



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
CURSO DE FARMÁCIA

Luana Bolsoni Borges

**Ativação de receptores canabinoides do tipo 2 nas alterações inflamatórias associadas à
sepse induzida por pneumonia**

Florianópolis
2023

Luana Bolsoni Borges

Ativação de receptores canabinoides do tipo 2 nas alterações inflamatórias associadas à sepsis induzida por pneumonia

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Farmácia do Campus Florianópolis da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Farmácia.

Orientadora: Profa. Regina de Sordi, Dra.

Florianópolis

2023

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

Borges, Luana Bolsoni

Ativação de receptores canabinoides do tipo 2 nas alterações inflamatórias associadas à sepse induzida por pneumonia / Luana Bolsoni Borges ; orientadora, Regina de Sordi, 2023.

45 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. sepse. 3. pulmão. 4. receptor canabinoide do tipo 2. I. Sordi, Regina de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Luana Bolsoni Borges

Ativação de receptores canabinoides do tipo 2 nas alterações inflamatórias associadas à sepse induzida por pneumonia

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Farmacêutica e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Florianópolis, 01 de dezembro de 2023.



Coordenação do Curso

Banca examinadora



Profa. Regina de Sordi, Dra.

Orientadora



Profa. Cristiane Ribeiro de Carvalho, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Lucas César Pinheiro, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Ao meu avô Nelson (*in memoriam*) e minha avó Aldanir, as pessoas mais importantes da minha vida. Obrigada por todo carinho e amor durante minha criação, se hoje me tornei a pessoa que sou foi graças a vocês. Sou profundamente grata, pois vocês nunca mediram esforços e sempre foram meus maiores apoiadores para que eu chegasse até esta importante etapa da minha vida.

Aos meus pais Luciana e Juliano e meus irmãos Nelson e Luna, cujo amor incondicional, apoio incansável e encorajamento constante foram os pilares que sustentaram minha jornada até aqui. Mesmo de longe vocês sempre se fizeram presentes, com gestos e palavras que permitiram que eu continuasse seguindo meu sonho de ser independente.

Ao Tales, meu maior admirador e encorajador. Obrigada por sempre me ouvir e estar comigo nos melhores e piores momentos. Você é meu porto seguro e fez a diferença, tornando a caminhada mais leve e significativa.

A todos os amigos que fiz durante esses 5 anos de graduação, em especial a Madu, Flora, Caio, Érica e Maria Alice. Com vocês eu dividi os momentos mais inesquecíveis vividos durante a faculdade. Cada risada, festa, conversa, conselho, desafio superado, enfim... cada momento foi ainda mais especial com vocês para que eu vivesse a experiência acadêmica como um todo.

Aos meus colegas de laboratório Filipe, Lucas, Gabrielle, Luana, Amanda e Maérly. Cada experimento, discussão e desafio enfrentado juntos auxiliaram não apenas para que esse trabalho fosse concluído, mas para que construíssemos laços de amizade dos quais levarei para a vida. Este trabalho não seria o mesmo sem a contribuição valiosa de cada membro do nosso laboratório.

A minha orientadora Regina que sempre foi muito atenciosa, competente e inspiradora. Obrigada pela oportunidade de ser sua aluna e realizar um trabalho tão relevante. Você fez com que eu desenvolvesse um grande apreço pela pesquisa e sou profundamente grata por todos os ensinamentos, conversas e conselhos que me deu.

A todos os professores que passaram pela minha jornada acadêmica, desde o ensino fundamental até a graduação. Agradeço por todo conhecimento e conselhos não apenas profissionais, mas também pessoais que sempre levarei comigo.

A UFSC, que proporcionou os recursos essenciais para minha formação e para elaboração deste trabalho. Sou muito orgulhosa de fazer parte de uma das melhores instituições de ensino superior do país.

A todos que não mencionei aqui, mas que cruzaram meu caminho durante os anos da graduação, que me incentivaram e que certamente tiveram impacto na minha formação acadêmica.

RESUMO

A sepse é uma disfunção orgânica com alto risco de morte causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente a uma infecção. Representa uma das maiores causas de morte em todo o mundo e é a causa mais comum de internações em unidades de terapia intensiva. Os receptores canabinoides do tipo 2 (CB₂) estão envolvidos na modulação da resposta imune e do processo inflamatório, se tornando um alvo terapêutico interessante no tratamento da sepse. Portanto, este estudo investigou os efeitos de um agonista seletivo de receptores CB₂ no processo inflamatório em um modelo de sepse induzida por pneumonia. A sepse foi induzida em camundongos suíços machos por inoculação intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae*. Animais *naïve* foram utilizados como controle. Os camundongos foram tratados com agonista CB₂ (AM1241, 3 mg/kg, 6 e 12 h) ou veículo, e 24 h após a indução da sepse, pulmões, sangue e lavado broncoalveolar (BAL) foram coletados e parâmetros inflamatórios foram avaliados. A expressão de CB₂ em macrófagos do BAL reduziu em animais sépticos quando comparado aos animais controle. Os animais sépticos apresentaram lesão e edema pulmonar, aumento no escore clínico de sepse e diminuição da temperatura corporal e do número de plaquetas. Houve aumento da citocina pró-inflamatória IL-1 β no plasma e no BAL, aumento nos níveis de lactato sanguíneo, além de um aumento nos níveis de marcadores de dano de órgãos AST, ALT, bilirrubina e creatinina nos camundongos sépticos. O tratamento com AM1241 reduziu a gravidade da sepse através da diminuição do escore clínico, atenuou a hipotermia e reduziu a lesão pulmonar associada à sepse. O tratamento reduziu IL-1 β , aumentou IL-10 e a sobrevivência dos animais sépticos. Esses resultados sugerem que o receptor CB₂ está envolvido no processo hiperinflamatório local e sistêmico e, portanto, a intervenção farmacológica com agonistas CB₂ pode ser uma abordagem terapêutica adjuvante na sepse.

Palavras-chave: sepse, pulmão, receptor canabinoide do tipo 2.

ABSTRACT

Sepsis is an organic dysfunction with a high risk of death caused by a dysregulated host response to an infection. It represents one of the leading causes of death worldwide and is the most common cause of intensive care units admission. The cannabinoid receptor type 2 (CB₂) are involved in modulating the immune response and the inflammatory process, becoming an interesting therapeutic target in sepsis treatment. Therefore, this study investigated the effects of a selective CB₂ receptor agonist on the inflammatory process in a pneumonia-induced sepsis model. Sepsis was induced in male Swiss mice by intratracheal inoculation of *Klebsiella pneumoniae*. Naïve animals were used as controls. Mice were treated with CB₂ agonist (AM1241, 3 mg/kg, 6 and 12 h) or vehicle, and 24 h after sepsis induction, lungs, blood and bronchoalveolar lavage (BAL) were collected and inflammatory parameters were evaluated. The expression of CB₂ in BAL macrophages decreased in septic animals when compared to control animals. Septic animals presented pulmonary injury and edema, an increase in the clinical sepsis score and a decrease in body temperature and the number of platelets. There was an increase in the pro-inflammatory cytokine IL-1 β in plasma and BAL, an increase in blood lactate levels, as well as an increase in the levels of organ damage markers AST, ALT, bilirubin and creatinine in septic mice. Treatment with AM1241 reduced the severity of sepsis by decreasing the clinical score, attenuated hypothermia, and reduced sepsis-associated lung injury. The treatment reduced IL-1 β , increased IL-10, and improved the survival of septic animals. These results suggest that the CB₂ receptor is involved in both local and systemic hyperinflammatory processes, therefore, pharmacological intervention with CB₂ agonists may be considered as an adjunct therapeutic approach in sepsis.

Keywords: sepsis; lung; cannabinoid receptor type 2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de critérios clínicos para identificação de pacientes com sepse e choque séptico.....	16
Figura 2 - Esquema simplificado do mecanismo fisiopatológico da sepse que contribui para a disfunção orgânica.....	19
Figura 3 - Esquema representativo do modelo de sepse induzida por pneumonia.....	20
Figura 4 - Representação das vias de sinalização dos receptores canabinoides acoplados à proteína Gi/o.....	22
Figura 5 - Efeito do agonista CB ₂ na sobrevivência, gravidade da sepse e temperatura.....	32
Figura 6 - Efeito do agonista CB ₂ na histologia pulmonar de camundongos submetidos à sepse induzida por pneumonia.....	33
Figura 7 - Efeito do agonista CB ₂ no edema pulmonar de camundongos submetidos à sepse induzida por pneumonia.....	34
Figura 8 - Dosagem de AST, ALT, bilirrubina e creatinina no plasma de camundongos submetidos à sepse induzida por pneumonia.....	35
Figura 9 - Dosagem de lactato e contagem de plaquetas no sangue de camundongos submetidos à sepse induzida por pneumonia.....	36
Figura 10 - Dosagem de IL-10 e IL-1β no plasma e BAL de camundongos submetidos à sepse induzida por pneumonia.....	37
Figura 11 - Expressão do receptor CB ₂ em células inflamatórias no BAL de camundongos submetidos à sepse induzida por pneumonia.....	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais agonistas e antagonistas canabinoides.....	21
Quadro 2 - Pontuação de escore utilizado para avaliação de dano microscópico.	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2-aracdonoilglicerol
AC	Adenilato ciclase
AEA	Aracdonoiletanolamida
ALT	Alanina aminotransferase
AM1241	2-iodo-5-nitrophenyl-(1-(1-methylpiperidin-2-ylmethyl)-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methanone
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AST	Aspartato aminotransferase
BAL	do inglês <i>Bronchoalveolar lavage</i>
CB ₂	Receptor canabinoide do tipo 2
CB ₁	Receptor canabinoide do tipo 1
CBR	Receptores canabinoides
DAMPs	do inglês <i>Danger Associated Molecular Pattern</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
eCBs	Endocanabinoides
FiO ₂	Fração de oxigênio inspirado
Gi/o	Proteína G do tipo inibitória
IL-10	Interleucina-10
IL-18	Interleucina-18
IL-1β	Interleucina-1β
IL-6	Interleucina-6
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	do inglês <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
PAMPs	do inglês <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
PaO ₂	Pressão arterial de oxigênio
PBS	do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
PKA	Proteína quinase A
PRRs	do inglês <i>Pattern Recognition Receptors</i>
qSOFA	do inglês <i>Quick Sepsis-related Organ Failure Assessment</i>
SOFA	do inglês <i>Sequential Organ Failure Assessment</i>

