo de representarem um grande fardo para os sistemas de saúde.

A palavra sepse deriva do grego “sepsis” e significa decomposição animal, ou vegetal ou da matéria orgânica na presença de bactéria (Geroulanos e Douka, 2006). Atualmente a sepse é definida como uma resposta desregulada do organismo frente a uma infecção (Singer *et al.*, 2016). A sepse pode evoluir para um quadro chamado de choque séptico, que é caracterizado por disfunção circulatória e metabólica associada a um maior risco de mortalidade. Na clínica é caracterizado pela presença de hipotensão, com necessidade da administração de vasopressores para manter a pressão arterial média ≥ 65 mmHg, e lactato plasmático ≥ 2 mmol/L (Singer *et al.*, 2016).

Na prática clínica, os pacientes com suspeita de sepse são avaliados através do *quickSOFA* (qSOFA, do inglês, *Quick Sepsis-related Organ Failure Assessment*), uma ferramenta disponível à beira do leito e que permite uma triagem rápida dos pacientes que correm risco de desenvolver a sepse e da gravidade do quadro já instalado. Os critérios utilizados no qSOFA são: pressão arterial sistólica menor que 100 mmHg, frequência respiratória maior que 22/min e rebaixamento do nível de consciência (Escala de coma de Glasgow < 15). Para confirmação, a disfunção orgânica presente na sepse é identificada através dos critérios de SOFA (do inglês, *Sequential Organ Failure Assessment*): baixa pressão arterial de oxigênio e fração de oxigênio inspirado ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$), hipotensão refratária a vasopressores, plaquetopenia, baixo score na escala de Glasgow, aumento de bilirrubinas, creatinina e oligúria (Tabela 1). Caso o paciente apresente um aumento agudo de dois pontos ou mais dos critérios SOFA, é caracterizado o quadro séptico.

Tabela 1. Avaliação sequencial de falência de órgãos – SOFA

Sistema	Pontuação				
	0	1	2	3	4
Respiratório PaO ₂ /FIO ₂	≥ 400	< 400 221 – 301	< 300 142 – 220	< 200 67 – 141	< 100 < 67
Coagulação Plaquetas x10 ³ /mm ³	> 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Hepático Bilirrubina (mg/dL)	< 1.2	1.2 – 1.9	2.0 – 5.9	6.0 – 11.9	> 12.0
Cardiovascular Hipotensão	Sem hipotensão (PAM ≥70mmHg)	PAM < 70mmHg	Dopamina ≤ 5 ou dobutamina (qualquer dose) ^a	Dopamina > 5 ou norepinefrina ≤ 0.1 ^a	Dopamina > 5 ou norepinefrina < 0.1 ^a
SNC Escala de coma de Glasgow ^b	15	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
Renal Creatinina (mg/dL)	< 1.2	1.2 – 1.9	2.0 – 3.4	3.5 – 4.9	> 5.0
Diurese (mL/dia)				< 500	< 200

Fonte: Adaptado de Singer et al., 2016.

Abreviações: PaO₂: pressão arterial de oxigênio; FIO₂: fração de oxigênio inspirado; PAM: pressão arterial média; SNC: sistema nervoso central.

^aDoses de catecolaminas administradas em µg/Kg/min por pelo menos 1 h.

^bEscala de coma de Glasgow: pontuação de 3 a 15; alta pontuação indica melhor função neurológica.

O quadro de sepse evolui a partir de uma infecção primária, que pode ser causada por bactérias, fungos, vírus ou protozoários. Os principais patógenos responsáveis pela infecção são as bactérias Gram-negativas e, entre elas, as espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são as mais comuns. As infecções mais comumente associadas à sepse são a pneumonia, infecções abdominais e urinárias, sendo que a pneumonia é, na maior parte dos levantamentos epidemiológicos, responsável pela metade dos casos. (Angus e Poll, Van Der, 2013). Além desses fatores, a gravidade e o prognóstico da sepse são influenciados pela idade e diferem entre o sexo feminino e masculino. Sabe-se que mulheres apresentam melhor curso clínico e menor mortalidade frente ao quadro de choque séptico, devido principalmente a aspectos hormonais (Bösch, Angele e Chaudry, 2018). O dimorfismo entre os gêneros presente na sepse, está relacionado aos mecanismos imunológicos, cardiovasculares e fisiopatológicos associados a esta condição (Bösch, Angele e Chaudry, 2018).

1.1.1 Fisiopatologia da sepse

A patogênese da disfunção orgânica presente no quadro de sepse decorre de diversos fatores que ainda não estão completamente elucidados, e alterações hemodinâmicas decorrentes da liberação exacerbada de mediadores inflamatórios estão diretamente relacionadas à falência

de órgãos associada a esta condição (Cohen, 2002). A resposta imune inata é a responsável pelo processo inflamatório inicial da sepse e envolve o reconhecimento de patógenos ou seus produtos, denominados coletivamente de PAMPs (do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) pelas células de defesa do hospedeiro, principalmente através de receptores de superfície. No caso das bactérias gram-negativas, o lipopolissacarídeo presente na parede celular é reconhecido pelos receptores do tipo *Toll-like receptor 4* (TLR-4), levando à ativação de uma cascata de sinalização intracelular, que culmina na ativação de vários fatores de transcrição, dentre eles o fator nuclear kappa B (NF- κ B), responsável pela transcrição de diversos genes, cujos produtos irão atuar como mediadores reguladores da resposta inflamatória. Dentre eles destacam-se as citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β), expressão das enzimas óxido nítrico sintases (NOS), ativação e recrutamento de leucócitos aos tecidos afetados diretamente pela infecção e expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais que participam do recrutamento de células do sistema imune (Angus e Poll, Van Der, 2013). Além da resposta pró inflamatória sistêmica, ocorre também uma resposta anti-inflamatória compensatória, onde ocorre liberação de mediadores anti-inflamatórios como por exemplo interleucina 10 (IL-10) (O'Brien *et al.*, 2007) e lipoxina A4 (Sordi, *et al.*, 2013).

Ocorre também uma interação da resposta imune inata inicial com a resposta adaptativa, as células apresentadoras de antígenos (APCs) apresentam o patógeno invasor aos linfócitos T CD4⁺ que irão promover a secreção de citocinas, como por exemplo, interferon γ (INF γ) que além de ativar células fagocíticas, interagem com as células B responsáveis em produzir anticorpos antimicrobianos (Stearns-Kurosawa *et al.*, 2011).

As células endoteliais, através de eventos celulares e vasculares, possuem papel essencial na resposta inflamatória do quadro de sepse. As citocinas secretadas pelas células inflamatórias residentes estimulam a síntese de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão celular-vascular (VCAM-1) e selectinas, que promovem a migração dos leucócitos da microcirculação para os locais infectados. Ocorre, portanto, aumento da permeabilidade vascular, que leva ao extravasamento de fluido e proteínas plasmáticas para os tecidos (King *et al.*, 2014; Pons *et al.*, 2020). As células endoteliais produzem e liberam substâncias vasoconstritoras, como por exemplo endotelina e substâncias vasodilatadoras, como o óxido nítrico (NO) e as prostaciclina, que fisiologicamente contribuem para a regulação do tônus vasomotor. Sabe-se que na sepse ocorre um desbalanço na produção de NO e que as funções fisiológicas desse

mediador estão prejudicadas. A produção exacerbada de NO durante a sepse é responsável pela vasodilatação excessiva, e o NO pode reagir com espécies reativas de oxigênio formando radicais livres responsáveis pelos efeitos tóxicos associados a esta molécula. Outra importante ação do NO é a ativação de canais de potássio, que promove a hiperpolarização dos miócitos vasculares, impedindo a abertura dos canais de cálcio e o influxo deste íon, prejudicado assim a contração muscular (revisado em Assreuy, 2006).

A resposta inflamatória excessiva é a principal característica da sepse, ocasionando graves prejuízos ao hospedeiro devido a geração descontrolada de mediadores. Além disso, os eventos inflamatórios precedem a disfunção endotelial que resulta no comprometimento do tônus vasomotor e da microcirculação. Em conjunto esses fatores estão diretamente relacionados à falência de múltiplos órgãos presente na sepse, e que é responsável pelas elevadas taxas de mortalidade dessa síndrome (Cohen, 2002; Pons *et al.*, 2020).

1.1.2 Modelos para estudo da sepse

Os modelos que mimetizam o quadro séptico incluem a administração exógena de uma toxina, como por exemplo lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, rompimento de barreiras de proteção naturais como o CLP (ligação e perfuração do ceco) e modelos que incluem a administração de um patógeno como a injeção de bactérias viáveis (revisado em Fink e Heard, 1990). A pneumosepse é um modelo de sepse induzido por pneumonia através da administração intratraqueal da bactéria *K. pneumoniae*, mimetizando um foco infeccioso de início pulmonar que irá progredir para um quadro séptico (Sordi, *et al.*, 2013).

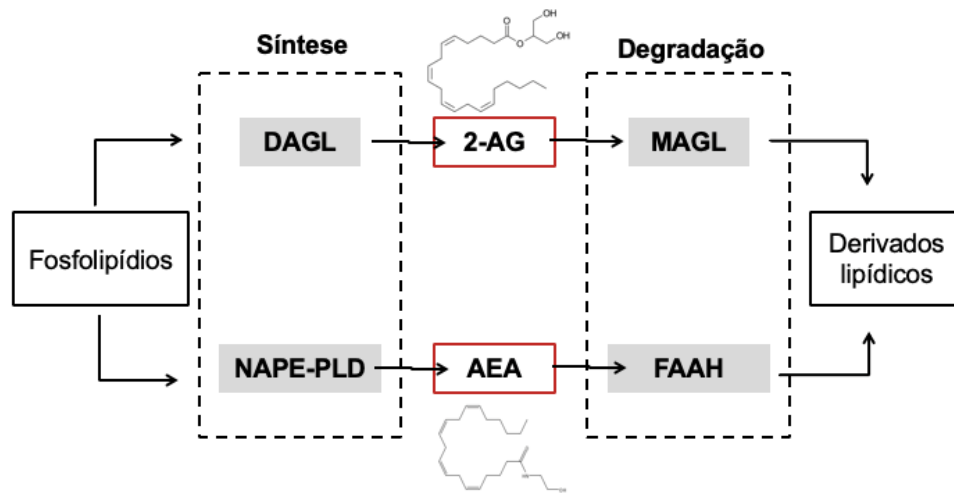
Neste último modelo, os animais apresentam alterações histopatológicas pulmonares, leucopenia, aumento nos níveis de TNF- α e IL-1 β , hipotensão e hiporresponsividade aos vasoconstritores, aumento nos níveis dos metabólitos do NO e na expressão da óxido nítrico sintase induzida (NOS-2). Além disso, há uma acentuada invasão dos pulmões por neutrófilos, sendo bastante visível 6 horas após a inoculação e atingindo o pico 24 horas após a indução do quadro. Uma das vantagens do modelo de pneumosepse é a correlação entre o número de UFC injetadas e a mortalidade, diferente por exemplo do modelo de CLP, onde o número de punções e a quantidade de conteúdo fecal extravasado podem variar entre os experimentadores e influenciar na reprodutibilidade do método. Além disso o modelo de pneumosepse fornece um foco infeccioso definido que evolui para uma infecção disseminada (revisado em Sordi *et al.*, 2013).

1.2 SISTEMA ENDOCANABINOIDE

As primeiras evidências do uso da *Cannabis sativa* datam de 4.000 a.C. e até os dias atuais o uso medicinal da planta vem sendo extensamente estudado (revisado em Bonini *et al.*, 2018). Em meados da década de 60 foram identificados os primeiros e mais abundantes componentes ativos da planta, os fitocanabinoides: canabidiol (CBD) (Mechoulam e Shvo, 1963) e o Δ -9-tetraidrocanabinol (THC), principal constituinte responsável pelos efeitos psicoativos da *cannabis* (Gaoni e Mechoulam, 1964). Em 1990 foi identificado a partir de uma biblioteca de cDNA do córtex cerebral de ratos, o primeiro receptor canabinoide, denominado CB1 (Matsuda *et al.*, 1990), e um segundo receptor canabinoide foi identificado a partir da linhagem celular promielocítica humana em 1993, denominado este de CB2 (Munro, Thomas e Abu-Shaar, 1993). A identificação dos receptores canabinoides levou ao isolamento e caracterização dos seus ligantes endógenos, a aracadoniletanolamida [mais conhecida como anandamida (AEA)] (Devane *et al.*, 1992) e o 2-aracadonilglicerol (2-AG) (Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995), denominados de endocanabinoides, e também as enzimas amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH, do inglês *fatty acid amide hydrolase*) e monoacilglicerol lipase (MAGL) que degradam a AEA e o 2-AG, respectivamente. As extensas pesquisas e descobertas ao longo de 5 décadas, permitiram a caracterização e denominação do sistema endocanabinoide, composto pelos receptores canabinoides CB1 e CB2, seus ligantes endógenos, conhecidos como endocanabinoides e as enzimas responsáveis por sua síntese e degradação (Hourani e Alexander, 2018).

Os principais endocanabinoides, AEA e 2-AG, ativam os receptores CB1 e CB2, sendo a AEA um agonista parcial de CB1 e CB2 e o 2-AG um agonista pleno em ambos os receptores (Pertwee, 2015). São sintetizados a partir de lipídeos de membrana de maneira dependente de cálcio e sob demanda, não sendo, portanto, armazenados. A atividade das enzimas FAAH e MAGL são responsáveis pela degradação de AEA e o 2-AG, respectivamente, dando origem aos seus derivados lipídicos bioativos (Figura 1) (Hourani e Alexander, 2018; Marzo, Di, 2018).

Figura 1. Representação esquemática da síntese e degradação dos endocanabinoides.

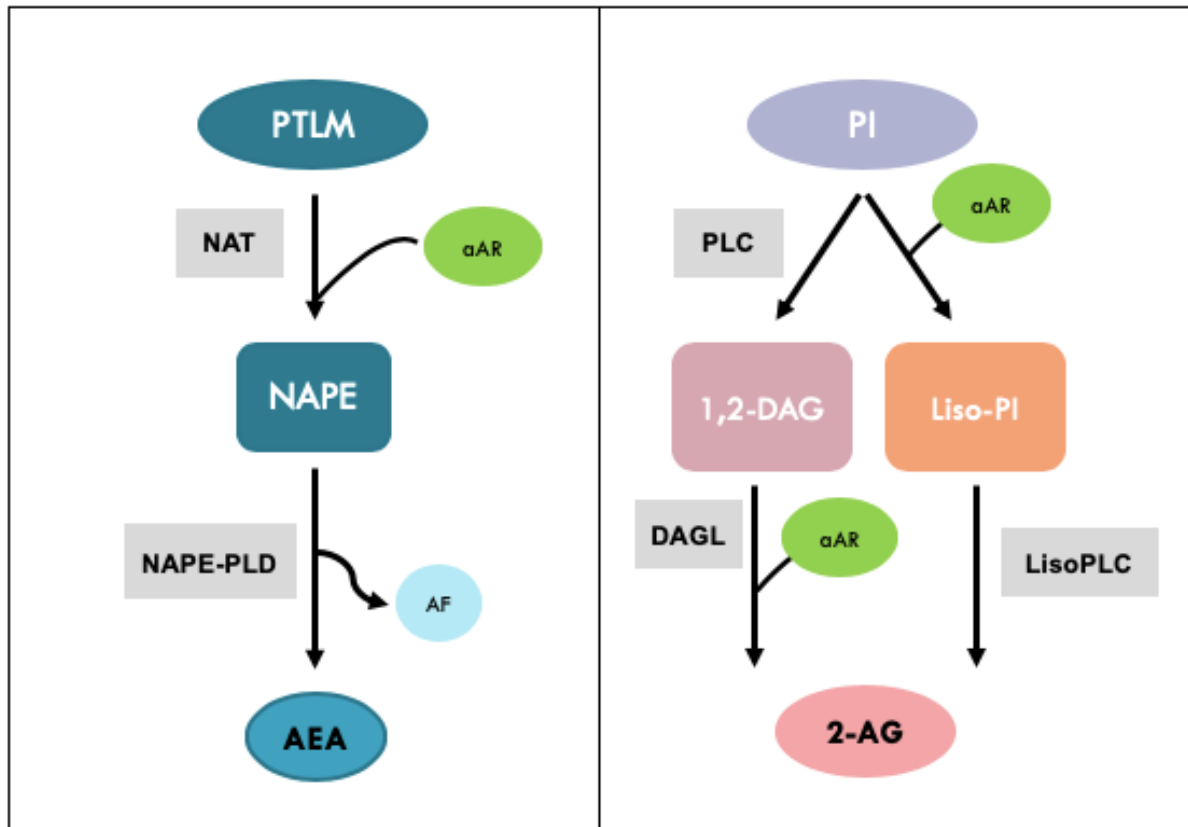


Na figura estão representadas: diacilglicerol lipase (DAGL), NAPE-PLD (do inglês, NAPE-phospholipase D), 2-aracdonilglicerol (2-AG), anandamida (AEA), monoacilglicerol lipase (MAGL) e amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH, do inglês fatty acid amide hydrolase).

Fonte: A autora. Adaptado de Hourani e Alexander, 2018.

A síntese de AEA ocorre através do precursor lipídico fosfatidiletanolamina (PTLM, do inglês *phosphatidylethanolamine*) e da ação da N-acetiltransferase (NAT), levando à formação da N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE, do inglês, *N-acyl-phosphatidylethanolamine*), que é hidrolisada pela NAPE-PLD (do inglês, *NAPE-phospholipase D*) para formação da AEA. O 2-AG é sintetizado através da ação das enzimas diacilglicerol lipases (DAGL- α e DAGL- β). A enzima fosfolipase C (PLC, do inglês *phospholipase C*), atua sobre o precursor lipídico fosfatidilinositol (PI) para formação do 1,2-diacilglicerol (1,2-DAG), que servirá como substrato para a enzima DAGL junto com o ácido araquidônico formarem o 2-AG. Outra via de formação do 2-AG ocorre por meio da fosfolipase A1 (PLA1), que catalisa a formação do lisofosfolípido (liso-PI) a partir do PI. O liso-PI é hidrolisado pela enzima lisofosfolipase C (LisoPLC) levando a formação de 2-AG (Figura 2) (Revisado em Sugiura *et al.*, 2002).

Figura 2. Representação esquemática da síntese dos endocanabinoides.

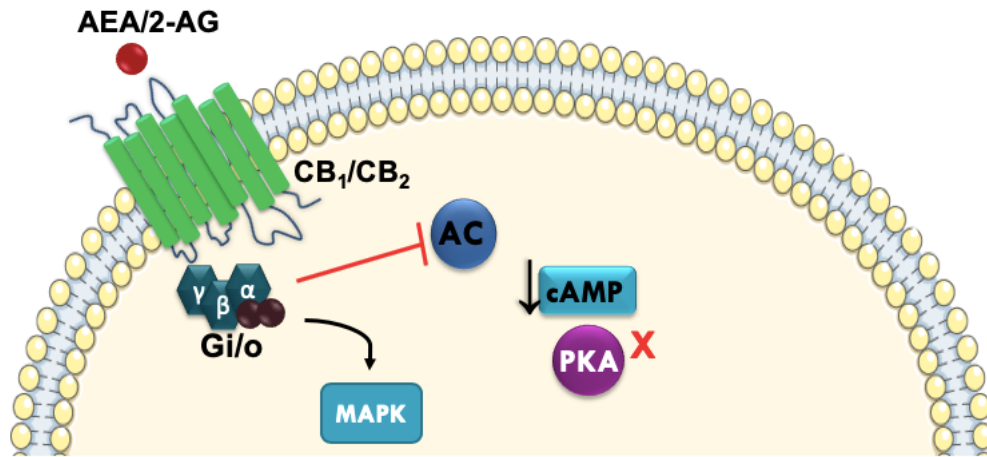


Na figura estão representados: fosfatidiletanolamina (PTLM, do inglês phosphatidylethanolamine), N-acetiltransferase (NAT), ácido araquidônico (aAR), N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE, do inglês, N-acyl-phosphatidylethanolamine), NAPE-PLD (do inglês, NAPE-phospholipase D), ácido fosfático (AF), anandamida (AEA), fosfatidilinositol (PI), fosfolipase C (PLC, do inglês phospholipase C), 1,2-diacilglicerol (1,2-DAG), lisofosfolípido (liso-PI), lisofosfolipase C (LisoPLC) e 2-aracdonilglicerol (2-AG).

Fonte: A autora. Adaptado de Dinu et al., 2020.

Os receptores canabinoides CB1 e CB2 são receptores acoplados a proteína G principalmente do tipo inibitória (Gi/0), ambos os receptores possuem sete domínios transmembrana, um domínio amino-terminal extracelular e um domínio carboxila-terminal intracelular. Após a ativação por seus ligantes, os receptores CB1 e CB2 regulam negativamente a via da adenilil ciclase (AC), reduzindo os níveis de AMP cíclico (AMPC) e, portanto, a ativação da proteína quinase A (PKA) (Howlett, 2005). A ativação dos receptores canabinoides promove também a regulação positiva da cascata de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que está relacionada com a migração, proliferação e apoptose celular, e também com a produção de citocinas inflamatórias (Figura 3)(revisado em Malfitano, 2016). Além disso, os receptores CB1 podem regular positivamente a AC através da proteína G do tipo estimulatória (Gs) e a fosfolipase C (PLC) através de Gq, o que leva ao aumento de cálcio intracelular (Howlett, 2005).

Figura 3. Representação esquemática da via de sinalização dos receptores canabinoides CB1 e CB2.



Na figura estão representados: anandamida (AEA), 2-araconilglicerol (2-AG), proteína G inibitória (Gi/o), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), adenilil ciclase (AC), AMP cíclico (cAMP) e proteína quinase A (PKA). Fonte: a autora.

Os receptores CB1 são expressos principalmente por neurônios centrais e periféricos modulando a liberação de neurotransmissores quando ativados por ligantes endógenos ou exógenos. Estão presentes em áreas associadas ao controle motor, resposta emocional, termogênese, aprendizagem e memória, entre outras (Kano *et al.*, 2009). Os receptores CB1 já foram identificados também em vários tecidos periféricos, tais como o sistema cardiovascular, reprodutivo e no trato gastrointestinal (Pertwee, 1997). Os receptores CB2 são encontrados primariamente nas células do sistema imune, como linfócitos, macrófagos, células mononucleares, mastócitos e microglia, modulando a liberação de citocinas, entre outras ações (Howlett e Abood, 2017; Pertwee, 2015). Estes receptores também estão presentes no SNC (Chen *et al.*, 2017; Jordan e Xi, 2019; Onaivi *et al.*, 2006), no miocárdio (Shmist *et al.*, 2006) e em células endoteliais (Bondarenko *et al.*, 2018; Ramirez *et al.*, 2012; Zoratti *et al.*, 2003).

De forma interessante, estudos recentes têm mostrado que homens e mulheres respondem de maneira diferente aos canabinoides e diferentes densidades de receptores CB1 e CB2 têm sido encontradas em órgãos como coração e cérebro (Farquhar *et al.*, 2019; Piotrowska *et al.*, 2018).

Após a descoberta do THC, mais de 500 compostos foram extraídos da *cannabis*, dentre eles, 150 foram definidos como canabinoides, ou seja, compostos que ativam os receptores canabinoides CB1 e CB2 (Husni *et al.*, 2014). Com base nos aspectos benéficos do THC muitos agentes terapêuticos foram desenvolvidos e alguns deles já são utilizados na

clínica, a Nabilona (agonista sintético CB1 e CB2), por exemplo, foi licenciado em 1981 para o tratamento de náuseas e vômitos em pacientes com câncer, e o fitofármaco Sativex® (THC+CBD) é utilizado para o tratamento da espasticidade relacionada à esclerose múltipla. No Brasil, o Sativex® foi recentemente aprovado pela ANVISA com o nome comercial Mevatyl®, sendo o primeiro medicamento a base de *Cannabis* aprovado em nosso país (revisado em Marzo, Di, 2018).

Os agonistas canabinoides exógenos são divididos em quatro classes distintas, com base na estrutura química dos compostos em: clássicos, não clássicos, eicosanóides e aminoalquilindóis. O grupo clássico é formado por derivados dibenzopiranos tricíclicos, que são compostos que ocorrem naturalmente na planta *C. sativa* e análogos sintéticos, os principais representantes são: o Δ^9 -THC, um agonista parcial CB1 e CB2, e o análogo sintético, 11-hidroxi- Δ^8 -THC-dimetilptil (HU-210), que exibe alta afinidade pelos receptores CB1 e CB2. O grupo não clássico consiste em análogos bicíclicos e tricíclicos do THC, que não possuem anel pirano, representado pelo CP55940. O grupo dos eicosanóides, também chamados de agonistas bicíclicos, é composto pelos canabinoides protótipos, EAE e o 2-AG, e seus análogos sintéticos. Os aminoalquilindóis são representados pelo WIN55212, que se comporta como um agonista completo nos receptores CB1 e CB2, e o agonista seletivo CB2, AM1241 (Pertwee, 2010).

Vários compostos foram desenvolvidos para bloquear a ação de agonistas dos receptores CB1 e CB2. Os antagonistas rimonabanto e seus análogos estruturais AM251 e AM281 são os compostos mais utilizados e com maior afinidade para o receptor CB1, os compostos 6-iodopravadolina (AM630) e o SR144528 são compostos utilizados para bloquear o receptor CB2 (revisado em Pertwee, 2010; Pertwee *et al.*, 2010).

Os endocanabinoides e também os canabinoides exógenos podem ativar outros receptores não-canabinoides, como os receptores PPAR- γ , 5-HT₃, TRPV1, GPR55 e GPR18 (Ho e Kelly, 2017; Munro, Thomas e Abu-Shaar, 1993).

Tabela 2. Principais agonistas e antagonistas canabinoides

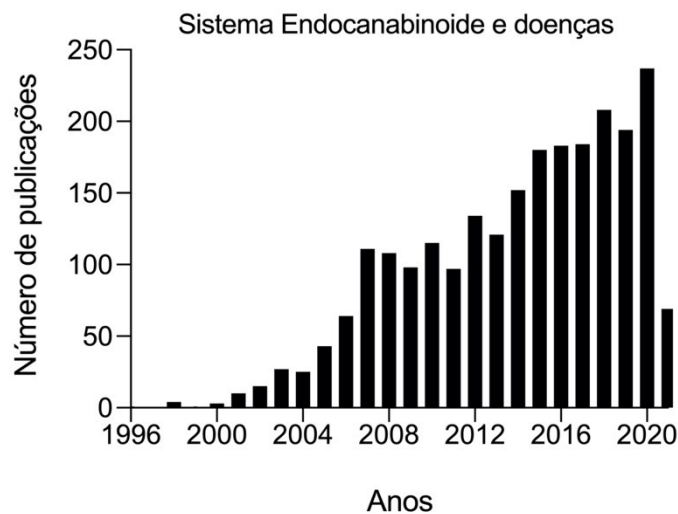
Nome	Alvo	Ação
Δ^9 -THC	CB1/CB2	Agonista
HU-210	CB1/CB2	Agonista
CP55940	CB1/CB2	Agonista
WIN55212	CB1/CB2	Agonista
AM1241	CB2	Agonista
AM630	CB2	Agonista inverso

SR144528	CB2	Antagonista
Rimonabanto	CB1	Antagonista
AM251	CB1	Antagonista
AM281	CB1	Antagonista

1.3 SISTEMA ENDOCANABINOIDE EM CONDIÇÕES PATOLÓGICAS

O sistema endocanabinoide, embora ainda seja muito mais conhecido pelos efeitos psicoativos da Cannabis, vem ganhando bastante importância e chamando atenção nas últimas décadas devido ao seu envolvimento em diversas doenças (Marzo, Di, 2018) (Figura 4). Os receptores canabinoides estão localizados em vários tipos de células e tecidos e participam de diversos processos fisiopatológicos, devido a isso, surgiram muitos estudos identificando o sistema endocanabinoide como uma possível estratégia terapêutica em uma variedade de condições patológicas, como por exemplo, doenças cardiovasculares, gastrointestinais, hepáticas e renais (revisado em Pacher e Kunos, 2013).

Figura 4. Número de publicações ao longo dos anos relacionando sistema endocanabinoide e doenças na base de dados PubMed no período de 1996 a 2020.



Fonte: PubMed

Em relação as terapias que possuem como base a modulação dos receptores canabinoides, os receptores CB2 destacam-se pois não apresentam os efeitos psicotrópicos que geralmente estão relacionados com as terapias baseadas no receptor CB1 (revisado em Dhopeswarkar e Mackie, 2014). Agonistas CB2 tem sido apontados como possível terapia em condições como aterosclerose, dano de isquemia e reperfusão, fibrose renal e hepática, câncer e osteoporose (revisado em Dhopeswarkar e Mackie, 2014). Em determinadas patologias, a

expressão dos receptores CB2 está alterada e a ativação desses receptores resultou em um promissor efeito terapêutico. Como por exemplo, animais submetidos ao modelo de obesidade e nefropatia diabética apresentaram expressão diminuída dos receptores CB2 e o tratamento com agonista CB2 AM1241 melhorou a progressão do dano renal associado a essas patologias. Além disso, a ativação dos receptores CB2 atenuou a inflamação, através da redução de citocinas inflamatórias e diminuição da infiltração de células (Barutta *et al.*, 2011; Jenkin *et al.*, 2016).

A disfunção endotelial é comumente associada à regulação negativa da função endotelial. A hiperpolarização das células endoteliais em resposta a estímulos dependentes do endotélio depende do influxo de cálcio e estimulação dos canais de potássio, sendo fundamental para a regulação da função vascular. Em um modelo animal de aterosclerose (camundongos deficientes de apolipoproteína E (ApoE)), utilizando a técnica de *patch-clamp*, foi demonstrado que a regulação positiva dos receptores CB2 é capaz de influenciar no potencial de membrana, o tratamento com o agonista CB2 AM1241 desencadeou uma hiperpolarização das células endoteliais dependente do influxo de cálcio e estimulação dos canais de potássio (Bondarenko *et al.*, 2018). Nesse sentido, a regulação positiva dos receptores CB2 demonstra exercer efeitos positivos também na função vascular, entretanto, não se sabe ao certo os mecanismos envolvidos.

1.3.1 SISTEMA ENDOCANABINOIDE E SEPSE

O sistema endocanabinoide através de seus efeitos na inflamação e no sistema imunológico apresenta ser uma importante via de sinalização na sepse, principalmente devido as diversas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antiapoptóticas relacionadas aos receptores CB1 e CB2 (Revisado em Dinu *et al.*, 2020). Os receptores CB2 especialmente, têm chamado atenção por possuírem um importante papel como moduladores das respostas imunes, principalmente devido à sua alta expressão em células imunes e por estarem relacionados à regulação da migração, proliferação e diferentes funções efetoras dessas células (revisado em Basu, Sreemanti and Dittel, 2016).