THC	Δ^9 -tetraidrocanabinol
TLR	do inglês <i>Toll- like receptor</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
γ GT	γ -glutamil transferase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 SEPSE/CHOQUE SÉPTICO: DEFINIÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA	14
1.2 MODELOS PARA ESTUDO DA SEPSE	20
1.3 SISTEMA ENDOCANABINOIDE	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 ANIMAIS	25
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	25
3.2.1 Modelo experimental de sepse induzida por pneumonia	25
3.2.2 Grupos experimentais e protocolo de tratamento	25
3.2.3 Obtenção de amostras de sangue e lavado broncoalveolar (BAL)	26
3.2.4 Avaliação da sobrevivência, escore de severidade séptica, peso e temperatura	26
3.2.5 Histologia e escore patológico do tecido pulmonar	27
3.2.5.1 <i>Coleta e processamento dos tecidos</i>	27
3.2.5.2 <i>Inclusão dos tecidos</i>	27
3.2.5.3 <i>Secção dos tecidos</i>	27
3.2.5.4 <i>Coloração das lâminas histológicas</i>	27
3.2.5.5 <i>Análise histológica dos tecidos</i>	28
3.2.6 Razão de peso úmido/ seco do tecido pulmonar	28
3.2.7 Determinação de marcadores de dano de órgãos e contagem de plaquetas	28
3.2.8 Quantificação de citocinas inflamatórias	29
3.2.9 Expressão dos receptores CB₂ por citometria de fluxo	29
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 SOBREVIVÊNCIA, ESCORE DE SEVERIDADE SÉPTICA E TEMPERATURA CORPORAL.....	31
4.2 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO TECIDO PULMONAR.....	32
4.3 RAZÃO PESO ÚMIDO/SECO DO PULMÃO	33
4.4 DISFUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA PELA DETERMINAÇÃO DE MARCADORES DE DANO DE ÓRGÃOS E CONTAGEM DE PLAQUETAS	34

4.5 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS	36
4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR CB ₂ EM CÉLULAS MIELOIDES .	37
5 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE/CHOQUE SÉPTICO: DEFINIÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA

A sepse representa uma das maiores causas de morte em todo o mundo e é a causa mais comum de internações em unidades de terapia intensiva (UTI), além de ser reconhecida pela Organização mundial da saúde (OMS) como um importante problema de saúde pública global (Machado *et al.*, 2023; World Health Organization, 2017). Derivada do grego "sepsis", a palavra sepse tem como significado decomposição de matéria orgânica animal ou vegetal na presença de bactérias (Geroulanos; Douka, 2006). O termo "sepse" foi recentemente revisado e o consenso mais atual (Sepsis-3) define a sepse como uma disfunção orgânica com alto risco de morte causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente a uma infecção (Singer *et al.*, 2016). A evolução da sepse pode levar a um quadro chamado de choque séptico, que está associado a desregulação circulatória, celular e metabólica com um índice de mortalidade ainda maior em relação ao da sepse. Clinicamente, o choque séptico é identificado quando ocorre uma hipotensão persistente, havendo a necessidade de vasopressores para manter a pressão arterial média (PAM) superior a 65 mmHg e o lactato sérico superior a 2 mmol/L após reanimação volêmica adequada (Font; Thyagarajan; Khanna, 2020).

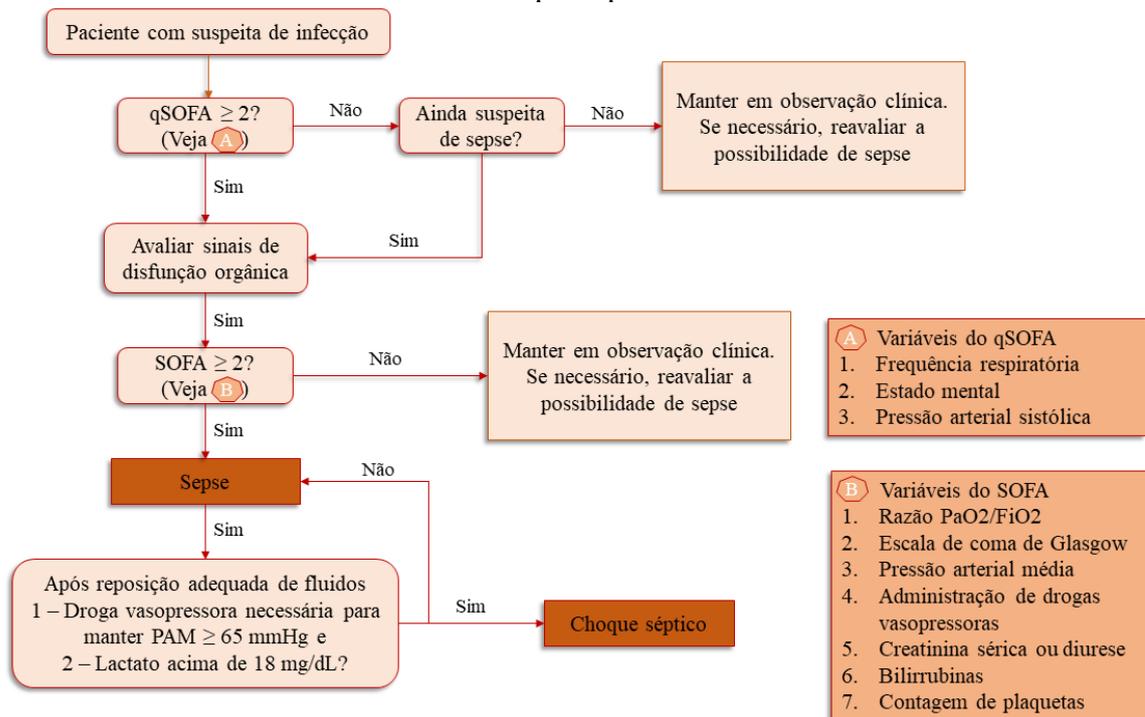
O quadro de sepse pode evoluir a partir de uma infecção primária causada por bactérias, fungos, vírus ou protozoários. Os mais prevalentes patógenos responsáveis pela infecção inicial são as bactérias gram-negativas, principalmente as espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Angus; van der Poll, 2013). A fonte mais comum de infecção entre os pacientes sépticos internados em UTIs são os pulmões (64%), abdômen (20%), corrente sanguínea (15%) e trato urinário (14%) (Font; Thyagarajan; Khanna, 2020). Ademais, existem alguns fatores associados a gravidade e ao prognóstico da sepse, entre eles estão a idade, sexo, presença de comorbidades, e a fonte de infecção. Tendo em vista que as infecções pulmonares são mais frequentes no inverno e estas retratam uma das principais causas de sepse, as estações do ano são fatores de extrema relevância (Esposito *et al.*, 2017).

Apesar de ser uma prioridade de saúde, os dados representativos da carga mundial de sepse são limitados por se tratar de uma complicação causada por infecção subjacente. Segundo Rudd *et al.* (2020), em 2017, cerca de 48,9 milhões de casos de sepse foram registrados em todo o mundo e 11,0 milhões de mortes foram relatadas, caracterizando 19,7% de todas as mortes globais. A incidência da sepse varia de forma substancial nas regiões do planeta e países de baixa renda apresentam uma situação ainda mais grave. O Brasil apresenta uma estimativa

de mais de 200.000 mortes em pacientes adultos com sepse tratados em UTI por ano, uma incidência de 36,3 casos por 1.000 pacientes/dia (Machado *et al.*, 2017). Diante destas altas taxas de incidência e mortalidade, a sepse demonstra ser um problema de extrema relevância, especialmente no que diz respeito a custos nos setores público e privado de saúde. De acordo com os dados de 2016 do Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), o gasto com cuidados aos pacientes com sepse grave ou choque séptico no Brasil foi de US\$ 10.595, um gasto diário médio de US\$ 1.028. Curiosamente, o custo diário de pacientes que não sobrevivem é mais elevado contribuindo com a associação de gravidade e custos (Rosa; Pessoa; Aragão, 2019).