O envolvimento da sinalização canabinoide vem sendo amplamente estudado, diversos trabalhos presentes na literatura demonstram os efeitos da modulação dos receptores CB1 e CB2 na sepse. Leite-Avalca e colaboradores avaliaram os efeitos do tratamento com Rimonabanto (antagonista CB1) em animais submetidos ao modelo de CLP. Foi observado redução em determinados marcadores de falência de órgãos, como CK-MB (isoenzima MB da

creatina quinase) e lactato, sugerindo que o Rimonabanto pode contribuir para a redução da falência de órgãos associada à sepse. Esse mesmo grupo mostrou também que o bloqueio dos receptores CB1 melhorou a taxa de sobrevivência de animais CLP quando comparados ao grupo que recebeu apenas veículo (Leite-Avalca *et al.*, 2019; Mariane Leite, 2016).

Um dos efeitos já conhecidos em relação à modulação dos receptores canabinoides na sepse é a regulação de citocinas inflamatórias. Çakır *et al.*, 2020 avaliaram os efeitos da ativação CB2 utilizando o agonista JWH-133 em animais submetidos ao modelo de CLP, e observaram uma diminuição nos níveis séricos de IL-6 e IL-1 β e também diminuição na expressão de TNF- α , IL-6, IL-1 β e NF- κ B no cérebro, pulmão, fígado e coração dos animais que receberam o tratamento com o agonista. Além disso observaram uma importante diminuição das lesões histológicas nos mesmos tecidos desses animais.

Recentemente Liu e colaboradores (2020) demonstraram que a ativação CB2 reduziu a lesão pulmonar em camundongos sépticos, e observaram redução das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-18 e IL-1 β . Utilizando o modelo de endotoxemia e avaliações *in vitro*, Rajesh *et al.*, 2007 demonstraram que a ativação CB2 foi capaz de induzir alterações nas vias de sinalização que regulam a produção de mediadores inflamatórios, como por exemplo, a atenuação da ativação de RHO-A e NF- κ B, além de diminuir a expressão de moléculas de adesão, ICAM-1 e VCAM-1. A regulação da expressão de moléculas de adesão através do tratamento com agonistas CB2 também foi observada no modelo de encefalite (Ramirez *et al.*, 2012) demonstrando que a ativação CB2 é capaz de reduzir a adesão de leucócitos e portanto de influenciar as interações endotélio-leucócitos.

Em animais submetidos ao modelo de CLP, o tratamento com agonista CB2 aumentou a sobrevivência de animais e diminuiu a bacteremia, o dano pulmonar e o recrutamento de neutrófilos (Tschöp *et al.*, 2009). Gui *et al.*, 2013 demonstraram que animais *knockout* para CB2 submetidos ao modelo de LPS apresentaram maior mortalidade, e os tratados com agonistas CB2 apresentaram um aumento na taxa de sobrevivência, sugerindo um papel protetor dos receptores CB2 na sepse. No modelo de endotoxemia induzida por LPS, o tratamento com HU308 (agonista dos receptores CB2) reduziu o recrutamento de leucócitos e o número de células aderentes na microvasculatura intestinal (Lehmann *et al.*, 2012; Sardinha *et al.*, 2014).

Os receptores CB2 desempenham papel importante na modulação da resposta imune e dos processos inflamatórios, sendo que a ativação dos receptores CB2 promove, por exemplo, redução no recrutamento de neutrófilos e da quimiotaxia, e regulação das citocinas

inflamatórias e, assim, portanto, podem representar uma nova alternativa terapêutica na sepse. Entretanto, os mecanismos pelos quais exercem seus efeitos na resposta inflamatória ainda precisam ser melhor elucidados.

2 HIPÓTESE

A ativação de receptores CB2 reduz as alterações inflamatórias e a lesão pulmonar associadas a um modelo experimental de sepse induzida por pneumonia.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve dois objetivos principais:

- Avaliar a diferença nas respostas de machos e fêmeas frente ao modelo de pneumosepse
- Avaliar o perfil de expressão dos receptores CB2 no pulmão e o efeito da ativação de receptores CB2 nas alterações inflamatórias de camundongos submetidos a um modelo de sepse por pneumonia.

Como objetivos específicos, temos:

- 1) Avaliar a disfunção orgânica ao longo do tempo pela determinação de marcadores de dano de órgãos no sangue e plasma de camundongos machos e fêmeas após a indução da sepse por pneumonia;
- 2) Avaliar a disfunção pulmonar induzida pelo modelo de pneumosepse ao longo do tempo em machos e fêmeas através da migração de células inflamatórias e extravasamento de proteínas;
- 3) Avaliar a expressão do receptor CB2 nos pulmões de camundongos machos e fêmeas 6, 24 e 48 h após a indução da sepse por pneumonia;
- 4) Avaliar os efeitos da ativação de receptores CB2 nas alterações pulmonares observadas nos objetivos específicos 2, na carga bacteriana e na atividade da enzima mieloperoxidase;
- 5) Estudar os mecanismos pelos quais a ativação CB2 exerce os efeitos esperados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas, com idade entre 70-90 dias, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro (12 h/ 12 h) e com livre acesso à comida e água. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC), projeto número 9074250219.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Modelo experimental de sepse por pneumonia (pneumosepse)

4.2.1.1 Padronização do lote e quantificação da bactéria

Para realizar a indução do quadro de pneumosepse utilizamos a bactéria *K. pneumoniae* (ATCC 700603 – *American Type Culture Collection*, Rockville, MD.) após o aumento da virulência pela passagem repetida (10 no total) em camundongos C57Bl6.

A expansão do lote foi realizada a partir do crescimento de uma alíquota de *K. pneumoniae* liofilizada em meio BHI (*Brain and Heart Infusion Broth*) por um período de 18 horas a 37°C . Após este tempo, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 2200 g em temperatura ambiente (TA), o sobrenadante desprezado e as bactérias foram ressuspensas em 45 mL de BHI quando então foram armazenadas em alíquotas de 500 μL à -80°C . Três alíquotas aleatórias foram plaqueadas em ágar Mueller Hinton (MH) e incubada por 24 horas a 37°C para confirmar a ausência de contaminação da cultura.

Para a quantificação, realizamos o crescimento de uma alíquota de bactéria em meio BHI por 18 horas a 37°C . Após este tempo, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 2200 g em temperatura ambiente, o sobrenadante foi desprezado e as bactérias ressuspensas em 30 mL de PBS estéril para retirada do meio, então o tubo foi novamente centrifugado. No final da segunda lavagem, o *pellet* resultante foi ressuspenso com auxílio de um agitador de tubos tipo *Vortex*. Foram realizadas 8 diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}) em PBS estéril. Foram retirados 100 μL das diluições de 10^{-8} e 10^{-9} que foram plaqueadas em ágar MH para determinar a contagem das colônias de bactérias (em unidades formadoras de colônia por mililitro; UFC/ml) e também realizada a leitura da densidade óptica (D.O.) em 600 nm. A partir

desses dados obteve-se um gráfico relacionando a D.O. com o número de UFC/mL, o qual foi utilizado para estimar por regressão linear a quantidade de colônias de bactérias para as demais alíquotas desse mesmo lote.

4.2.1.2 Inoculação das bactérias nos animais

O modelo de pneumosepse foi realizado conforme descrito previamente (Sordi et al., 2013). Um dia antes de realizar a inoculação de bactérias nos animais, alíquotas de *K. pneumoniae* individuais foram descongeladas, colocadas em tubos falcon contendo 45 mL de meio BHI e incubadas por 18 horas a 37°C. Após este tempo, o tubo foi centrifugado e o *pellet* resultante foi ressuspensão em 30 mL de PBS estéril. Este processo foi realizado duas vezes. A quantidade de bactérias foi determinada através de regressão linear pela interpolação da medida da absorbância obtida em 600 nm no gráfico obtido conforme descrito no item 4.2.2.1. A suspensão de bactérias foi diluída em PBS estéril para se obter a quantidade desejada de UFC para inoculação.

Para a inoculação das bactérias, a indução da anestesia nos camundongos foi feita com isoflurano 5%, seguido pela manutenção anestésica via máscara facial com isoflurano 3%. Os animais foram dispostos na posição supino inclinada (45°) e após a confirmação da ausência de reações e estímulos, assepticamente foi realizada uma pequena incisão de 5 mm na pele na região ventral do pescoço. A musculatura foi levemente afastada para a identificação da traqueia, onde foram injetados 50 µL de uma suspensão de *K. pneumoniae* (via intratraqueal; i.t.). A pele foi suturada e os animais receberam PBS estéril aquecido (30 mL/Kg, 37°C) pela via subcutânea, para reposição volêmica. Os animais foram mantidos a 37°C até recuperação da anestesia e alocados em ambiente com temperatura e luz controlados. Animais *naïve*, isto é, sem qualquer manipulação, foram utilizados como controle.

4.2.2 Grupos experimentais e protocolo de tratamento

Na primeira etapa do estudo os animais foram divididos nos seguintes grupos: *naïve* (utilizados como controle) e camundongos machos e fêmeas submetidos ao modelo de sepse por pneumonia.

Machos	Fêmeas
<i>naïve</i>	<i>naïve</i>
Pneumosepse 6 h	Pneumosepse 6 h
Pneumosepse 24 h	Pneumosepse 24 h
Pneumosepse 48 h	Pneumosepse 48 h

De acordo com os resultados obtidos na primeira etapa, foram definidos os seguintes grupos para realização da segunda etapa:

Machos
Pneumosepse 24 h + veículo
Pneumosepse 24 h + agonista CB2

4.2.2.1 *Tratamentos farmacológicos*

O agonista CB2 – AM1241 foi armazenado na forma de pó e conservado em freezer a -20°C. No momento do experimento, foi preparada uma solução de AM1241 em dimetilsulfoxido (DMSO) (6%). Como veículo foi utilizada uma solução de DMSO (6%) em PBS (do inglês, *Phosphate buffered saline*; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM e NaHPO₄ 8,1 mM; pH 7,4). O agonista AM1241 (0,3 ou 3 mg/kg) ou veículo foi administrado via intraperitoneal (i.p.), 6 e 12 horas após a indução da pneumosepse.

4.2.3 **Obtenção de amostras de sangue, lavado broncoalveolar e tecidos**

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (150 e 15 mg/kg; i.p.; respectivamente) para a coleta de sangue, tecidos e lavado broncoalveolar (BAL). Após confirmação da ausência de estímulos, foi realizada uma pequena abertura na cavidade torácica e aproximadamente 1 mL de sangue foi coletado por punção cardíaca em um tubo contendo heparina (5 UI/mL de sangue). As amostras de sangue foram primeiramente processadas no equipamento automatizado para contagem total e diferencial de células, e logo após centrifugadas por 10 minutos a 3000 g para obtenção do plasma, o qual foi imediatamente congelado e armazenado a - 80°C para posteriores análises.

Após a coleta de sangue, a traqueia dos animais foi exposta, um cateter (21 G) acoplado a uma seringa foi introduzido e 1 mL de PBS estéril foi vagarosamente injetado nos pulmões dos animais, sendo em seguida o BAL aspirado de volta à seringa. Este procedimento foi repetido 3 vezes e apenas as amostras nas quais o volume recuperado foi de pelo menos 80% foram analisadas.

Uma alíquota das amostras de BAL foi reservada para contagem de leucócitos e o restante foi centrifugado por 10 minutos a 3000 g. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a - 80°C.

Para a obtenção dos tecidos de interesse destinados para as análises por *western blotting*, os animais foram perfundidos com solução salina (NaCl 0,9%; 4°C), em seguida os tecidos foram coletados, lavados com solução salina e congelados em nitrogênio líquido.

4.2.4 Contagem total e diferencial de células

Amostras de BAL foram diluídas em líquido de Türk (2%), na proporção (1:2) e realizada a contagem total de células em câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial de leucócitos, foram feitas lâminas através da técnica de citocentrifugação (Cytospin) as quais foram coradas utilizando um conjunto de reagentes (Panótico rápido, Laborclin, Vargem Grande, Pinhais, PR, BR). O número de leucócitos nas amostras foi expresso como células x 10^6 /mL de BAL.

A contagem total e diferencial de células sanguíneas foi realizada através de equipamento automatizado (*Horiba, ABX® Micros 60; Montpellier, França*).

4.2.5 Dosagem de proteínas no lavado broncoalveolar

A quantidade de proteínas totais no BAL foi estimada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). O ensaio foi realizado através da curva padrão de proteína com albumina bovina sérica (BSA) nas concentrações entre 0 – 250 μ g/mL. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 595 nm (*SpectraMax® Paradigm®, Molecular Devices, EUA*).

4.2.6 Dosagem de nitrato e nitrito (NO_x)

A dosagem de nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻) permite quantificar de maneira indireta os níveis de NO através da utilização do reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftil- etilenodiamina em água de Milli-Q) como previamente descrito em GRANGER et al. (1990).

As amostras de plasma foram diluídas em água destilada (1:2) e desproteinizadas pela adição do sulfato de zinco (ZnSO₄, 20%), incubadas em banho de gelo por 60 minutos e então centrifugadas (9000 g por 15 minutos; 4°C). Os sobrenadantes límpidos foram separados e as amostras incubadas durante 3 horas à 37°C na presença da bactéria *Escherichia coli* crescida em anaerobiose que expressa a enzima nitrato redutase, permitindo a conversão de nitrato em nitrito. As amostras foram centrifugadas (9000 g por 15 minutos) para remoção das bactérias, 100 μ l dos sobrenadantes foram coletados e transferidos para uma placa de 96 poços e misturados com o reagente de Griess na proporção 1:2. Foi realizada a leitura da absorbância

em 540 nm. Os níveis de NO_x na amostra foram estimados a partir de uma curva padrão de nitrito (0-150 µM) e calculados por meio da interpolação na equação da reta e expressos como µM de NO_x.

4.2.7 Determinação de marcadores de dano de órgãos

As enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram determinadas no plasma dos animais utilizando o equipamento Dimension RxL Max HM (Siemens Healthineers, Erlanger, BY, Alemanha). As dosagens foram feitas a partir de kits comerciais da Siemens, de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de AST e ALT foram determinados em U/L.

4.2.8 Imunoeletroforese - Western blotting

4.2.8.1 Preparo das amostras – extração total

As amostras de tecido pulmonar foram obtidas e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido, conforme descrito no item 4.2.3. Após a pulverização de cada tecido foi adicionado tampão de lise [(Na₂VO₄ 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM, coquetel de inibidores de proteases 1% (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA; P8340) em T-Per (*Tissue Protein Extraction Reagent*; Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), que promove a ruptura das células do tecido para a extração das proteínas. Em seguida as amostras foram homogeneizadas por sonicação (60 Watts, 10 segundos). Após 1 hora de incubação, os homogenatos foram centrifugados a 9000 g por 20 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi obtido. Foi separada uma alíquota do sobrenadante para a quantificação das proteínas das amostras, realizada através do ensaio de Bradford conforme já descrito no item 4.2.5. Foi feita a desnaturação das proteínas no restante do sobrenadante através da adição do tampão de amostra (glicerol 25%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%). As amostras foram fervidas (95 °C, 10 minutos) e permaneceram armazenadas a -80 °C até o momento da eletroforese.

4.2.8.2 Preparo das amostras – extração fração nuclear e citoplasmática

A extração da fração citoplasmática e nuclear foi realizada para determinar a densidade do NF-κB no tecido pulmonar. Após a pulverização de cada tecido foi adicionado tampão de lise [(Hepes 20 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 0,5 mM, EGTA 1mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM, coquetel de inibidores de proteases 1% (Sigma-Aldrich Co. LLC, St.