Atualmente não existe um teste específico para diagnosticar a sepse. Por esse motivo, para a identificação de casos de sepse na clínica, sinais de disfunção orgânica são observados nos pacientes, sendo avaliado pelas pontuações *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) e *Quick SOFA* (qSOFA). Os critérios do qSOFA incluem: pressão arterial sistólica menor que 100 mmHg, frequência respiratória maior que 22/min e diminuição do nível de consciência (escala de coma de Glasgow inferior a 15). Já os critérios de SOFA, utilizados para confirmação da disfunção orgânica presente na sepse, incluem: baixa pressão arterial de oxigênio e fração de oxigênio inspirado (PaO_2/FiO_2), hipotensão refratária a vasopressores, plaquetopenia, baixo escore na escala de Glasgow, aumento de bilirrubinas, creatinina e oligúria. Quando o paciente apresenta dois ou mais pontos dos critérios SOFA, é definido um quadro séptico (Singer *et al.*, 2016) (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma de critérios clínicos para identificação de pacientes com sepse e choque séptico.



Fonte: elaborado pela autora. Adaptado de Singer *et al.*, 2016.

A patogênese complexa da disfunção orgânica nos casos de sepse ocorre por diversos fatores e inclui não somente desequilíbrio da resposta inflamatória, mas também disfunção imune, dano mitocondrial, coagulopatia, anormalidades da rede imune neuroendócrina, estresse do retículo endoplasmático, autofagia e outros processos fisiopatológicos que desencadeiam uma disfunção de órgãos (Huang; Cai; Su, 2019). O sistema imunológico inato, composto principalmente por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células natural killers é responsável pela resposta que ocorre no processo inflamatório inicial do quadro séptico. A ativação do sistema imune inato é mediada por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e envolve o reconhecimento de patógenos ou seus produtos, os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), nas células de defesa do hospedeiro. Dentro do contexto dessa resposta, fatores exógenos derivados do patógeno, como por exemplo lipopolissacarídeo (LPS), e fatores endógenos liberados pelas células lesadas, podem interagir com vários PRRs, como por exemplo os receptores *Toll-like* (TLRs) (Angus; van der Poll, 2013; Cohen, 2002).

Ao se tratar de bactérias gram-negativas, o LPS presente na parede celular é reconhecido pelos receptores *Toll-like receptor 4*, que leva a uma cascata de sinalização intracelular. Essa classe de receptores possui diversas funções, mas em especial na sepse, o resultado dessa

cascata de sinalização intracelular leva a ativação de diversos fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), que está envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória.

Todos esses eventos são seguidos pela produção de citocinas inflamatórias, em destaque as citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β), além da liberação de mediadores anti-inflamatórios como a interleucina 10 (IL-10), envolvida na resposta anti-inflamatória compensatória (O'Brien *et al.*, 2007). Há também outros mediadores reguladores da resposta inflamatória como as enzimas óxido nítrico sintases (NOS), ativação e recrutamento de leucócitos para os tecidos afetados pela infecção e expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais que participam do recrutamento de células do sistema imune (Angus; van der Poll, 2013).

As células endoteliais desempenham um papel essencial nas respostas sistêmicas após uma infecção (Joffre *et al.*, 2020). A disfunção endotelial está diretamente relacionada à disfunção orgânica presente na sepse, isso porque as alterações do fluxo sanguíneo microvascular são frequentes em pacientes com sepse, levando a lesões de órgãos e consequentemente à falência de órgãos (De Backer *et al.*, 2002; Joffre *et al.*, 2020). Embora não se saiba ao certo quais mecanismos são capazes de levar à disfunção microcirculatória, alguns estudos apontam que DAMPs e PAMPs, estresse oxidativo e produção alterada de óxido nítrico contribuem para a disfunção endotelial (Pool; Gomez; Kellum, 2018).

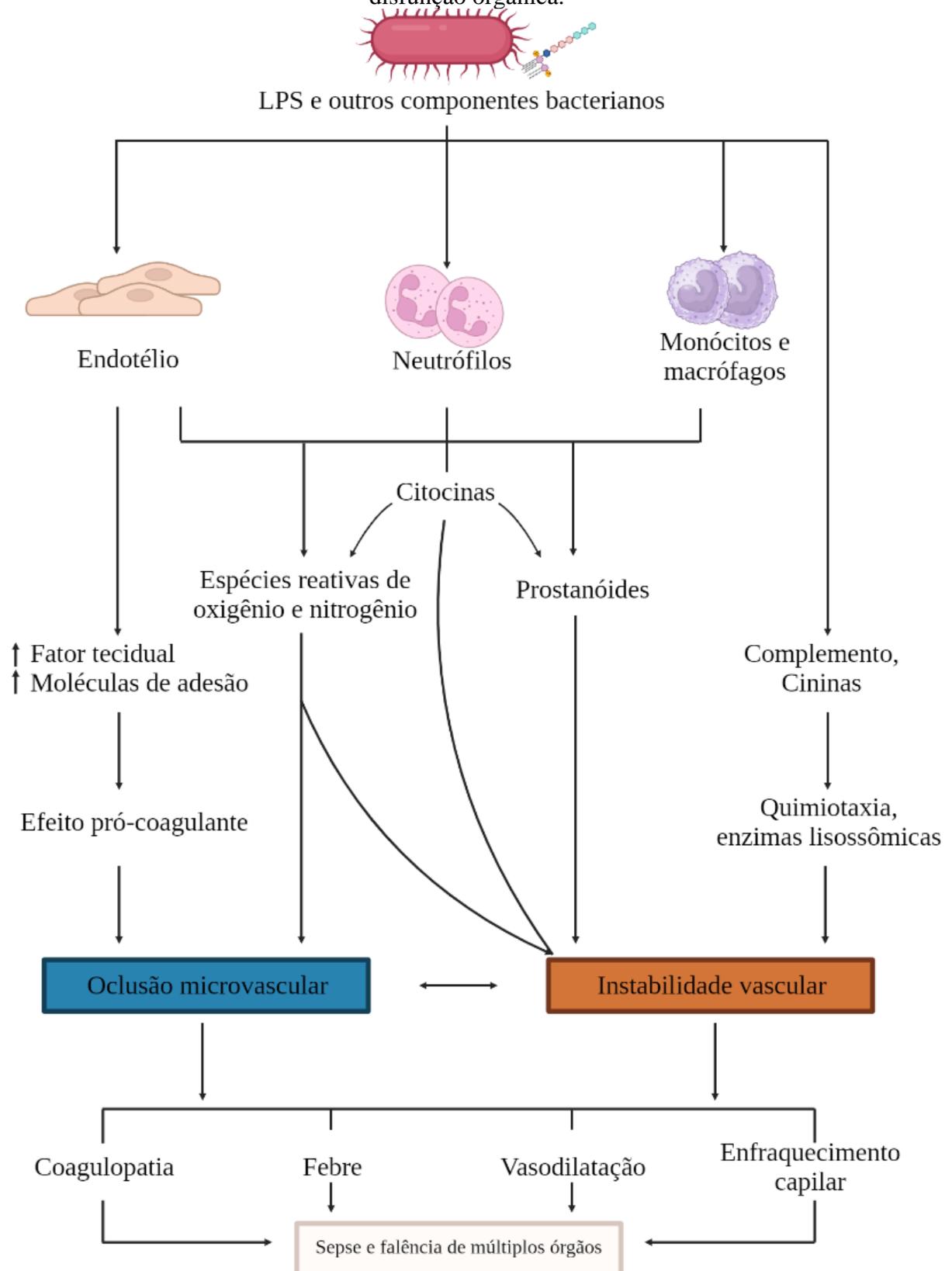
As citocinas pró-inflamatórias estimulam a síntese de moléculas de adesão em células endoteliais, levando a migração dos leucócitos da microcirculação para os locais infectados. Apesar dos neutrófilos ativados destruírem os microrganismos, eles são capazes de causar um aumento da permeabilidade vascular, levando ao extravasamento de fluido e proteínas plasmáticas para os tecidos (Henkin *et al.*, 2009; King *et al.*, 2014). As células endoteliais ativadas liberam diversas substâncias, entre elas o vasodilatador óxido nítrico (NO), que tem papel essencial na patogênese do quadro de sepse. Durante a sepse ocorre um aumento significativo na produção de NO, causando uma vasodilatação excessiva, além da formação de radicais livres que são responsáveis por efeitos tóxicos (revisado em ASSREUY, 2006).