Louis, MO, EUA; P8340) em TRITON-X 100 (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA)]. Em seguida os homogenatos foram centrifugados a 1320 g por 5 minutos, a 4°C e o *sobrenadante 1* e *pellet 1* foram separados. O *sobrenadante 1* foi centrifugado a 9000 g por 40 minutos, a 4°C, e após centrifugação o *sobrenadante 2* obtido foi separado para posterior determinação das proteínas citosólicas. O *pellet 1* foi ressuscitado em tampão de extração [(Hepes 20 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, EGTA 1mM, 20% glicerol, fluoreto de fenilmetano-sulfonil (PMSF) 100 mM, coquetel de inibidores de proteases 1% (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA; P8340) em NaCl)] e incubado por 30 minutos no gelo. Após incubação, as amostras foram centrifugas a 9000 g por 20 minutos, a 4°C e o *sobrenadante 3* obtido foi separado para determinação das proteínas nucleares. Uma alíquota de cada um dos sobrenadantes foi separada para a quantificação das proteínas das amostras, realizada através do ensaio de Bradford conforme já descrito no item 4.2.5. No restante dos sobrenadantes foi feita a desnaturação das proteínas através da adição do tampão de amostra (glicerol 25%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%). As amostras foram fervidas (95 °C, 10 minutos) e permaneceram armazenadas a -80 °C até o momento da eletroforese.

4.2.8.3 Separação de proteínas e imunodeteção

As amostras foram submetidas à eletroforese utilizando um gel de separação (acrilamida 7%, bis-acrilamida 0,2%, Tris 1.5 M, SDS 0,1%, persulfato de amônia 0,04% e TEMED 0,06%) e um gel de entrada (acrilamida 5%, Tris 0.5 M, SDS 0,1%, persulfato de amônia 0,04% e TEMED 0,06%), que separam as proteínas de acordo com o peso molecular. As amostras de tecido pulmonar (60 microgramas/poço), células Jurkat (50 microgramas/poço) (utilizadas como controle positivo do anticorpo anti-CB2) o padrão de peso molecular (*Precision Plus Protein Standards*, Kaleidoscope, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, Estados Unidos) foram aplicados nos géis com auxílio de pipeta automática. A eletroforese foi realizada em uma cuba específica (90 V; ~ 3 horas) e logo após, as proteínas presentes no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (100 V; 1 hora; 4 °C). As membranas foram coradas com vermelho de Ponceau 0,2% (v/v) em ácido tricloacético 3% (v/v) para visualização e controle da transferência das proteínas, e lavadas três vezes (10 minutos), sob agitação, com TBS-T (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 (0,05%; v/v), pH 7,5) para retirada do corante. Então foram incubadas por 1 hora sob agitação, com solução para bloqueio das possíveis ligações inespecíficas (leite desnatado 5% em TBS-T; TA), e posteriormente

incubadas com os anticorpos primários específicos anti-CB2 (1:1000; policlonal; Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA, cat n. 101550) , anti-NOS2 (1:750; policlonal; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA, cat n. 650), NF- κ B p65 (policlonal; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA, cat n. 372) ou anti-beta-actina (1:45000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), por 18 horas a 4 °C, sob agitação. Depois, foram realizadas três lavagens (10 minutos), sob agitação, com TBS-T, e as membranas foram incubadas com um anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase específico para cada anticorpo primário (1:5000; CellSignalling Tech, Danvers, MA, EUA). Novamente foram realizadas três lavagens, e os imunocomplexos foram revelados através da técnica de quimioluminescência usando um sistema de fotodocumentação (ChemiDoc MP, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA). As análises quantitativas foram determinadas através da densitometria das bandas através do programa ImageLab™ software (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA), e a normalização foi realizada utilizando os valores obtidos para as bandas de actina.

4.2.9 Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias nas amostras de BAL

As amostras de BAL foram coletadas conforme o item 4.2.3, entretanto todo o procedimento foi feito em condição estéril. Após a coleta, foram feitas diluições seriadas das amostras de BAL (fator 10), e foram semeados 10 μ L em placas de Petri contendo meio ágar MH. Após a semeadura, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e foi realizada a contagem do número de colônias, expressa como logaritmo das UFC por mL (log de UFC/mL).

4.2.10 Medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em pulmão

As amostras de tecido pulmonar foram obtidas e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido, conforme descrito no item 4.2.3. Os tecidos foram pulverizados e homogeneizados em tampão fosfato 20 mM (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄; pH 7,4; 4°C) e em seguida as amostras foram centrifugadas (13.000 g, 10 minutos, 4°C). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em tampão fosfato 50 mM + 0,5 % de HTAB (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, 0,5% de HTAB; pH 6,0; 4°C), e as amostras foram centrifugadas novamente (13.000 g, 10 minutos, 4°C). O sobrenadante resultante foi utilizado para o ensaio de determinação da atividade da enzima MPO como indicador da presença de neutrófilos

ativados. Para o ensaio enzimático foram utilizados 30 µl do sobrenadante, e a reação foi desenvolvida na presença de tetrametilbenzidina (TMB) 1,6 mM e H₂O₂ 0,3 mM. A absorbância foi medida em um leitor de placas a 650 nm. A quantidade de proteína foi determinada pelo método de BCA e os valores apresentados na forma de unidades de densidade óptica (D.O) / g de proteína.

4.3 REAGENTES

Neste estudo foram utilizados os seguintes compostos: BHI (HiMedia, Mumbai, Índia) e Muller Hinton (Kasvi, Itália); Isoflurano (BioChimico do Brasil Ltda., Brasil) e cloridrato de xilazina e cloridrato de cetamina (Syntec do Brasil Ltda., Brasil); bicarbonato de sódio (NaHCO₃), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de potássio (KH₂PO₄), fosfato de sódio (NaHPO₄) (Merck, Brasil); heparina sódica (Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP); Panótico rápido (Laborclin, PR, Brasil); Reagente de Bradford (Bio-rad, São Paulo, SP); Triton X-100 (Thermo Fisher, MA, EUA); AM1241 [2-iodo-5-nitrophenyl-(1-(1-methylpiperidin-2-ylmethyl)-1H-indol-3-yl)methanone] e anticorpo anti-CB2 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA), anticorpos anti-NOS2, NF-κB p65 e anti-beta-actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA).

4.4 ANÁLISE ESTÁTISTICA

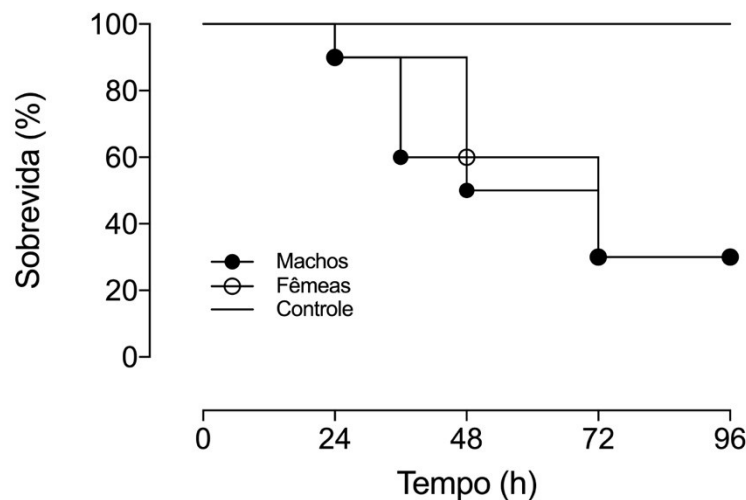
Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média. Para as análises estatísticas paramétricas a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a variância pelo teste de Bartlett. Quando necessário, os valores foram transformados em logaritmos para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. Foram empregados o teste t de *Student* ou ANOVA de uma via seguido de *post hoc* de Dunnet, conforme descrito nas legendas das figuras e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA).

5 RESULTADOS

5.1 SOBREVIDA APÓS INOCULAÇÃO DE *K. PNEUMONIAE*

Inicialmente determinamos a relação da inoculação de 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae* com a sobrevivência de animais machos e fêmeas ao longo do tempo. A quantidade de UFC foi escolhida com base em estudos prévios do nosso grupo (Sordi, *et al.*, 2013). O grupo de animais machos apresentou 50% de sobrevivência 48 horas após a inoculação da bactéria, e o grupo das fêmeas apresentou 60% de sobrevivência (Figura 5), não havendo diferença estatística entre os grupos ao final de 96 horas.

Figura 5 – Curva de sobrevivência de camundongos machos e fêmeas inoculados com *K. pneumoniae*



Os animais foram inoculados (i.t.) com 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae* e a sobrevivência foi avaliada por 96 horas. Os resultados foram expressos como porcentagem de sobrevivência ($n = 10$). Os animais machos estão representados através dos círculos fechados e as fêmeas círculos abertos.

5.2 DISFUNÇÃO ORGÂNICA INDUZIDA PELA PNEUMOSEPSE

Para a caracterização do modelo experimental de sepse em camundongos, foi realizada a avaliação de leucócitos sanguíneos, marcadores plasmáticos de dano hepático (ALT e AST) e quantificação do NOx plasmático. Como observamos na Tabela 3, os machos sépticos desenvolveram leucopenia 6 horas após a infecção, a qual persistiu por até 48 horas. A leucopenia foi causada principalmente pela redução no número de linfócitos. Foi também observada disfunção hepática pelo aumento nos níveis de AST em 48 horas, e embora observado um aumento na produção de NOx 48 horas após a indução do quadro, este resultado não foi estatisticamente significativo. Na tabela 4 estão apresentados os resultados das fêmeas,

podemos observar que os animais sépticos apresentaram uma leve leucopenia 6 e 24 horas após a infecção, e que foi mais acentuada em 48 horas. Da mesma forma que nos machos, a leucopenia foi causada principalmente pela redução no número de linfócitos. Foi observada também disfunção hepática devido ao aumento nos níveis de AST em 24 horas.

Tabela 3 – Marcadores de disfunção orgânica de camundongos machos inoculados com *K. pneumoniae*

	Pneumosepse			
	Controle	6 h	24 h	48 h
Leucócitos/mm³ de sangue (x10⁶)	5,86 ± 1,89 (n=10)	3,7 ± 2,01* (n=10)	2,97 ± 2,21* (n=10)	1,99 ± 0,81* (n=9)
Linfócitos/mm³ de sangue (x10⁶)	4,42 ± 1,69 (n=10)	2,29 ± 1,18* (n=10)	1,87 ± 1,56* (n=10)	0,94 ± 0,26* (n=9)
Monócitos/mm³ de sangue (x10⁶)	0,35 ± 0,14 (n=10)	0,33 ± 0,21 (n=10)	0,20 ± 0,17 (n=10)	0,14 ± 0,10* (n=9)
Granulócitos/mm³ de sangue (x10⁶)	1,32 ± 0,68 (n=10)	1,52 ± 1,35 (n=10)	1,39 ± 0,98 (n=10)	1,58 ± 0,94 (n=9)
Alanina Aminotransferase (U/L)	42,4 ± 13,0 (n=10)	47,3 ± 27,2 (n=9)	41,5 ± 12,7 (n=8)	49,2 ± 27,7 (n=9)
Aspartato Aminotransferase (U/L)	83,1 ± 46,1 (n=10)	103,5 ± 35,2 (n=9)	111,6 ± 23,7 (n=8)	156,5 ± 91,5* (n=9)
NOx (µM)	23,3 ± 8,07 (n=12)	44,7 ± 33,1 (n=8)	49,0 ± 22,1 (n=10)	101,1 ± 68,1 (n=10)

Seis, 24 h e 48 h após a inoculação (i.t.) de 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e o sangue foi coletado, o plasma foi utilizado para determinação dos marcadores de disfunção orgânica. O número de leucócitos sanguíneos, marcadores plasmáticos de dano hepático (ALT e AST) e o NOx são mostrados na tabela. Os valores representam a média ± desvio padrão. O número de animais está indicado na tabela. *p < 0,05 em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett).

Tabela 4 – Marcadores de disfunção orgânica de camundongos fêmeas inoculadas com *K. pneumoniae*

	Pneumosepse			
	Controle	6 h	24 h	48 h
Leucócitos/mm ³ de sangue (x10 ⁶)	5,62 ± 1,29 (n=8)	4,34 ± 2,44 (n=8)	3,40 ± 2,60 (n=7)	2,95 ± 1,30* (n=8)
Linfócitos/mm ³ de sangue (x10 ⁶)	4,52 ± 1,18 (n=8)	3,01 ± 1,64 (n=8)	2,30 ± 1,86* (n=7)	1,35 ± 0,47* (n=8)
Monócitos/mm ³ de sangue (x10 ⁶)	0,43 ± 0,12 (n=8)	0,49 ± 0,24 (n=8)	0,32 ± 0,26 (n=7)	0,27 ± 0,14 (n=8)
Granulócitos/mm ³ de sangue (x10 ⁶)	0,39 ± 0,12 (n=8)	0,64 ± 0,48 (n=8)	0,62 ± 0,41 (n=7)	1,26 ± 0,87 (n=8)
Alanina Aminotransferase (U/L)	46,6 ± 14,4 (n=8)	32,2 ± 17,6 (n=8)	57,5 ± 43,2 (n=8)	43,2 ± 40,8 (n=7)
Aspartato Aminotransferase (U/L)	89,3 ± 20,7 (n=8)	115,5 ± 24,5 (n=8)	142,7 ± 26,5* (n=7)	131 ± 99,1 (n=7)
NOx (µM)	41,0 ± 36,2 (n=6)	37,0 ± 21,4 (n=8)	91,8 ± 62,7 (n=8)	83,2 ± 46,3 (n=6)

Seis, 24 h e 48 h após a inoculação (i.t.) de 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e o sangue foi coletado, o plasma foi utilizado para determinação dos marcadores de disfunção orgânica. O número de leucócitos sanguíneos, marcadores plasmáticos de dano hepático (ALT e AST) e o NOx são mostrados na tabela. Os valores representam a média ± desvio padrão. O número de animais está indicado na tabela. *p < 0,05 em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett).

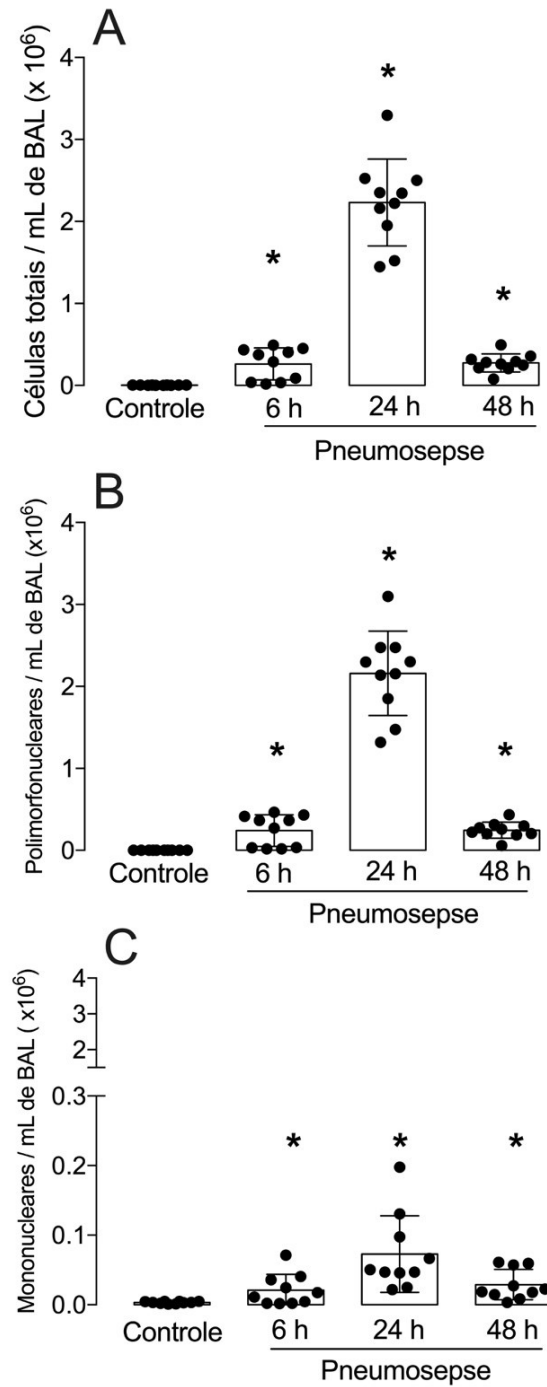
5.3 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS NO BAL

Tanto em camundongos machos (Figura 6A) como em fêmeas (Figura 7A), o número de células que migraram para o foco infeccioso foi significativamente elevado 6 horas após indução do quadro, sendo o pico no tempo de 24 horas. Os machos apresentaram infiltrado composto de células polimorfonucleares (Figura 6B) e mononucleares (Figura 6C), já o infiltrado das fêmeas foi composto principalmente de células polimorfonucleares (Figura 7B).