Outra resposta que possui um importante papel na fisiopatologia da sepse é a ativação do sistema de coagulação juntamente com a inibição dos fatores anticoagulantes endógenos. Quando ocorre lesão endotelial ou a ativação do mesmo na presença de citocinas inflamatórias, a cascata de coagulação é ativada. Sabe-se que a sepse resulta em uma cascata descontrolada de coagulação, levando à coagulação intravascular disseminada, associada a coagulação exacerbada, anticoagulação prejudicada e remoção de fibrina reduzida. Como resultado, ocorre

a microtrombose em pequenos vasos, deposição de microcoágulos e obstrução de circulação, prejudicando o fluxo sanguíneo e contribuindo para a hipoperfusão e, conseqüentemente, disfunção orgânica (Machado; Silva, 2006).

Embora a resposta inflamatória desregulada seja uma importante característica da sepse, ela não é a única. A disfunção endotelial juntamente com a cascata descontrolada de coagulação são fatores que estão diretamente relacionados a graves prejuízos ao hospedeiro além de estarem associados à falência de múltiplos órgãos presente na sepse (Figura 2).

Figura 2 - Esquema simplificado do mecanismo fisiopatológico da sepse que contribui para a disfunção orgânica.



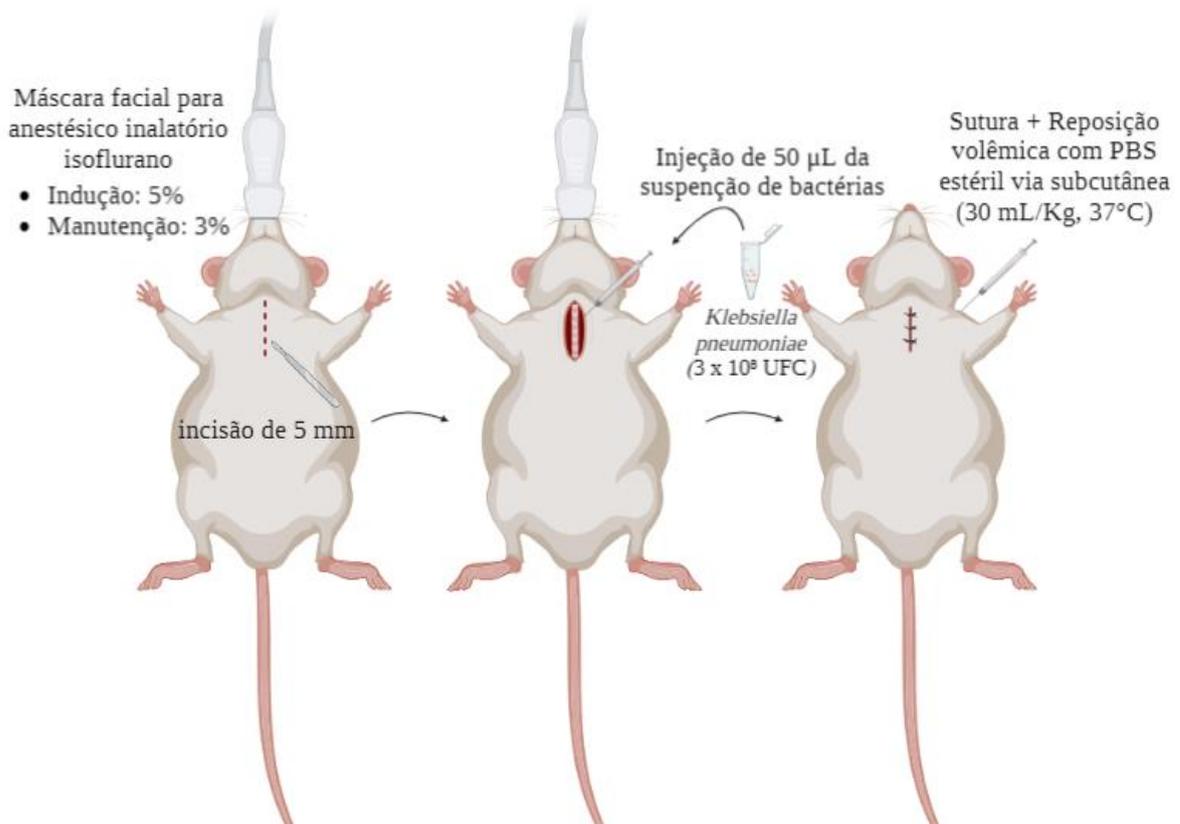
Fonte: elaborado pela autora. Adaptado de Lolis e Bucala, 2003.

1.2 MODELOS PARA ESTUDO DA SEPSE

Os modelos murinos de sepse mais utilizados para o estudo dessa condição incluem administração de endotoxina, como por exemplo LPS bacteriano, ligadura e punção cecal (CLP) e injeção de patógenos vivos (Kingsley; Bhat, 2016). A sepse induzida por pneumonia é um modelo clinicamente relevante pois as infecções das vias aéreas são as mais comuns entre os pacientes sépticos. Trata-se de um modelo que permite várias vias de administração como a intranasal, intratraqueal, intrabrônquica, spray, dentre outras (Korneev, 2019).

A sepse induzida por pneumonia através da administração intratraqueal (i.t) da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, mimetiza um foco infeccioso de início pulmonar e posteriormente progride para um quadro de sepse (Figura 3). De acordo com SORDI *et al.* (2013), esse modelo é interessante para estudar as alterações inflamatórias e cardiovasculares que ocorrem na sepse, pois é possível observar nos animais 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).

Figura 3 - Esquema representativo do modelo de sepse induzida por pneumonia.



Fonte: elaborado pela autora.

1.3 SISTEMA ENDOCANABINOIDE

O sistema endocanabinoide vem sendo amplamente investigado e parece estar envolvido no desenvolvimento do sistema nervoso, com participação relevante em processos cognitivos e fisiológicos. Ele é composto pelos receptores canabinoides (CBR) CB₁ e CB₂, seus ligantes endógenos, chamados de endocanabinoides (eCBs) e as enzimas responsáveis pelo transporte, síntese e degradação dos eCBs (Lu; Mackie, 2021). Os principais eCBs são aracdonoil-etanolamina, mais conhecida como anandamida (AEA) (Devane *et al.*, 1992), e o 2-aracdonoilglicerol (2-AG) (Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995). Esses eCBs ativam os CBR, onde AEA se comporta como um agonista parcial de CB₁ e CB₂ e o 2-AG um agonista pleno dos dois receptores. Além dos eCBs, existem também os canabinoides exógenos ou derivados de plantas (fitocanabinoides), que se referem aos canabinoides extraídos da *Cannabis sativa*, e os sintéticos (Hourani; Alexander, 2018).

Um grupo clássico de agonistas dos CBR são os derivados de dibenzopiranos, como o Δ^9 -tetraidrocannabinol (THC), principal constituinte psicoativo da *Cannabis*, e o 11-hidroxi- Δ^8 -THC-dimetilptil (HU-210). Por outro lado, agonistas com maior afinidade por receptores CB₂ do que CB₁ incluem os compostos AM1241, HU-308 e JWH-133. Alguns compostos foram desenvolvidos para ter uma ação antagonista dos CBR, como é o caso do rimonabanto e seus análogos estruturais AM251 e AM281, com afinidade para o receptor CB₁, e o composto AM630, que bloqueia a ação do receptor CB₂ (Pertwee, 2010).

Quadro 1 - Principais agonistas e antagonistas canabinoides.