A Figura 8 compara os resultados obtidos de machos e fêmeas, podemos observar que o número de células totais é diferente entre machos e fêmeas do grupo controle e 24 horas após a indução (Figura 8A). Os machos apresentam um pico de células polimorfonucleares em 24 horas maior que as fêmeas (Figura 8B).

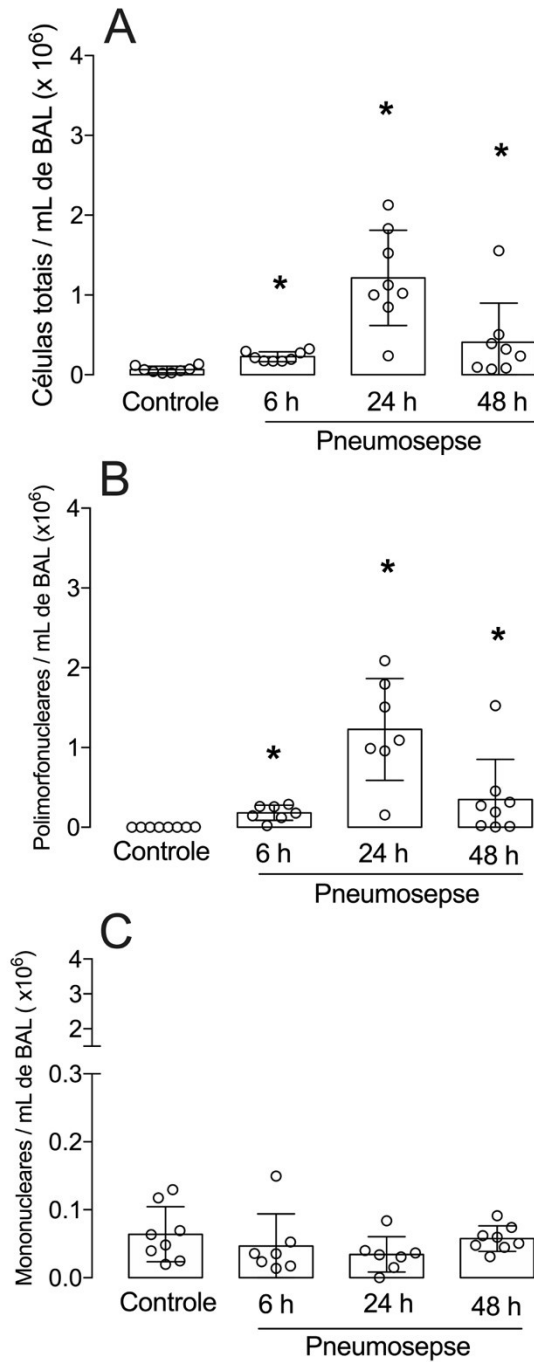
As fêmeas do grupo controle e 48 horas apresentaram um maior número de células mononucleares quando comparadas aos machos (Figura 8C).

Figura 6 - Células do lavado broncoalveolar de camundongos machos inoculados com *K. pneumoniae*



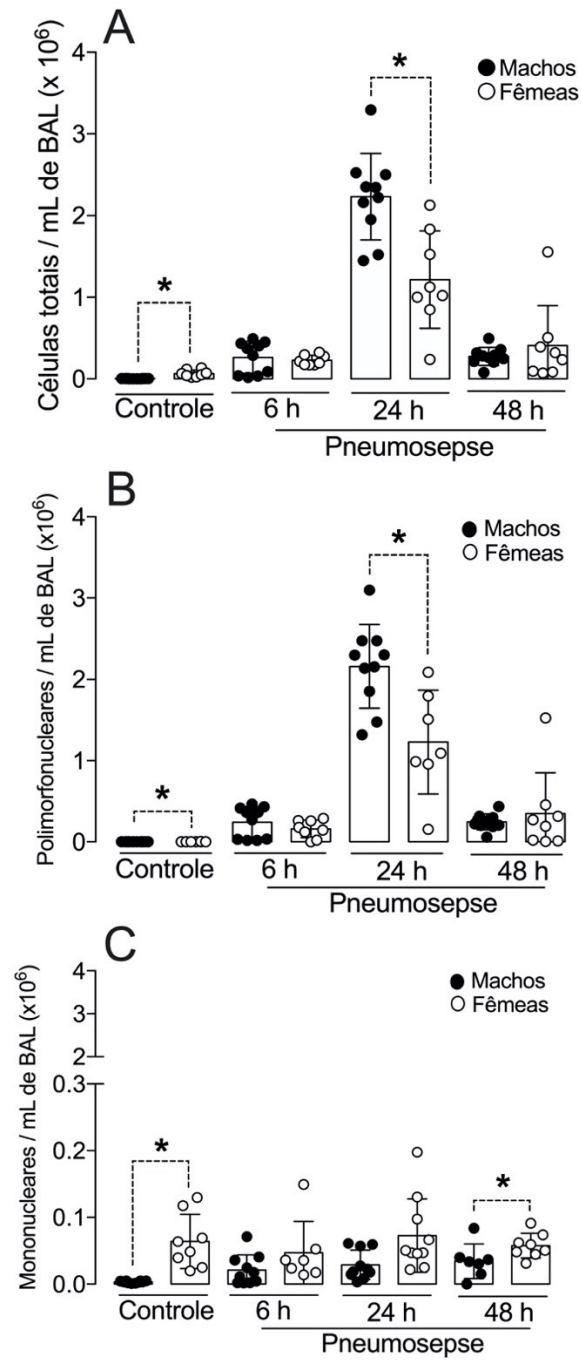
Seis, 24 h e 48 h após a inoculação (i.t.) de 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e o BAL foi obtido. O número total de células (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) é mostrado na figura. Os valores representam a média \pm desvio padrão e cada símbolo representa um animal. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett).

Figura 7 - Células do lavado broncoalveolar de camundongos fêmeas inoculados com *K. pneumoniae*.



Seis, 24 h e 48 h após a inoculação (i.t.) de 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e o BAL foi obtido. O número total de células (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) é mostrado na figura. Os valores representam a média \pm desvio padrão e cada símbolo representa um animal. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett).

Figura 8 – Células do lavado broncoalveolar de camundongos machos e fêmeas inoculados com *K. pneumoniae*.

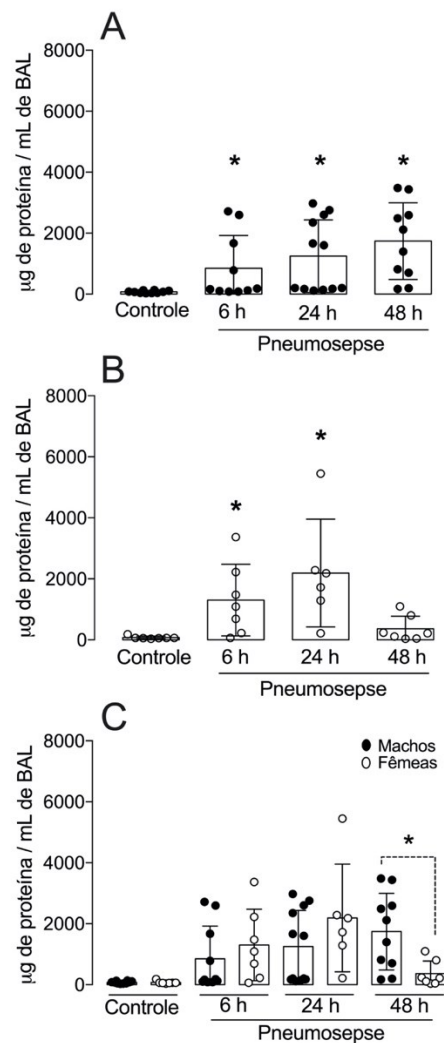


Seis, 24 h e 48 h após a inoculação (i.t.) de 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e o BAL foi obtido. O número total de células (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) de animais machos é representado através dos círculos fechados e das fêmeas por círculos abertos. Os valores representam a média \pm desvio padrão e cada símbolo representa um animal. * $p < 0,05$ (teste *t* de Student).

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA NO BAL

Os animais sépticos apresentaram um aumento da quantidade de proteína no BAL quando comparado ao grupo controle. O aumento na quantidade de proteína dos animais machos (Figura 9A) foi significativo em 6, 24 e 48 horas após a indução do quadro, enquanto as fêmeas apresentaram níveis aumentados apenas em 6 e 24 horas (Figura 9B). Na figura 9C podemos observar que existe diferença na quantidade de proteína no BAL de machos e fêmeas 48 horas após a indução do quadro.

Figura 9 - Quantificação de proteínas no lavado broncoalveolar de camundongos machos e fêmeas inoculados com *K. pneumoniae*.



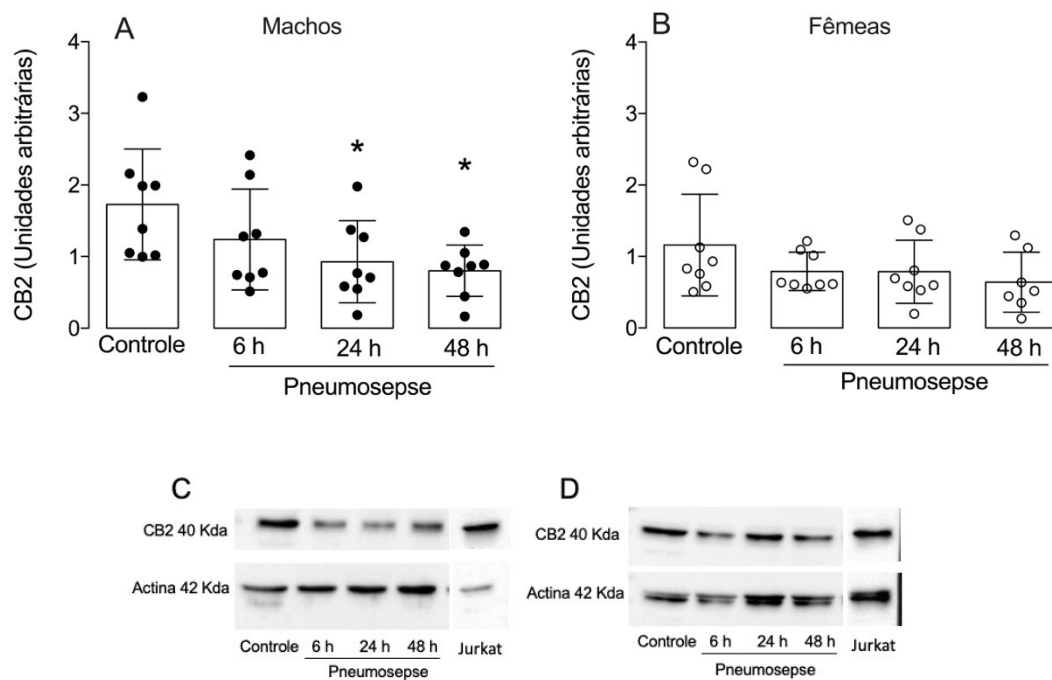
Seis, 24 h e 48 h após a inoculação (i.t.) de 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os animais foram sacrificados e o BAL foi obtido. A dosagem de proteínas no BAL foi avaliada em camundongos machos (A) e fêmeas (B). Os valores representam a média \pm desvio padrão e cada símbolo representa um animal. O painel C apresenta os valores obtidos de machos, representado através dos círculos fechados e de fêmeas círculos abertos. Painel A e B * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett). Painel C * $p < 0,05$ (teste *t* de Student).

5.5 DENSIDADE DE RECEPTORES CB2 NO TECIDO PULMONAR

A expressão dos receptores CB2 foi avaliada no tecido pulmonar no decorrer do quadro séptico através da metodologia de *Western blotting*. Conforme exposto na figura 10A, nos animais machos houve uma redução na expressão dos receptores CB2 no tecido pulmonar de aproximadamente 47% em 24 horas e 53,6% em 48 horas após indução do quadro de pneumosepse quando comparado ao controle. Diferentemente, em fêmeas, podemos observar que não houve diferença significativa (Figura 10B).

As figuras 10C e 10D são imagens representativas, sendo que cada banda observada representa a detecção da proteína de interesse no tecido pulmonar de um animal.

Figura 10 - Análise por *Western blotting* dos receptores CB2 no tecido pulmonar



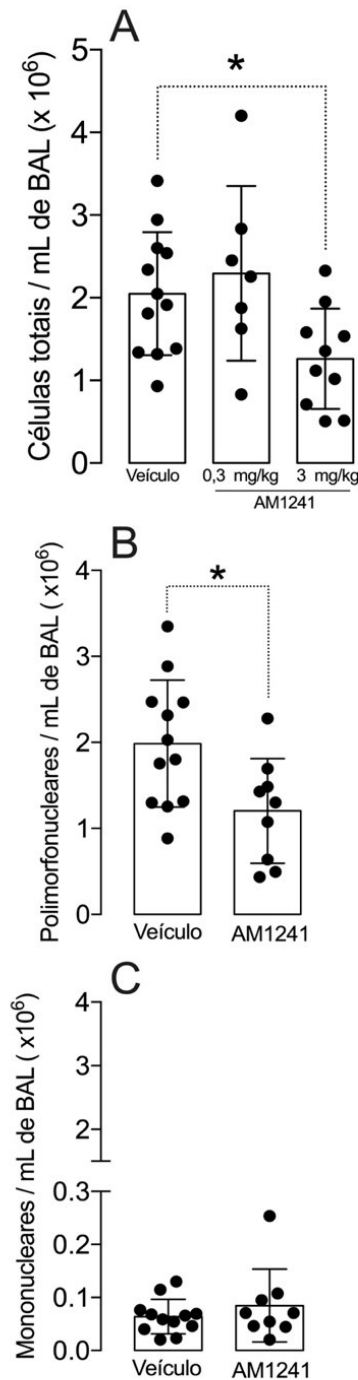
Os animais foram inoculados com 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*. Nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h, os animais foram sacrificados e amostras de tecido pulmonar foram obtidas e processadas para avaliação da expressão dos receptores CB2. Os painéis A e C representam a análise da expressão dos receptores CB2 no tecido pulmonar de camundongos machos e os painéis B e D de fêmeas. Amostras de células Jurkat foram utilizadas como controle positivo do anticorpo. A densidade das bandas foi medida através do programa ImageLab e foi expressa como unidades arbitrárias. Os resultados representam a média \pm desvio padrão e cada símbolo representa um animal. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo post hoc de Dunnett).

5.6 EFEITO DO AGONISTA CB2 AM1241 NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS NO FOCO INFECCIOSO

Com base nos resultados obtidos anteriormente, avaliamos o efeito do agonista CB2 AM1241 apenas em animais machos e no tempo de 24 horas após indução da pneumosepse. O tempo de 24 horas foi escolhido pois foi neste tempo que encontramos o pico de migração de células para o foco infeccioso e também uma importante redução (aproximadamente 50%) na densidade dos receptores CB2 no tecido pulmonar de machos, sendo esta última também a justificativa pela escolha de machos.

Primeiramente definimos a dose para o tratamento com o agonista CB2 AM1241. Com base na literatura, foram utilizadas duas doses, 0,3 mg/kg e 3 mg/kg (Barutta *et al.*, 2011). Inicialmente optamos por avaliar o efeito do agonista na migração de células para o foco infeccioso. Podemos observar que a administração da maior dose de AM1241 (3 mg/kg) diminuiu o número de células no infiltrado inflamatório quando comparado aos animais que receberam apenas veículo, já os animais que receberam a dose de 0,3 mg/kg de AM1241 não apresentaram redução no número de células totais (Figura 11A). A redução no número de células observada nos animais que receberam 3 mg/kg de AM1241 ocorre devido à diminuição de células polimorfonucleares (Figura 11B). O tratamento não alterou o número de células mononucleares (Figura 11C).

Figura 11 - Avaliação de células do lavado broncoalveolar de camundongos inoculados com *K. pneumoniae* e tratados com AM1241.

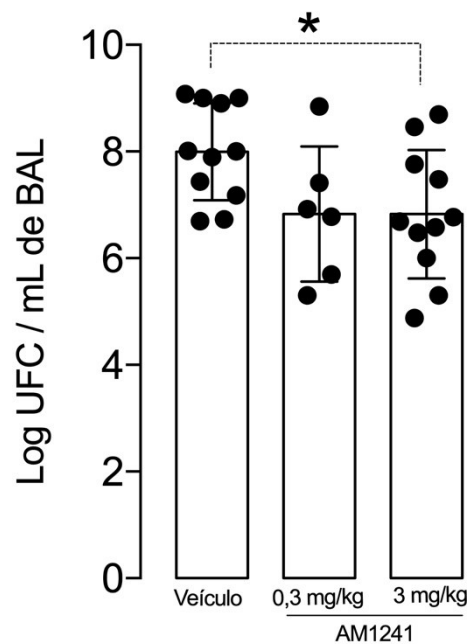


Os animais foram inoculados (i.t.) 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*. Seis e 12 h após a indução do quadro de pneumosepse, os camundongos foram tratados AM1241 0,3 mg/kg (A), 3 mg/kg; i.p.(A-C) ou veículo (i.p.). Os animais foram sacrificados 24 h após indução da sepse e o lavado broncoalveolar foi obtido. O número total de leucócitos (A), células polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) é mostrado na figura. Os valores representam a média \pm desvio padrão e cada símbolo representa um animal. * $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett).

5.7 EFEITO DO AGONISTA CB2 AM1241 NO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS NO FOCO INFECCIOSO

Como houve redução da migração de células para o foco primário da infecção após a administração do agonista CB2, investigamos como estaria o processo infeccioso no local. De maneira interessante, podemos observar na figura 12 que houve uma redução do número de UFC/mL nas amostras de BAL de animais sépticos que receberam o tratamento com AM1241 na dose de 3 mg/kg quando comparado aos animais que receberam apenas veículo. Essa redução no número de UFC/mL não foi observada no grupo de animais tratados com 0,3 mg/kg de AM1241.

Figura 12 - Avaliação da quantidade de bactérias no lavado broncoalveolar de camundongos inoculados com *K. pneumoniae* e tratados com AM1241.

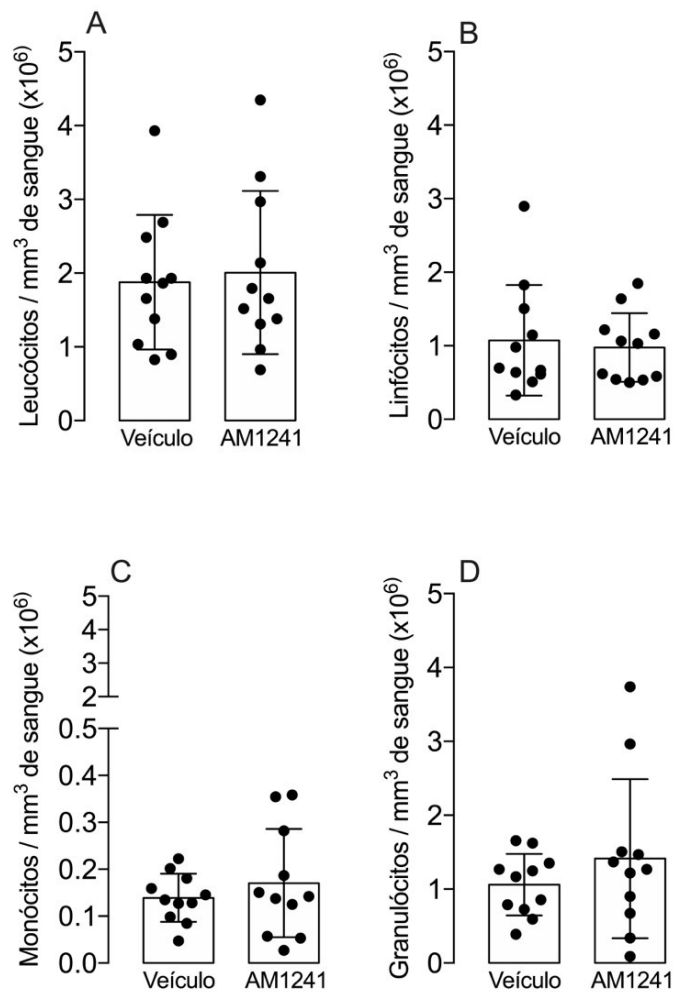


Os animais foram inoculados (i.t.) com 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*. Seis e 12 h após a indução do quadro de pneumosepse, os camundongos foram tratados com AM1241 (0,3 mg/kg ou 3 mg/kg; i.p.) ou veículo (i.p.). Os animais foram sacrificados 24 h após indução da sepse e o BAL foi obtido. As amostras de BAL foram diluídas, semeadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas por 24 h. Os resultados foram expressos como log de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de BAL. Os valores representam a média \pm desvio padrão e cada símbolo representa um animal. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett).

5.8 EFEITO DO AGONISTA CB2 AM1241 NA CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS

Com base nos resultados anteriores, a dose de 3 mg/kg foi escolhida para realização das demais análises. O tratamento com o agonista dos receptores CB2, AM1241, não alterou a contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos de animais submetidos ao modelo de pneumosepse quando comparado ao grupo veículo (Figura 13).

Figura 13 - Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos de camundongos inoculados com *K. pneumoniae* e tratados com AM1241.

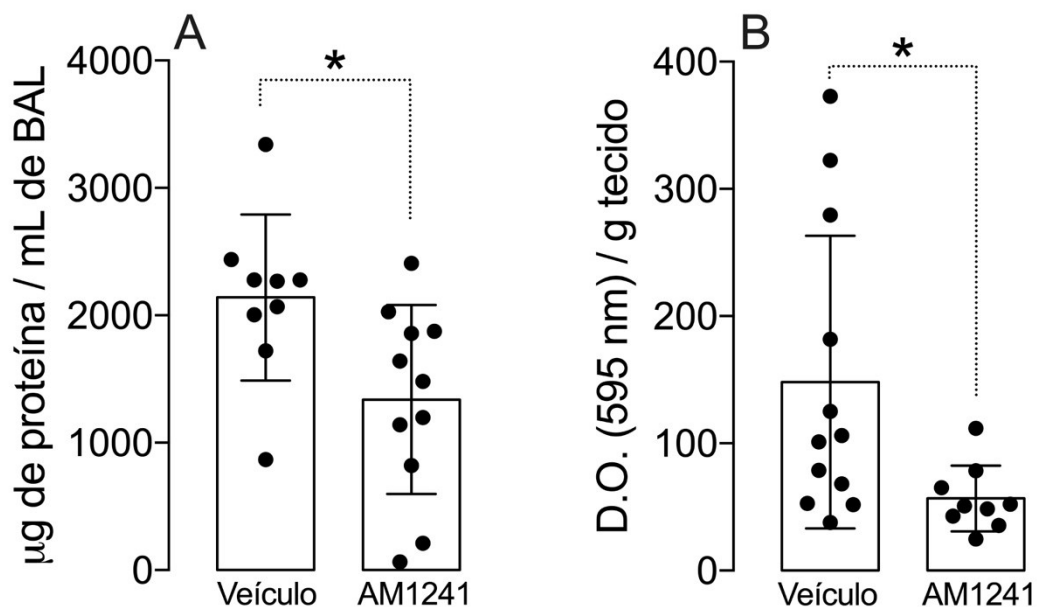


Os animais foram inoculados (i.t.) com 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*. Seis e 12 h após a indução do quadro de pneumosepse, os camundongos foram tratados com AM1241 (3 mg/kg; i.p.) ou veículo (i.p.). Os animais foram sacrificados 24 h após indução da sepse e o sangue foi obtido por punção cardíaca. O número total de leucócitos (A), de linfócitos (B), de monócitos (C) e de granulócitos (D) é mostrado na figura. Os valores representam a média \pm desvio padrão e cada símbolo representa um animal. Não houve diferença estatística entre os grupos (teste *t* de Student).

5.9 EFEITO DO AGONISTA CB2 AM1241 NA QUANTIDADE DE PROTEÍNA E ATIVIDADE DA ENZIMA MPO

A análise da quantidade de proteínas no BAL mostrou que o tratamento com AM1241 foi capaz de reduzir a quantidade de proteína no espaço alveolar, quando comparado aos animais que receberam apenas veículo, como pode ser visto na Figura 14A. Também realizamos a determinação da atividade da enzima MPO no tecido pulmonar, a fim de avaliar a ativação e recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso. Podemos observar na Figura 14B que o tratamento com AM1241 reduziu a atividade da MPO nos pulmões, quando comparado aos animais que receberam apenas veículo.

Figura 14 – Avaliação da quantidade de proteínas no lavado broncoalveolar e da atividade da enzima MPO de camundongos inoculados com *K. pneumoniae* e tratados com AM1241.



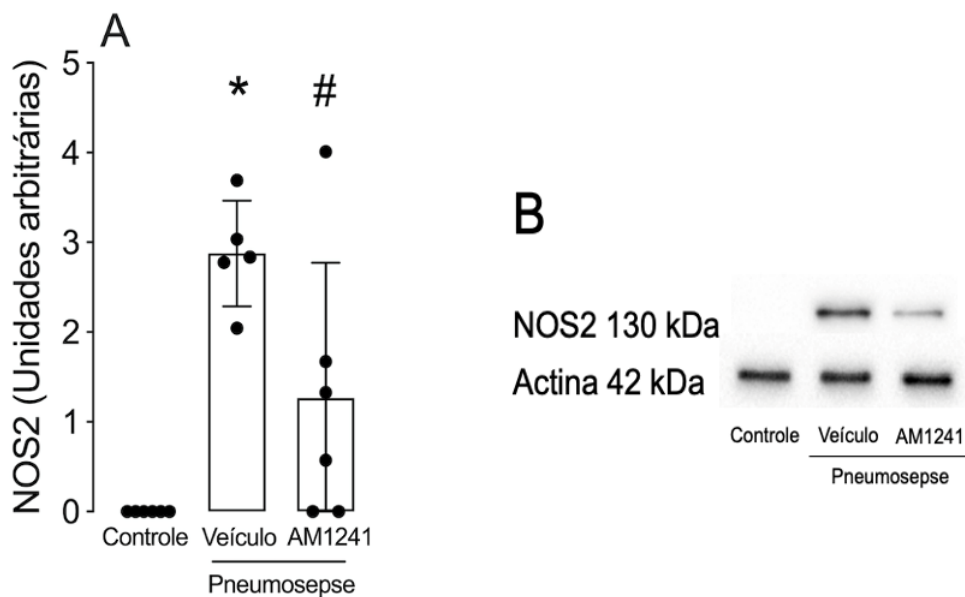
Os animais foram inoculados (i.t.) com 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*. Seis e 12 h após a indução do quadro de pneumosepse, os camundongos foram tratados com AM1241 (3 mg/kg; i.p.) ou veículo (i.p.). Os animais foram sacrificados 24 h após indução da sepse e o BAL e o pulmão foram obtidos. A) A dosagem de proteínas foi avaliada no BAL e B) a atividade da enzima mieloperoxidase foi determinada no pulmão. Os valores representam a média \pm desvio padrão e cada símbolo representa um animal. * $p < 0,05$ (teste *t* de Student).

5.10 EFEITO DO AGONISTA CB2 AM1241 NA DENSIDADE DA NOS2

A análise da densidade da enzima NOS2 foi avaliada no tecido pulmonar dos animais sépticos através da metodologia de *Western blotting*. Conforme exposto na figura 15A, os animais sépticos que receberam apenas o veículo apresentam um aumento na densidade da enzima NOS2 no tecido pulmonar quando comparado ao controle. Já os animais que receberam o tratamento com agonista CB2, apresentaram uma redução na densidade da NOS2 quando comparado aos animais que receberam o veículo.

Na figura 15B temos uma imagem representativa, onde cada banda observada representa a detecção da proteína de interesse no tecido pulmonar de um animal.

Figura 15 – Análise por *Western blotting* da enzima NOS2 no tecido pulmonar de camundongos controles e inoculados com *K. pneumoniae* e tratados com AM1241.



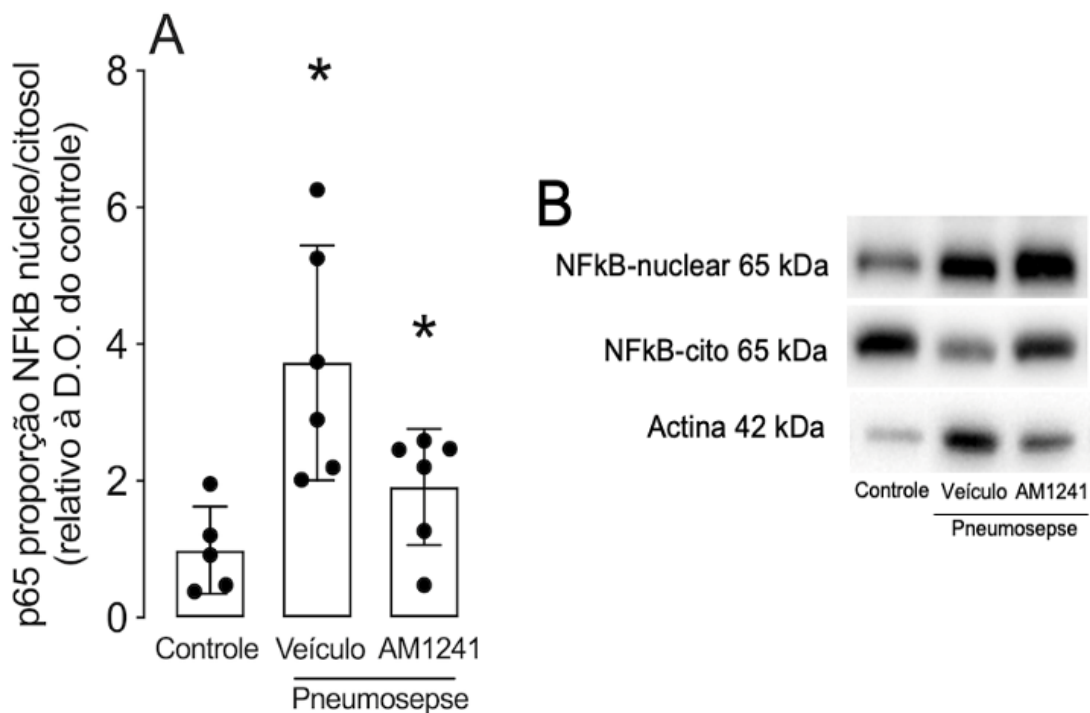
Os animais foram inoculados (i.t.) com 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*. Seis e 12 h após a indução do quadro de pneumosepse, os camundongos foram tratados com AM1241 (3 mg/kg; i.p.) ou veículo (i.p.). Os animais foram sacrificados 24 h após indução da sepse e amostras de tecido pulmonar foram obtidas e processadas para avaliação da expressão da enzima NOS2. Os painéis A e B representam a análise da expressão da enzima NOS2 no tecido pulmonar de camundongos machos. A densidade das bandas foi medida através do programa ImageLab e foi expressa como unidades arbitrárias. Os resultados representam a média \pm desvio padrão e cada símbolo representa um animal. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett).