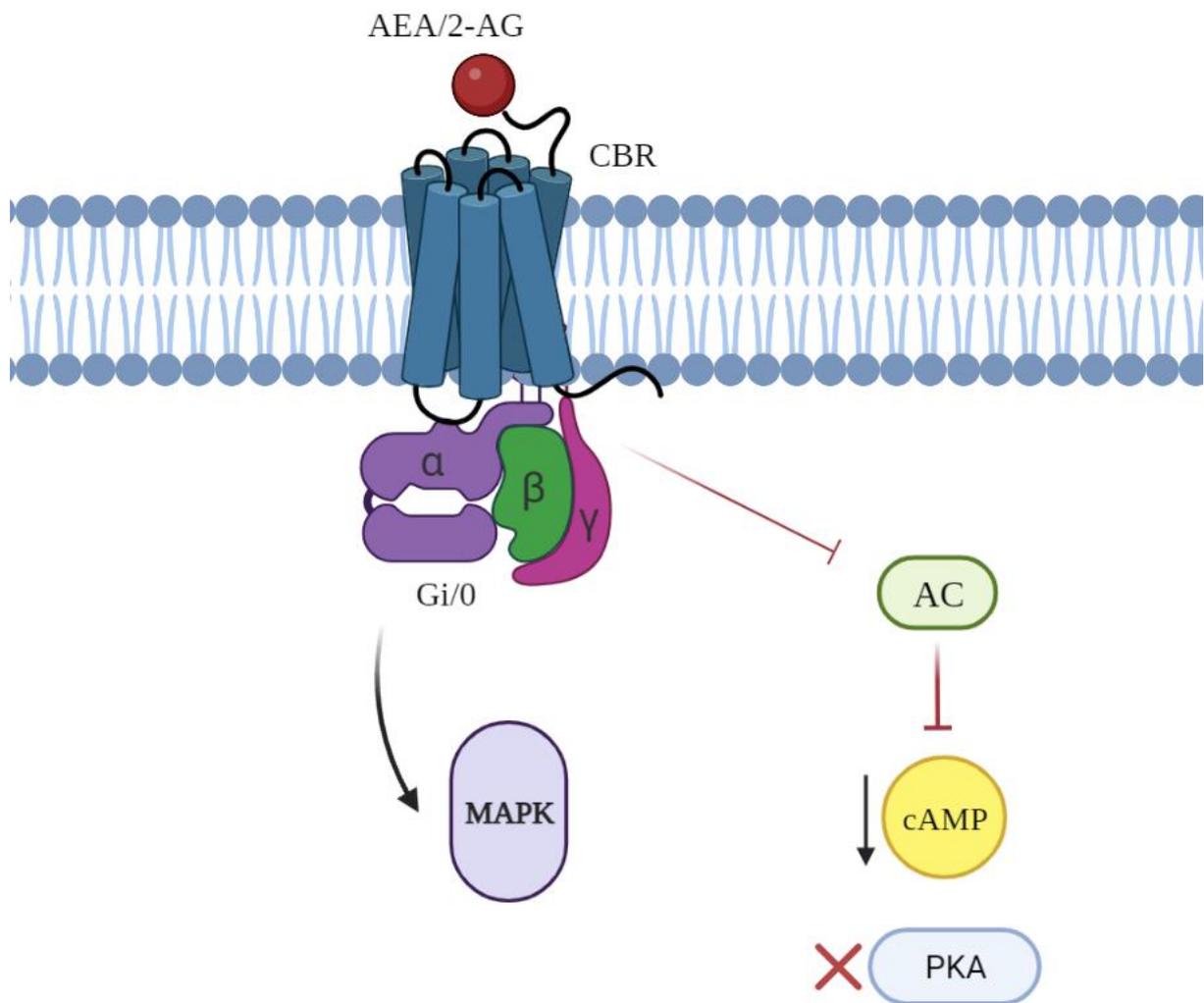
Nome	Alvo	Ação
Δ^9 -THC	CB ₁ /CB ₂	Agonista
HU-210	CB ₁ /CB ₂	Agonista
AM1241	CB ₂	Agonista
HU-308	CB ₂	Agonista
JWH-133	CB ₂	Agonista
Rimonabanto	CB ₁	Antagonista
AM251	CB ₁	Antagonista
AM281	CB ₁	Antagonista
AM630	CB ₂	Antagonista

Fonte: elaborado pela autora.

Os CBR pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G principalmente do tipo inibitória (Gi/o), e possuem sete domínios transmembrana, um domínio amino-terminal extracelular e um domínio carboxila-terminal intracelular. O processo de ativação dos CBR por

seus ligantes envolve a dissociação da proteína G acoplada em subunidade alfa, que se liga à adenilato ciclase (AC) inibindo a sua atividade, reduzindo os níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) e, portanto, a ativação da proteína quinase A (PKA) (Howlett, 2005). Além dessa via, a ativação dos CBR regula de maneira positiva a cascata de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que é associada a migração, proliferação e apoptose celular, e ainda a produção de citocinas inflamatórias (Figura 4) (revisado em MALFITANO *et al.*, 2014).

Figura 4 - Representação das vias de sinalização dos receptores canabinoides acoplados à proteína Gi/o.



Fonte: elaborado pela autora.

Na figura estão representados: anandamida (AEA), 2-aracdonilglicerol (2-AG), receptor canabinoide (CBR), proteína G inibitória (Gi/o), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), adenilato ciclase (AC), adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) e proteína quinase A (PKA).

Os receptores CB₁ são conhecidos por suas propriedades psicoativas, sendo expressos por neurônios centrais e periféricos, modulando a liberação de neurotransmissores. Estes receptores estão localizados em áreas que envolvem controle motor, resposta emocional, aprendizagem e memória, entre outras (Kano *et al.*, 2009). Além disso, os receptores CB₁ são expressos também em tecidos periféricos, como o sistema cardiovascular, reprodutivo e trato gastrointestinal (Pertwee, 1997). Por outro lado, os receptores CB₂ são conhecidos por seu papel na inflamação. São expressos principalmente nas células do sistema imune, como linfócitos, macrófagos, células mononucleares, mastócito e microglia, principalmente modulando a liberação de citocinas, além de diversas outras ações (Howlett; Abood, 2017). Estudos mostram que estes receptores também estão presentes no sistema nervoso central, predominantemente em células da glia (Chen *et al.*, 2017) e em células endoteliais (Bondarenko *et al.*, 2018).

A participação do eCB na sepse vem sendo explorado largamente em diversos trabalhos na literatura. Por exemplo, recentemente, Liu *et al.*, (2020) relataram que a ativação do receptor CB₂ com agonista HU308 foi capaz de reduzir a lesão pulmonar em camundongos sépticos, além de observarem uma redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-18). Em outro estudo foi avaliado o efeito da ativação do receptor CB₂ utilizando o agonista JWH-133, onde demonstraram uma diminuição nos níveis séricos de IL-6 e IL-1 β , além de uma diminuição na expressão de TNF- α , IL-6, IL-1 β e NF- κ B no cérebro, pulmão, fígado e coração de ratos sépticos (Çakır *et al.*, 2020).

Os receptores CB₂ possuem uma participação importante na modulação da resposta imune e dos processos inflamatórios, se tornando uma alternativa terapêutica relevante no quadro de sepse. Contudo, os mecanismos pelos quais esses receptores exercem seus efeitos precisam ser melhor elucidados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um agonista de receptores canabinoides do tipo 2 (CB₂) nas alterações inflamatórias em um modelo de sepse induzida por pneumonia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Induzir a sepse experimental e avaliar a sobrevivência, escore de severidade séptica e temperatura dos animais;
2. Avaliar as alterações histológicas no tecido pulmonar 24 h após a indução da sepse por pneumonia;
3. Avaliar o aumento da permeabilidade vascular e formação de edema pulmonar através da proporção de peso úmido/seco dos tecidos pulmonares;
4. Avaliar a disfunção renal e hepática pela determinação de marcadores de dano de órgãos no plasma e avaliar a quantidade de plaquetas no sangue de camundongos 24 h após a indução da sepse por pneumonia;
5. Avaliar citocinas inflamatórias no lavado broncoalveolar (BAL) e no plasma 24 h após a indução da sepse por pneumonia;
6. Avaliar a expressão dos receptores CB₂ nas células do lavado broncoalveolar (BAL) em camundongos machos 24 h após a indução da sepse por pneumonia, utilizando a técnica de citometria de fluxo;
7. Avaliar o efeito do tratamento com agonista CB₂ (AM1241) nas alterações observadas nos objetivos específicos 1 a 6.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos suíços machos, com idade entre 50 e 60 dias, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram levados para o biotério do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Renal (LabCaRe) e tratados com anti-helmíntico Albendazol (2mL/300mL água de beber) por 3 dias. Após este tratamento, os animais foram mantidos em repouso por pelo menos 7 dias antes da realização dos experimentos. 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.

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Modelo experimental de sepse induzida por pneumonia

Para realização do modelo de sepse induzida por pneumonia, camundongos suíços machos foram anestesiados com anestésico inalatório (isoflurano 5%), seguido pela manutenção anestésica via máscara facial (isoflurano 3%). Os animais foram mantidos na posição supino inclinado e após a confirmação da ausência de reflexos, 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 *Klebsiella pneumoniae* conforme trabalhos prévios (Sordi *et al.*, 2013). 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.

3.2.2 Grupos experimentais e protocolo de tratamento

Camundongos machos foram submetidos ao modelo de sepse induzido por pneumonia e animais *naïve* foram utilizados como controle. 6 e 12 h após a inoculação da bactéria, os

animais receberam o agonista CB₂ AM1241 (3 mg/kg; i.p.) ou o veículo dimetilsulfóxido (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). A dose do agonista CB₂ foi escolhida com base na literatura (Barutta et al., 2011; Curto-Reyes et al., 2010). As análises foram realizadas 24 h após indução do quadro de sepse. Os animais foram divididos em 3 grupos:

<i>Naïve</i>
Sepse + Veículo (DMSO)
Sepse + agonista CB ₂ AM1241

3.2.3 Obtenção de amostras de sangue e lavado broncoalveolar (BAL)

Para a coleta de sangue e BAL, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (90 e 10 mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal (i.p.). Após confirmação da ausência de reflexos, o sangue foi coletado por punção cardíaca, centrifugado e o plasma resultante foi armazenado em freezer a – 80 °C para as análises.

Além disso, os animais tiveram suas traqueias expostas e um cateter (21 G) acoplado a uma seringa que foi introduzido na traqueia para que fosse possível injetar vagarosamente 1 mL de PBS estéril nos pulmões dos animais, sendo em seguida o líquido aspirado de volta à seringa. Este procedimento foi repetido 3 vezes para a coleta do BAL.

3.2.4 Avaliação da sobrevida, escore de severidade séptica, peso e temperatura

Foi investigada a sobrevida dos animais frente ao tratamento com agonista CB₂ (AM1241). Para tal, foi observada a curva de sobrevida dos animais a cada 24 h pelo tempo total de 72 h após indução da sepse. Além disso, foi realizado o escore de severidade séptica observando parâmetros descritos na literatura (Alves *et al.*, 2022) como letargia, piloereção, tremores, exsudatos periorbitais, dificuldade respiratória e diarreia, onde valores de escore >3 foi considerada sepse grave e valores ≤3 sepse moderada. Por fim foi realizada a aferição de temperatura em 24 h por via retal. Durante a avaliação os animais foram mantidos em local com temperatura e ciclo de luz controlados, com livre acesso à ração e água. Ao final da curva os animais que sobreviveram foram eutanasiados com sobredose de anestésico cetamina e xilazina (200/50 mg/kg).

3.2.5 Histologia e escore patológico do tecido pulmonar

3.2.5.1 Coleta e processamento dos tecidos

Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (90 e 10 mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal (i.p.). Após confirmação da ausência de reflexos, os animais foram perfundidos com uma solução de paraformaldeído 4%. Em seguida os tecidos foram coletados, preenchidos com 1 mL de solução de formalina 4% e deixados nessa solução por 24 h para fixação, e após isso a solução foi substituída por etanol 70%. As amostras foram colocadas individualmente em cassetes histológicos identificados.

3.2.5.2 Inclusão dos tecidos

Logo após o término do processamento as amostras foram levadas ao equipamento Emblocador de amostras Leica EG1150H, proveniente do LAMEB-UFSC. Com a parafina em estado líquido, os cassetes foram transferidos para o recipiente de ambientação, onde permaneceu de 40 a 60 minutos para adequar-se a temperatura, cada cassette foi retirado do banho de parafina e os tecidos imersos em uma forma com parafina. Após ajeitar a amostra, o material foi levado a uma placa fria para a solidificação da parafina e conseqüentemente a formação do bloco.

3.2.5.3 Secção dos tecidos

Depois de 24 h emblocados a 4 °C, os tecidos foram levados ao Micrótopo Rotativo Leica RM2255 do LAMEB e seccionados na espessura de 5 µm. Assim que o seccionamento alcançou o material, os filetes de parafina foram colocados em banho-maria contendo oito gramas de gelatina sem sabor diluídos em 4 litros de água. A parafina com o tecido ficou em média 5 minutos no banho-maria para estabilizar e em seguida os cortes foram colocados em lâminas histológicas, seguindo para secagem ao ar livre.

3.2.5.4 Coloração das lâminas histológicas

Depois do material seco, as lâminas histológicas seguiram para o equipamento de Sistema de Coloração de Lâminas Leica AutoStainer XL proveniente do LAMEB-UFSC, seguindo o protocolo padrão de coloração com hematoxilina e eosina.

3.2.5.5 Análise histológica dos tecidos

Os cortes foram analisados de maneira semi-quantitativa com base no grau e extensão da inflamação como descrito previamente (Beck *et al.*, 2001; Sordi *et al.*, 2013). Utilizou-se a escala representada no Quadro 2.

Quadro 2 - Pontuação de escore utilizado para avaliação de dano microscópico.

<i>Escores</i>	<i>Descrição</i>
0	Ausência de inflamação
1	Pouca/moderada infiltração de células
2	Infiltrado inflamatório envolvendo aproximadamente 25-50% do pulmão
3	Infiltrado inflamatório severo envolvendo 50-75% do pulmão
4	Infiltrado inflamatório em praticamente todo tecido pulmonar

Fonte: elaborado pela autora.

3.2.6 Razão de peso úmido/ seco do tecido pulmonar

Os animais foram anestesiados com a solução de cetamina e xilazina (90 e 10 mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal (i.p.) e foram obtidos tecidos pulmonares. O lobo pulmonar superior esquerdo foi pesado (peso úmido) e seco em estufa mantida a 70 °C até que o peso se mantivesse constante (peso seco) conforme trabalhos prévios (Zhou *et al.*, 2022). As razões de peso úmido/seco do pulmão foram calculadas e expressas como valor relativo.

3.2.7 Determinação de marcadores de dano de órgãos e contagem de plaquetas

No sangue coletado dos animais (item 3.2.3) foi realizada a determinação de lactato através de aparelho medidor de lactato (Accutrend Plus Roche Diagnostics). A contagem de plaquetas foi feita utilizando um hemocitômetro. Posteriormente o plasma foi obtido e realizou-se as determinações de creatinina, bilirrubina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina

aminotransferase (ALT). Essas determinações foram realizadas com kits comercialmente disponíveis (LabTest, Lagoa Santa, MG) de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.8 Quantificação de citocinas inflamatórias

A citocina anti-inflamatória IL-10 foi mensurada no plasma e a citocina pró-inflamatória IL-1 β foi mensurada no BAL e no plasma através de kits de ELISA comercialmente disponíveis.

3.2.9 Expressão dos receptores CB₂ por citometria de fluxo

As amostras de BAL obtidas no (item 3.2.3) foram incubadas por 5 minutos com solução de lise (Gibco® ACK lysing buffer, Invitrogen, UK). Em seguida, as células foram lavadas e centrifugadas (1200 g, 5 min, 4 °C). Alíquotas de 2-5 x 10⁵ células foram suspensas em tampão de citometria e incubadas com anticorpo anti-FPR2 (clone M-73; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e várias combinações de anticorpos específicos para as moléculas de superfície de interesse: Gr-1-PE (Ly-6G e Ly-6C; clone RB6-8C5), F4/80 eFluor® 450 (marcador pan de macrófagos; clone BM8, eBioscience, CA, EUA) e CB₂ (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA, cat n. 101550). Após este período, as amostras foram novamente lavadas e incubadas (0,5 h, 4 °C, escuro) com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen, UK). Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas (1200 g, 5 min, 4 °C), o sobrenadante descartado, as células foram suspensas em tampão de citometria e adquiridas pelo citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, CA, EUA). Os dados foram coletados com o programa FACSDiva (BD Biosciences, CA, EUA) e analisados utilizando o software Flowjo (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão da média do número de animais utilizados em cada experimento. Foi verificado se os dados apresentaram normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Quando necessário, foi realizada transformação logarítmica para garantir a normalidade e homogeneidade das variâncias.

A significância estatística foi analisada por análise de variância de uma via (one way ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Tukey. As diferenças na sobrevivência foram determinadas com o teste log rank. Os dados não paramétricos foram analisados por Kruskal-wallis seguido de teste *post hoc* de Dunn e o teste de Mann-Whitney. Os outliers foram detectados e removidos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo. Foi utilizado para as análises dos dados o software comercial de gráficos e estatísticas GraphPad Prism 9.0 (San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

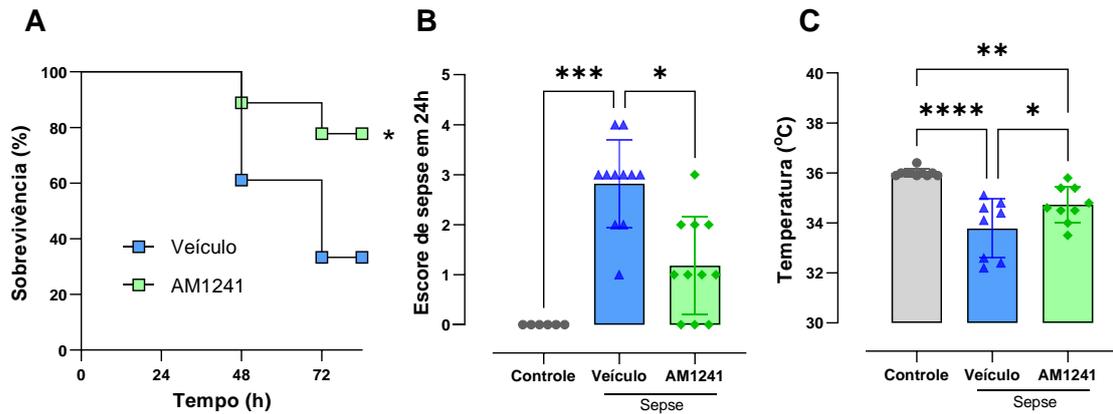
4.1 SOBREVIVÊNCIA, ESCORE DE SEVERIDADE SÉPTICA E TEMPERATURA CORPORAL

A sepse é uma condição que pode progredir rapidamente e é descrita por uma alta taxa de mortalidade. O risco de morte aumenta à medida que a gravidade da sepse progride. Na literatura já foi demonstrado que há uma melhora na sobrevida global em modelos de sepse em camundongos usando agonistas sistêmicos do receptor CB₂ (GUI et al., 2013; ZHANG et al., 2021). Desse modo, inicialmente foi realizada a curva de sobrevivência dos animais. Observou-se que os animais sépticos tratados com AM1241 exibiram um aumento significativo no percentual de sobrevivência quando comparados aos animais sépticos que receberam apenas veículo (Fig. 5A). Além disso, o tratamento com o agonista AM1241 demonstrou uma diminuição na pontuação de gravidade da sepse (Fig. 5B).