5.11 EFEITO DO AGONISTA CB2 AM1241 NA ATIVAÇÃO DA VIA DO NF- κ B

Avaliamos a ativação do NF κ B no tecido pulmonar de animais sépticos através da metodologia de *Western blotting*. Os animais sépticos que receberam apenas o veículo apresentaram um aumento na ativação do NF κ B quando comparado ao controle, como podemos observar pelo aumento da translocação nuclear da subunidade p65 (Figura 16A). Os animais que receberam o tratamento com agonista CB2, apresentaram uma menor ativação do NF κ B quando comparado aos animais que receberam o veículo.

Na figura 16B temos uma imagem representativa, onde cada banda observada representa a detecção das frações citoplasmáticas e nucleares da proteína de interesse no tecido pulmonar de um animal.

Figura 16 – Análise por *Western blotting* da ativação de NF κ B no tecido pulmonar de camundongos controles e inoculados com *K. pneumoniae* e tratados com AM1241.



Os animais foram inoculados (i.t.) com 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*. Seis e 12 h após a indução do quadro de pneumosepse, os camundongos foram tratados com AM1241 (3 mg/kg; i.p.) ou veículo (i.p.). Os animais foram sacrificados 24 h após indução da sepse e amostras de tecido pulmonar foram obtidas e processadas para avaliação da expressão do NF κ B. O painel A representa a análise da razão entre NF κ B citoplasmático e do NF κ B nuclear no tecido pulmonar de camundongos machos e B são as imagens representativas. A densidade das bandas foi medida através do programa ImageLab e foi expressa como proporção NF κ B núcleo/citosol (relativo à D.O. do controle). Os resultados representam a média \pm desvio padrão e cada símbolo representa um animal. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett).

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho buscamos adquirir conhecimento e entendimento acerca da resposta inflamatória e densidade dos receptores CB2 no decorrer do processo séptico de machos e fêmeas, utilizando como modelo a sepse induzida por pneumonia. Também, com o objetivo de avaliar a participação dos receptores CB2 no processo inflamatório, o agonista CB2, AM1241, foi administrado e parâmetros inflamatórios nos pulmões e vias de sinalização foram investigadas na sepse.

Para realização do modelo de sepse induzido por pneumonia, conhecido como pneumosepse, realizamos a administração da bactéria *K. pneumoniae*, mimetizando um foco infeccioso de origem pulmonar que evolui para um quadro séptico. Os pulmões representam o foco de infecção primária mais comum, cerca de 50% dos casos de sepse estão associados à pneumonia. Além disso, as bactérias Gram-negativas, dentre elas, a *K. pneumoniae*, estão entre os principais patógenos causadores da doença, demonstrando, portanto, a relevância deste modelo de sepse (Angus e Poll, Van Der, 2013).

O modelo de pneumosepse é capaz de mimetizar vários aspectos clínicos da doença em pacientes, sendo bastante reprodutível e bem padronizado como demonstrado em diversos trabalhos, apesar disso, a grande maioria dos estudos utiliza apenas camundongos machos (Horewicz *et al.*, 2015; Sordi *et al.*, 2013a; Sordi *et al.*, 2013b). Portanto primeiramente, decidimos avaliar as respostas de machos e fêmeas frente ao modelo de pneumosepse, visto que diversos trabalhos presentes na literatura demonstram que existem diferenças em relação ao sexo em resposta a sepse. Sabe-se que pacientes do sexo masculino apresentam uma maior taxa de mortalidade quando comparado a pacientes do sexo feminino, o dimorfismo sexual observado se dá principalmente devido a diferença nos níveis hormonais entre homens e mulheres. Os hormônios sexuais femininos, principalmente o estradiol, exibem efeitos protetores, enquanto os homônimos sexuais masculinos parecem trazer uma maior suscetibilidade em condições sépticas (Bösch, Angele e Chaudry, 2018).

Com base em dados prévios do laboratório (Sordi, *et al.*, 2013) determinamos a quantidade de UFC de bactéria para realização do modelo e avaliamos a relação da inoculação de 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae* com a sobrevivência de animais machos e fêmeas ao longo do tempo. Após a inoculação de 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, tanto o grupo dos animais machos como as fêmeas, apresentaram em torno de 50% de mortalidade 48 horas após a inoculação, o que garante a reprodutibilidade do modelo, além disso todos os animais apresentaram sinais

visuais clássicos de sepse como piloereção, letargia e taquipneia, todavia, não houve diferença estatística entre os grupos.

Seguidamente, avaliamos marcadores que estão relacionados ao desenvolvimento da sepse nos animais e nos permitem a caracterização do modelo. Um dos parâmetros avaliados foi a contagem de leucócitos sanguíneos, e tanto os animais machos quanto fêmeas desenvolveram leucopenia, sendo que 24 horas após a indução do quadro, os machos apresentaram uma acentuada redução no número de leucócitos circulantes, enquanto nas fêmeas essa redução ocorreu de maneira mais atenuada e tardiamente, sendo significativa apenas em 48 horas após a sepse. O desenvolvimento da leucopenia nos animais coincidiu com o aumento da migração de células para o foco infeccioso, onde também observamos que no tempo de 24 horas após a indução da sepse, os machos apresentaram um maior número de células no foco infeccioso quando comparados às fêmeas.

A presença de patógenos ou partículas estranhas, promove a adesão e migração dos leucócitos através do endotélio capilar afim de garantir a proteção do organismo. Na sepse o processo inflamatório exacerbado induz a disfunção das células endoteliais, o que leva a ruptura da barreira vascular, edema tecidual e extravasamento de proteínas. Através do método de Bradford quantificamos as proteínas presentes no BAL, e como esperado, foi visto que os animais sépticos de fato apresentaram um aumento significativo na quantidade de proteína no BAL quando comparados ao grupo controle. Coincidindo com o pico de migração de células para o foco infeccioso observado em 24 horas após a sepse, ambos os grupos apresentaram um elevado infiltrado de proteínas no BAL nesse mesmo tempo, porém, curiosamente em 48 horas a quantidade de proteína no BAL das fêmeas foi menor do que os machos.

O NO é um dos principais mediadores na sepse, animais sépticos apresentam níveis elevados de NO e esta molécula possui importantes efeitos na sepse, relacionados principalmente a hipotensão e hiporresponsividade a vasoconstritores (revisado em Assreuy, 2006). No nosso modelo, embora observado um aumento na produção de NOx tanto em machos como em fêmeas, esses resultados não foram significativos. Outro parâmetro avaliado foram os marcadores de disfunção hepática, AST e ALT, no nosso modelo ambos os grupos apresentaram níveis elevados de AST nos tempos finais avaliados, demonstrando, portanto, a ocorrência da disfunção hepática decorrente do quadro séptico.

Estes resultados confirmam o desenvolvimento da sepse nos animais e nos mostram algumas disparidades que ocorrem entre os sexos no decorrer do processo séptico no modelo

de pneumosepse. Embora não foi observada diferença na mortalidade entre os grupos, a resposta inflamatória parece ser mais exacerbada nos machos, todavia o estado hormonal deve ser considerado e, portanto, o mecanismo por trás desse dimorfismo sexual ainda precisa ser melhor estudado.

Sabendo que diversos trabalhos presentes na literatura demonstram um importante papel do sistema endocanabinoide em diversas patologias, inclusive na sepse, e principalmente com base nas evidências de que os receptores CB2 apresentam efeitos modulatórios na resposta imune que podem ser benéficos na sepse, resolvemos investigar o envolvimento destes receptores no modelo animal de pneumosepse. Primeiramente avaliamos a densidade dos receptores CB2 no tecido pulmonar no decorrer do quadro séptico, visto que alguns trabalhos demonstram que a expressão destes receptores difere em determinadas patologias, como por exemplo, animais submetidos ao modelo de obesidade e nefropatia diabética apresentaram uma expressão diminuída dos receptores CB2 (Barutta *et al.*, 2011; Jenkin *et al.*, 2016). Além disso, a densidade dos receptores CB2 difere também em relação aos sexos, Piotrowska e colaboradores (2018) mostraram que homens e mulheres apresentam diferenças na distribuição dos receptores CB1 e CB2 no tecido cardíaco.

Portanto avaliamos a densidade dos receptores CB2 no tecido pulmonar de animais controle e submetidos ao modelo de pneumosepse e observamos que 24 e 48 horas após indução do quadro os animais machos apresentaram uma redução significativa na densidade dos receptores CB2 quando comparado aos animais controle. Curiosamente, em fêmeas, não foi observada uma redução significativa. Nossos resultados mostraram que no modelo de pneumosepse ocorre redução na densidade dos receptores CB2 no tecido pulmonar de camundongos machos, entretanto, divergem de alguns dados presentes na literatura, como por exemplo, no trabalho de Liu e colaboradores 2020, que utilizou um outro modelo de sepse, onde através da metodologia de PCR encontraram aumento na densidade dos receptores CB2 no tecido pulmonar de animais submetidos ao modelo de CLP. Sobretudo, evidenciamos que a densidade dos receptores CB2 está alterada na sepse e difere entre os sexos.

A partir destes resultados resolvemos avaliar o efeito da ativação dos receptores CB2 apenas em animais machos, visto que este grupo apresentou uma importante redução na densidade destes receptores, e escolhemos o tempo de 24 horas após indução da sepse, pois foi neste tempo em que encontramos o pico de migração de células para o foco infeccioso.

Primeiramente avaliamos o efeito do tratamento com agonista CB2 na migração de células para o foco infeccioso, e observamos que o tratamento dos animais sépticos com

AM1241 promoveu uma redução no número de células polimorfonucleares no infiltrado inflamatório. Também avaliamos se o tratamento com o agonista dos receptores CB2 teria influência na contagem de leucócitos sanguíneos, e obtivemos como resultado que o tratamento não promoveu alterações na contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos de animais submetidos ao modelo de pneumosepse quando comparado ao grupo veículo. Como nosso principal interesse eram os pulmões, resolvemos investigar parâmetros inflamatórios relacionados ao foco primário da infecção.

Inicialmente, avaliamos a carga bacteriana no BAL, e observamos que os animais que receberam o tratamento com AM1241 apresentaram uma carga bacteriana reduzida quando comparada aos animais sépticos que receberam apenas o veículo. Nossos resultados demonstram que a ativação CB2 promove diminuição no recrutamento de neutrófilos e diminuição das UFC no BAL, embora do ponto de vista teórico esses resultados parecerem ser controversos, eles reforçam a ideia de que os receptores CB2 modulam a ativação e atividade dos neutrófilos. Tschop e colaboradores (2009), mostraram que animais deficientes do receptor CB2 apresentaram maior mortalidade relacionada ao aumento na migração de neutrófilos para os pulmões e conseqüentemente aumento da lesão pulmonar, além disso esses animais apresentaram maior bacteremia. Este estudo também mostrou que o tratamento com agonista CB2, GP1a, em animais submetidos ao modelo de CLP, promoveu diminuição no recrutamento de neutrófilos, níveis diminuídos de IL-6, redução da bacteremia e do dano pulmonar. Estudos anteriores sugerem que a ativação de receptores CB2 promove um maior clearance bacteriano através do aumento da fagocitose. A sinalização CB2 resulta na inibição de adenililciclase, levando a diminuição nos níveis de AMPc, que possui um papel regulador nos níveis de NF- κ B. A diminuição dos níveis de AMPc parece aumentar a ativação de neutrófilos e a depuração bacteriana por meio de fagocitose. Em contraste, o bloqueio do receptor CB2 e conseqüente elevação nos níveis de AMPc parecem reduzir o nível fagocítico e ação dos neutrófilos, prejudicando a capacidade destas células em eliminar bactérias (revisado em Lafreniere, 2017). Nossos resultados reforçam que a modulação dos receptores CB2 exerce efeitos sobre a migração de células durante o processo inflamatório na sepse, e, portanto, buscamos avaliar os possíveis mecanismos pelos quais isso ocorre.

A ativação dos receptores CB2 também possui um papel importante relacionado a interação entre leucócitos e endotélio vascular. No modelo de endotoxemia induzida por LPS, o tratamento com agonista dos receptores CB2 reduziu o recrutamento de leucócitos e o número

de células aderentes na microvasculatura intestinal (Lehmann *et al.*, 2012; Sardinha *et al.*, 2014). Utilizando também o modelo de endotoxemia e avaliações *in vitro*, Rajesh *et al.*, (2007) demonstraram que a ativação CB2 foi capaz de induzir alterações nas vias de sinalização que regulam a produção de mediadores inflamatórios, como por exemplo, a atenuação da ativação de RHO-A e NF- κ B, além de diminuir a expressão de moléculas de adesão, ICAM-1 e VCAM-1. A regulação da expressão de moléculas de adesão através do tratamento com agonistas CB2 também foi observada no modelo de encefalite por Ramirez *et al.* (2012), demonstrando que a ativação CB2 é capaz de reduzir a adesão de leucócitos e portanto de influenciar as interações endotélio-leucócitos.

Sabendo que a ativação dos receptores CB2 de fato promoveu redução no recrutamento de neutrófilos, e que alguns trabalhos demonstram que essa ativação atenua a interação dos leucócitos com as células endoteliais, resolvemos investigar se o tratamento com AM1241 interfere na permeabilidade vascular, através da mensuração da quantidade de proteínas no BAL. A análise da quantidade de proteínas no BAL no nosso modelo experimental, de fato mostrou que o tratamento com AM1241 foi capaz de reduzir a quantidade de proteína no espaço alveolar quando comparado aos animais que receberam apenas veículo.

A MPO é uma hemoproteína lisossomal localizada nos grânulos primários de leucócitos polimorfonucleares, sendo encontrada predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. A enzima MPO está diretamente relacionada ao mecanismo bactericida dos neutrófilos, ela é liberada após a ativação dessas células por diferentes efetores, promovendo a formação de radicais livres e substâncias oxidantes com capacidade antimicrobiana, e, portanto, contribuindo para a defesa imune do organismo (KLEBANOFF SJ, 1970). Com base nos nossos resultados resolvemos investigar se a ativação desse receptor também interfere na atividade da enzima MPO, e observamos que o tratamento com AM1241 reduziu a atividade da MPO nos pulmões de animais sépticos, corroborando com os nossos dados que mostram que o tratamento diminui a migração de neutrófilos, sendo esse um indicativo que a ativação CB2 é capaz de minimizar o agravamento da resposta inflamatória.

As enzimas óxido nítrico sintases são responsáveis pela produção de óxido nítrico, dentre elas a enzima óxido nítrico induzida (NOS-2 ou iNOS), que é expressa de forma induzida por citocinas e produtos bacterianos, é responsável pela produção da maior parte do NO relevante na sepse. O NO produzido possui ação microbicida e citotóxica, sendo a NOS-2 a isoforma de maior interesse em processos inflamatórios e infecciosos. Portanto um dos nossos objetivos, foi avaliar se o tratamento com agonista CB2 possui efeitos regulatórios sobre a

expressão dessa enzima. Como esperado, os animais sépticos que receberam apenas veículo apresentam um aumento significativo na densidade da NOS-2, que foi atenuado nos animais que receberam o tratamento com AM1241.

O reconhecimento dos patógenos pelas células de defesa leva a ativação de uma cascata de sinalização intracelular que culmina na ativação do NFκB. A subunidade p65 é translocada para o núcleo, onde inicia a ativação de genes que irão promover a síntese de mediadores pró e antiinflamatórios, como por exemplo citocinas e as enzimas óxido nítrico sintases. Portanto após observamos que o tratamento com agonista CB2 promove uma redução na densidade da NOS-2, e considerando que a ativação do NFκB desempenha um importante papel na regulação da produção de importantes mediadores inflamatórios, decidimos avaliar a expressão e ativação do NFκB no tecido pulmonar dos animais sépticos. No nosso modelo observamos que o tratamento com o agonista CB2 diminui a translocação do p65-NFκB para o núcleo. Esse resultado corrobora com os achados em outros modelos de sepse e endotoxemia. Rajesh *et al.*, (2007) demonstraram no modelo de endotoxemia que a ativação CB2 promoveu a atenuação da ativação do NFκB, e utilizando o modelo de CLP, Çakir e colaboradores (2020) utilizando o agonista CB2 JWH-133 observaram que os animais que receberam tratamento apresentaram níveis reduzidos de NFκB.

A inflamação é uma resposta defensiva e complexa do sistema imunológico, no entanto, quando ocorre de maneira exacerbada é prejudicial, portanto, um dos pontos chaves a serem avaliados na sepse é justamente a regulação do início da resposta inflamatória e a sua resolução. Muitas células e mediadores são responsáveis por conduzirem a resposta desregulada do organismo frente à infecção, e os neutrófilos são um elemento essencial. Ao mesmo tempo que essas células são as principais responsáveis pela erradicação dos patógenos e sobrevivência do hospedeiro, sendo seu papel fundamental nos tempos iniciais da sepse, o excesso de neutrófilos circulantes e ativados é capaz de causar lesão as células endoteliais, que leva ao extravasamento de fluidos e proteínas, promovendo danos teciduais (Wei *et al.*, 2021). Embora importante para o controle do processo de infecção na sepse e outras condições, a presença exacerbada das células polimorfonucleares (PMN), com sua ativação excessiva, pode causar lesão tecidual e disfunção orgânica. As respostas imunológicas às infecções pulmonares devem ser cuidadosamente reguladas para não prejudicar o hospedeiro, como observado em casos graves de COVID-19. Portanto, estratégias imunomodulatórias para inibir ou atenuar a ativação

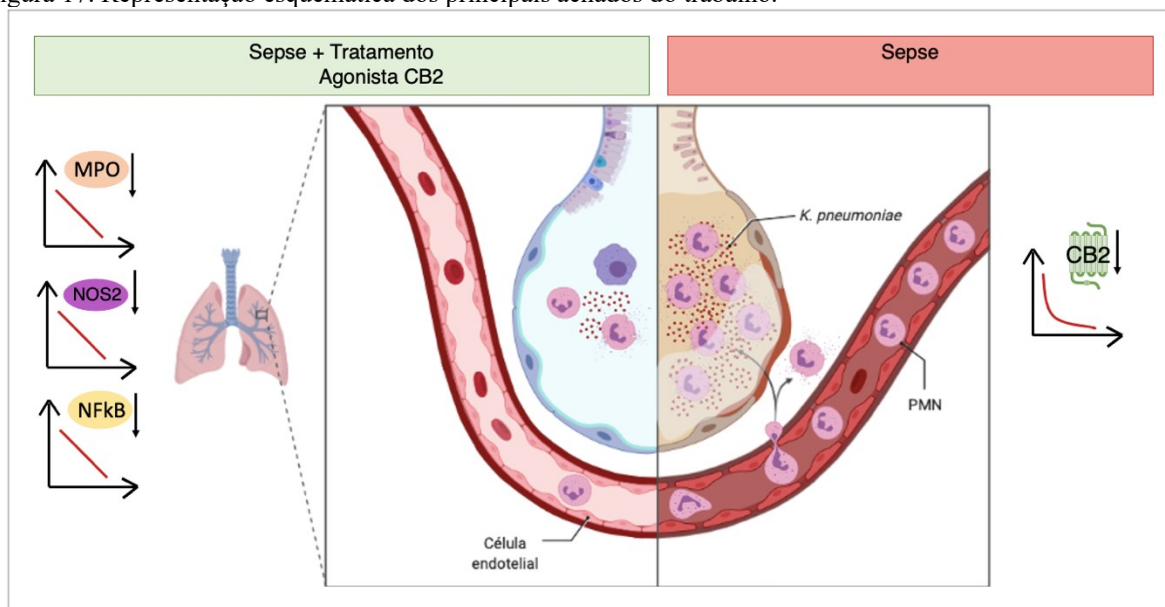
excessiva da resposta inflamatória local são importantes para alcançar a erradicação eficaz do patógeno, mantendo as trocas gasosas e a função orgânica.

Desta forma, mecanismos que influenciem no recrutamento e ativação adequada dessas células são importantes para uma adequada resposta inflamatória frente a sepse. Nesse sentido a ativação CB2 aparenta ter um papel benéfico na sepse, considerando que esses receptores são abundantemente expressos em células imunes e sua ativação está relacionada à modulação da resposta inflamatória.

7 CONCLUSÃO

Os principais achados deste trabalho são que a densidade dos receptores CB2 é diferente no pulmão de machos e fêmeas sépticos, e que a ativação dos receptores CB2 através da administração do agonista seletivo AM1241 em camundongos machos submetidos ao modelo de pneumosepse, promove a redução dos seguintes parâmetros nos pulmões: migração de células para o foco infeccioso, número de UFC no BAL, extravasamento de proteínas, atividade da MPO, expressão da enzima NOS2 e ativação do NFκB. Portanto os resultados apresentados neste trabalho evidenciam que a ativação dos receptores CB2 pode ser benéfica na sepse ao atenuar o estado hiperinflamatório que ocorre nessa condição.

Figura 17. Representação esquemática dos principais achados do trabalho.



O quadro à direita representa o pulmão de animais submetidos ao modelo de sepse induzido através da administração de *K. pneumoniae*, com aumento da migração de células inflamatórias para o foco, extravasamento de proteínas, e redução na densidade dos receptores CB2 ao longo do tempo. O quadro à esquerda representa o pulmão de animais sépticos tratados com agonista CB2. O tratamento promove redução do número de células PMN, número de UFC, extravasamento de proteínas, atividade da MPO, expressão da enzima NOS2 e ativação do NFκB. Fonte: A autora. Adaptado dos templates disponíveis na plataforma Biorender.

8 REFERÊNCIAS

- ANGUS, D. C.; POLL, T. VAN DER. Severe sepsis and septic shock. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 9, p. 840–851, 2013.
- ASSREUY, J. Nitric Oxide and Cardiovascular Dysfunction in Sepsis. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 165–173, 2006.
- BARUTTA, F. *et al.* Protective role of cannabinoid receptor type 2 in a mouse model of diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 60, n. 9, p. 2386–2396, 2011.
- BASU, SREEMANTI AND DITTEL, B. Unraveling the Complexities of Cannabinoid Receptor 2 (CB2) Immune Regulation in Health and Disease. **Immunologic Research**, v. 51, n. 1, p. 3–26, 2016.
- BONDARENKO, A. I. *et al.* Ca²⁺-dependent potassium channels and cannabinoid signaling in the endothelium of apolipoprotein E knockout mice before plaque formation. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 115, n. January, p. 54–63, 2018.
- BONINI, S. A. *et al.* Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 227, n. May, p. 300–315, 2018.
- BÖSCH, F.; ANGELE, M. K.; CHAUDRY, I. H. Gender differences in trauma, shock and sepsis. **Military Medical Research**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2018.
- ÇAKIR, M. *et al.* The ameliorating effect of cannabinoid type 2 receptor activation on brain, lung, liver and heart damage in cecal ligation and puncture-induced sepsis model in rats. **International Immunopharmacology**, v. 78, n. September 2019, p. 1567–5769, 2020.
- CHEN, D. J. *et al.* Brain cannabinoid receptor 2: Expression, function and modulation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 3, p. 312–316, 2017.
- CHEN, T. *et al.* Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: Retrospective study. **The BMJ**, v. 368, n. December 2019, p. 1–14, 2020.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885–891, 2002.
- DANIEL LAFRENIERE, J.; LEHMANN, C. Parameters of the endocannabinoid system as novel biomarkers in sepsis and septic shock. **Metabolites**, v. 7, n. 4, 2017.
- DEVANE, W. A. *et al.* Isolation and Sctructure of a Brain constituent that binds to the Cannabinoid Receptor. **SCIENCE**, v. 1558, n. 10, p. 19–22, 1992.
- DHOPEHWARKAR, A.; MACKIE, K. MINIREVIEW CB 2 Cannabinoid Receptors as a Therapeutic Target — What Does the Future Hold ? **Molecular Pharmacology**, p. 430–437,

2014.

DINU, A. R. *et al.* Cannabis Sativa Revisited — Crosstalk between Stress , and Endocannabinoid Response System in. **Cells**, v. 9, n. 307, p. 1–23, 2020.

FARQUHAR, C. E. *et al.* Sex, THC, and hormones: Effects on density and sensitivity of CB 1 cannabinoid receptors in rats. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 194, n. October 2018, p. 20–27, 2019.

FINK, M. P.; HEARD, S. O. Laboratory models of sepsis and septic shock. **Journal of Surgical Research**, v. 49, n. 2, p. 186–196, 1990.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1646–1647, 1964.

GEROULANOS, S.; DOUKA, E. T. Historical perspective of the word “sepsis” [1]. **Intensive Care Medicine**, v. 32, n. 12, p. 2077, 2006.

GUI, H. *et al.* Cannabinoid receptor 2 protects against acute experimental sepsis in mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.

HO, W. S. V.; KELLY, M. E. M. **Cannabinoids in the Cardiovascular System**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 80

HOREWICZ, V. V. *et al.* FPR2/ALX activation reverses LPS-induced vascular hyporeactivity in aorta and increases survival in a pneumosepsis model. **European Journal of Pharmacology**, v. 746, p. 267–273, 2015.

HOURANI, W.; ALEXANDER, S. P. H. Cannabinoid ligands, receptors and enzymes: Pharmacological tools and therapeutic potential. **Brain and Neuroscience Advances**, v. 2, p. 239821281878390, 2018.

HOWLETT, A. C. Cannabinoid receptor signaling. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 168, p. 53–79, 2005.

HOWLETT, A. C.; ABOOD, M. E. CB1 and CB2 Receptor Pharmacology. **Advances in Pharmacology**, v. 80, p. 169–206, 2017.

HUSNI, A. S. *et al.* Evaluation of phytocannabinoids from high-potency Cannabis sativa using in vitro bioassays to determine structure-activity relationships for cannabinoid receptor 1 and cannabinoid receptor 2. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 9, p. 4295–4300, 2014.

JENKIN, K. A. *et al.* Renal effects of chronic pharmacological manipulation of CB2 receptors in rats with diet-induced obesity. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 7, p. 1128–1142, 2016.

- JORDAN, C. J.; XI, Z. X. Progress in brain cannabinoid CB 2 receptor research: From genes to behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 98, p. 208–220, 2019.
- KANO, M. *et al.* Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 1, p. 309–380, 2009.
- KING, E. G. *et al.* Pathophysiologic mechanisms in septic shock. **Laboratory Investigation**, v. 94, n. 1, p. 4–12, 2014.
- KLEBANOFF SJ. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. **SCIENCE**, v. 169, n. 3950, p. 1095–1097, 1970.
- LEHMANN, C. *et al.* Cannabinoid receptor 2 activation reduces intestinal leukocyte recruitment and systemic inflammatory mediator release in acute experimental sepsis. **Critical Care**, v. 16, n. 2, p. R47, 2012.
- LEITE-AVALCA, M. C. G. *et al.* Cannabinoid CB 1 Receptor Antagonist Rimonabant Decreases Levels of Markers of Organ Dysfunction and Alters Vascular Reactivity in Aortic Vessels in Late Sepsis in Rats. **Inflammation**, v. 42, n. 2, p. 618–627, 2019.
- LIU, A. P. *et al.* Cannabinoid receptor 2 activation alleviates septic lung injury by promoting autophagy via inhibition of inflammatory mediator release. **Cellular Signalling**, v. 69, 2020.
- MACHADO, F. R. *et al.* The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): An observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1180–1189, 2017.
- MALFITANO, A. M. What We Know and Don't Know About the Cannabinoid Receptor 2 (CB2). **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2016.
- MARIANE LEITE, L. A. Involvement of central endothelin ETA and cannabinoid CB1 receptors and arginine vasopressin release in sepsis induced by cecal ligation and puncture in rats Mariane. **SHOCK**, v. 46, p. 290–6, 2016.
- MARZO, V. DI. New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 9, p. 623–639, 2018.
- MATSUDA, L. A. *et al.* Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561–564, 1990.
- MECHOULAM, R. *et al.* 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.
- MECHOULAM, R.; SHVO, Y. Hashish-I. The structure of Cannabidiol. **Tetrahedron**, v. 19,

n. 12, p. 2073–2078, 1963.

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.

O'BRIEN, J. M. *et al.* Sepsis. **American Journal of Medicine**, v. 120, n. 12, p. 1012–1022, 2007.

ONAIWI, E. S. *et al.* Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1074, p. 514–536, 2006.

PACHER, P.; KUNOS, G. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease - Successes and failures. **FEBS Journal**, v. 280, n. 9, p. 1918–1943, 2013.

PERTWEE, R. Receptors and Channels Targeted by Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists and Antagonists. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 14, p. 1360–1381, 2010.

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

PERTWEE, R. G. *et al.* Cannabinoid Receptors and Their Ligands : Beyond CB 1 and CB 2. **Pharmacological reviews**, v. 62, n. 4, p. 588–631, 2010.

PERTWEE, R. G. Endocannabinoids. **Endocannabinoids**, p. 1–472, 2015.

PIOTROWSKA, Z. *et al.* Sex differences in distribution of cannabinoid receptors (CB1 and CB2), S100A6 and CacyBP/SIP in human ageing hearts. **Biology of Sex Differences**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2018.

PONS, S. *et al.* Immune Consequences of Endothelial Cells' Activation and Dysfunction During Sepsis. **Critical Care Clinics**, v. 36, n. 2, p. 401–413, 2020.

RAJESH, M. *et al.* CB2-receptor stimulation attenuates TNF- α -induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 4, 2007.

RAMIREZ, S. H. *et al.* Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 12, p. 4004–4016, 2012.

RUDD, K. E. *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, p. 200–211, 2020.

SARDINHA, J. *et al.* Experimental cannabinoid 2 receptor-mediated immune modulation in sepsis. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

SHMIST, Y. A. *et al.* Delta-9-tetrahydrocannabinol protects cardiac cells from hypoxia via

- CB2 receptor activation and nitric oxide production. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 283, n. 1–2, p. 75–83, 2006.
- SINGER, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801–810, 2016.
- SORDI, R., O.; *et al.* Pneumonia-induced sepsis in mice: Temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n. 2, p. 144–155, 2013.
- SORDI, R., O.; *et al.* Dual role of lipoxin A4 in pneumosepsis pathogenesis. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 283–292, 2013.
- STEARNS-KUROSAWA, D. J. *et al.* The Pathogenesis of Sepsis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 19–48, 2011.
- SUGIURA, T. *et al.* **2-arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain** **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1995.
- SUGIURA, T. *et al.* Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 66, n. 2–3, p. 173–192, 2002.
- TSCHÖP, J. *et al.* The Cannabinoid Receptor 2 Is Critical for the Host Response to Sepsis. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 1, p. 499–505, 2009.
- WEI, Y. *et al.* The Septic Neutrophil-Friend or Foe. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 55, n. 2, p. 147–155, 2021.
- ZORATTI, C. *et al.* Anandamide initiates Ca²⁺ signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 8, p. 1351–1362, 2003.