As alterações na temperatura corporal podem ser frequentemente observadas em pacientes e animais experimentais. Em determinadas situações, humanos e roedores apresentam respostas diferentes às infecções. Geralmente, os animais apresentam uma diminuição da temperatura corporal em resposta a uma infecção (Saito *et al.*, 2003). Por exemplo, Alexander *et al* (1991) observaram que, após o CLP, os ratos desenvolvem gradualmente taquicardia, hipotensão, taquipneia e hipotermia. Vale destacar que alguns autores demonstraram que pacientes com sepse que desenvolvem hipotermia apresentam mortalidade significativamente maior, além de pontuações de avaliação de falência de órgãos muito mais altas (Arons et al., 1999; Clemmer et al., 1992). Os resultados deste trabalho mostraram que o tratamento com AM1241 foi capaz de restaurar a temperatura corporal dos animais sépticos (Fig. 5C).

Todos esses achados sugerem que o tratamento com o agonista AM1241 melhora a sobrevida e diminui a gravidade da sepse, além de atenuar a hipotermia induzida por esse quadro.

Figura 5 - Efeito do agonista CB₂ na sobrevivência, gravidade da sepse e temperatura.

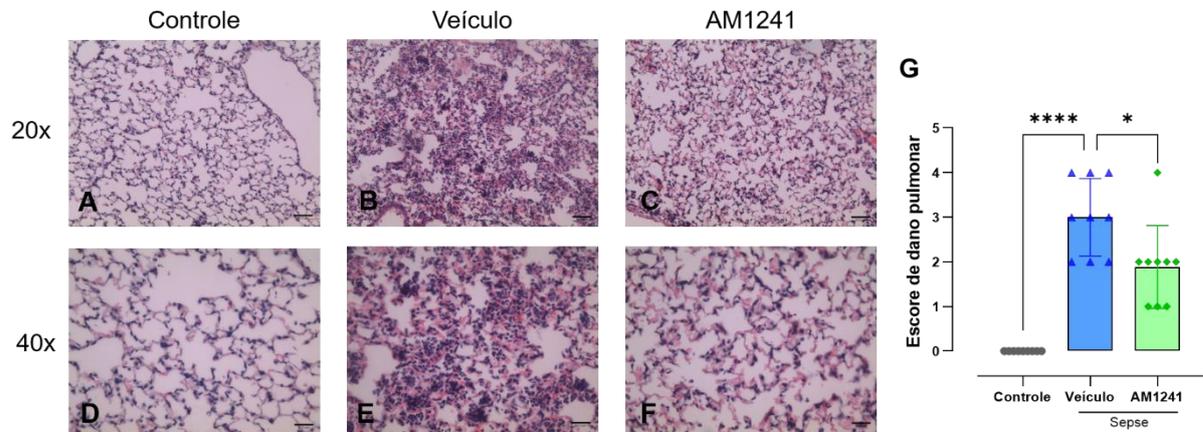


Os camundongos foram inoculados (i.t.) com 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*. Seis e 12 h após receberam veículo ou o agonista CB₂ (AM1241) e a taxa de sobrevivência foi avaliada até 72 h. Os resultados foram expressos como percentual de sobrevivência (A) (n = 15, teste log-rank). A gravidade da sepse foi avaliada por meio de um escore clínico (B) (n = 6–11, kruskal-wallis seguido de teste *post hoc* de Dunn) e a temperatura corporal foi observada em 24 h após a cirurgia (C) (n = 8–11, análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Tukey). Os resultados representam a média \pm desvio padrão e cada ponto representa um animal. *p<0,05.

4.2 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO TECIDO PULMOMAR

O sítio mais comum de infecção dos pacientes sépticos são os pulmões, sendo este um dos órgãos mais vulneráveis na sepse. Além disso, a lesão pulmonar associada à sepse se apresenta histologicamente com infiltração de células inflamatórias, danos às células endoteliais e edema (Angus; van der Poll, 2013; Liu et al., 2020). Hall *et al* (2022) investigaram o efeito do agonista CB₂ HU-308 na inflamação pulmonar em um modelo experimental animal de lesão pulmonar aguda induzida por pneumonia e observaram que o tratamento reduziu modestamente a lesão pulmonar histológica, sugerindo uma atenuação da lesão pulmonar. Quando comparado aos pulmões dos animais controle (Fig. 6A e 6D), os camundongos sépticos apresentaram lesão pulmonar com exsudato e infiltração visível de células inflamatórias nos alvéolos pulmonares (Fig. 6B e 6E). O tratamento dos animais com AM1241 (Fig. 6C e 6F) atenuou a lesão pulmonar significativamente (Fig. 6G). Esses achados sugerem que o tratamento com o agonista AM1241 reduz a lesão pulmonar associada à sepse.

Figura 6 - Efeito do agonista CB₂ na histologia pulmonar de camundongos submetidos à sepse induzida por pneumonia.



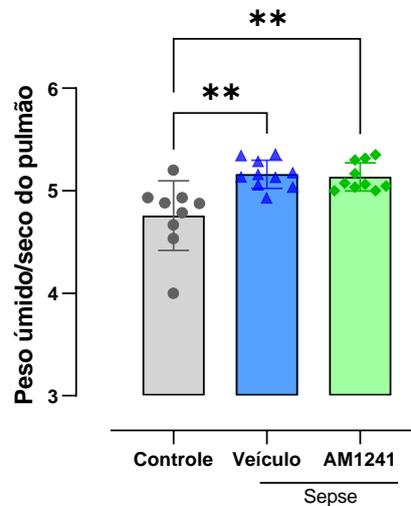
Os camundongos foram inoculados (i.t.) com 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*. Seis e 12 h após receberam veículo ou o agonista CB₂ (AM1241) e 24 h após, foram sacrificados. Os pulmões foram coletados, secções de 5 μ m foram obtidas e coradas com HE. Imagens representativas dos pulmões são mostradas com objetiva de 20x (A-C) e 40x (D-F). O escore de dano pulmonar é exibido no painel G e foi realizado conforme detalhado na seção de métodos. Os resultados representam a média \pm desvio padrão e cada ponto representa um animal (n = 9). *p<0,05, teste de Mann-Whitney.

4.3 RAZÃO PESO ÚMIDO/SECO DO PULMÃO

A razão do peso úmido/seco do pulmão é um índice bastante utilizado em trabalhos experimentais para avaliar aumento da permeabilidade vascular e formação de edema pulmonar.

Como esperado, durante a sepse foi possível observar um aumento de edema pulmonar nos animais quando comparados aos pulmões dos animais controle, corroborando outros dados da literatura (Jiang; Chen; Jiang, 2020) e também os resultados observados na histologia. Por outro lado, o tratamento com o agonista CB₂ não foi capaz de atenuar esse edema (Fig. 7).

Figura 7 - Efeito do agonista CB₂ no edema pulmonar de camundongos submetidos à sepse induzida por pneumonia.

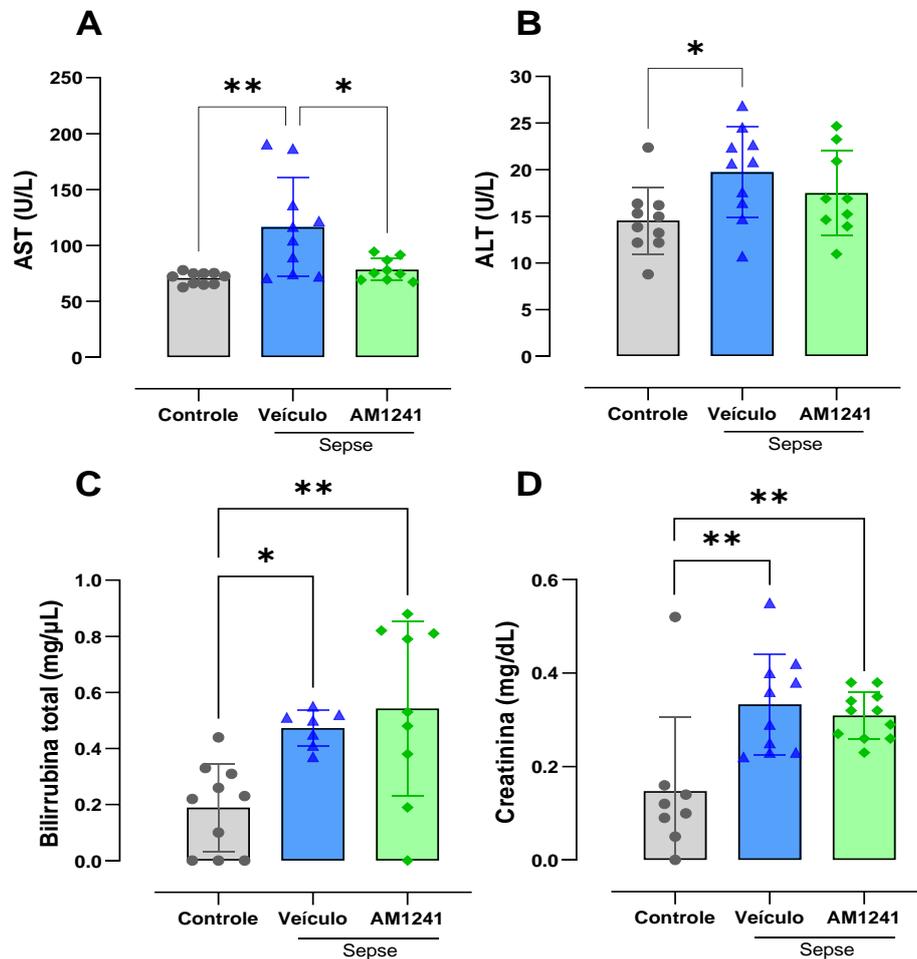


Os camundongos foram inoculados (i.t.) com 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*. Seis e 12 h após receberam veículo ou o agonista CB₂ (AM1241) e 24 h após, foram sacrificados. Os pulmões foram coletados e o lobo pulmonar superior esquerdo foi pesado e seco em estufa mantida a 70 °C até que o peso se mantivesse constante. A razão do peso úmido/seco do pulmão é mostrada na figura. Os resultados representam a média \pm desvio padrão e cada ponto representa um animal (n = 9–10). *p<0,05, análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Tukey.

4.4 DISFUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA PELA DETERMINAÇÃO DE MARCADORES DE DANO DE ÓRGÃOS E CONTAGEM DE PLAQUETAS

A disfunção ou falência de múltiplos órgãos da sepse pode afetar diversos sistemas do corpo, como o sistema nervosa central, respiratório, cardiovascular, hepático e renal. Alguns estudos realizam a análise de marcadores de dano e disfunção de órgãos para observar a gravidade sepse e outras doenças. Por exemplo, Ruetten e Thiemermann (1997) observaram que a endotoxemia causou aumentos nos níveis séricos de ureia e creatinina (disfunção renal), ALT, AST, bilirrubina e γ -glutamil transferase (γ GT) (lesão hepática), lipase (lesão pancreática) e lactato. Dessa forma, inicialmente marcadores de dano hepático foram avaliados no plasma dos animais. Durante a sepse, foi possível observar um aumento nos níveis de AST (Fig. 8A), ALT (Fig. 8B) e bilirrubina (Fig. 8C). O tratamento com AM1241 foi capaz de diminuir os níveis de AST, sugerindo uma melhora no dano hepático causado pelo quadro de sepse. A creatinina, um importante marcador de disfunção renal, mostrou um aumento significativo nos animais sépticos (Fig. 8D). Contudo, o tratamento com AM1241 não reverteu esse aumento. Estes dados sugerem que o tratamento dos animais com AM1241 reduz o dano hepático durante a sepse experimental.

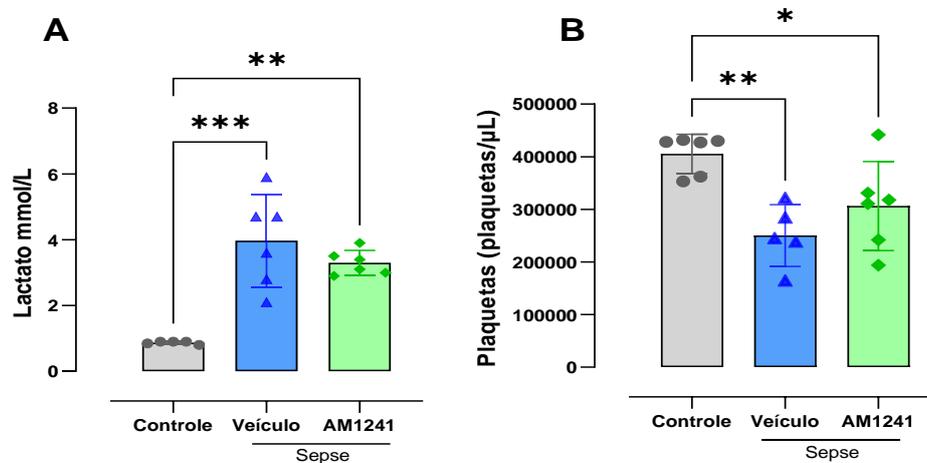
Figura 8 - Dosagem de AST, ALT, bilirrubina e creatinina no plasma de camundongos submetidos à sepse induzida por pneumonia.



Os camundongos foram inoculados (i.t.) com 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*. Seis e 12 h após receberam veículo ou o agonista CB₂ (AM1241) e 24 h após, foram sacrificados. O sangue foi coletado e o plasma foi utilizado para determinação dos marcadores de disfunção orgânica. A dosagem de AST (A), ALT (B), bilirrubina (C) e creatinina (D) é mostrada na figura. Os resultados representam a média ± desvio padrão e cada ponto representa um animal (n = 7–11). *p<0,05, análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Tukey.

Em pacientes com sepse, a causa mais provável para que ocorra aumento dos níveis de lactato é o fornecimento inadequado de oxigênio (Bakker; Nijsten; Jansen, 2013). Além disso, um dos critérios utilizados no diagnóstico da disfunção orgânica presente na sepse é a plaquetopenia (Singer *et al.*, 2016). Durante a sepse, foi observado um aumento nos níveis de lactato (Fig. 9A), bem como uma diminuição no número de plaquetas (Fig. 9B). No entanto, o tratamento com AM1241 não conseguiu restaurar os valores normais de lactato e plaquetas.

Figura 9 - Dosagem de lactato e contagem de plaquetas no sangue de camundongos submetidos à sepse induzida por pneumonia.



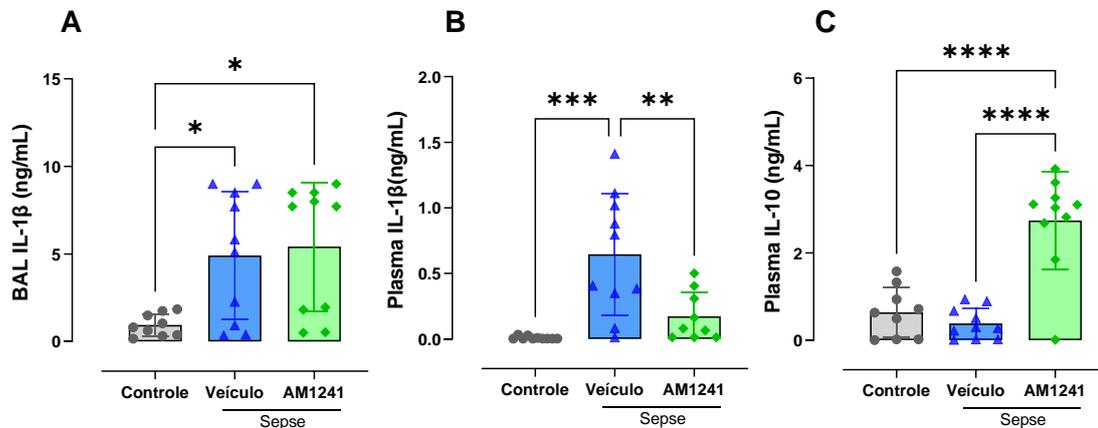
Os camundongos foram inoculados (i.t.) com 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*. Seis e 12 h após receberam veículo ou o agonista CB₂ (AM1241) e 24 h após, foi feita determinação de lactato (A) e contagem de plaquetas (B) através do sangue dos animais. Os resultados representam a média \pm desvio padrão e cada ponto representa um animal (n = 5–6). Análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Tukey. *p<0,05 é considerado significativo.

4.5 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

As citocinas de forma geral têm como função uma sinalização no organismo frente uma inflamação. A presença de citocinas pró-inflamatórias na circulação indica uma inflamação sistêmica como ocorre na sepse, dessa forma elas se tornam um importante marcador (Walley *et al.*, 1996). Houve aumento da citocina pró-inflamatória IL-1 β no plasma e no BAL de camundongos sépticos quando comparados ao grupo controle. O tratamento de camundongos sépticos com AM1241 reduziu os níveis de IL-1 β sistêmicos (plasma; Fig. 10B), mas não locais (BAL; Fig. 10A). Além disso, o tratamento dos animais sépticos com o agonista CB₂, aumentou a citocina anti-inflamatória IL-10 no plasma (Fig. 10C).

Embora o tratamento com AM1241 não tenha tido efeito sobre os níveis locais da citocina pró-inflamatória IL-1 β , os níveis sistêmicos desta citocina foram reduzidos pelo agonista CB₂, corroborando outros estudos (Lehmann *et al.*, 2012; Tschöp *et al.*, 2009). É crucial notar que os níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, registraram aumento em animais que receberam tratamento com AM1241. Estas descobertas sugerem que AM1241 reduziu a inflamação sistêmica e contribuiu para a resolução da inflamação.

Figura 10 - Dosagem de IL-10 e IL-1 β no plasma e BAL de camundongos submetidos à sepse induzida por pneumonia.



Os camundongos foram inoculados (i.t.) com 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*. Seis e 12 h após receberam veículo ou o agonista CB₂ (AM1241) e 24 h após, foram sacrificados. O sangue foi coletado e o plasma foi utilizado para dosagem da citocina anti-inflamatória IL-10 (C) e pró-inflamatória IL-1 β (B). No BAL coletado dos camundongos foi feita a dosagem de IL-1 β (A). Os resultados representam a média \pm desvio padrão e cada ponto representa um animal (n = 9–10). * $p < 0,05$, análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Tukey.

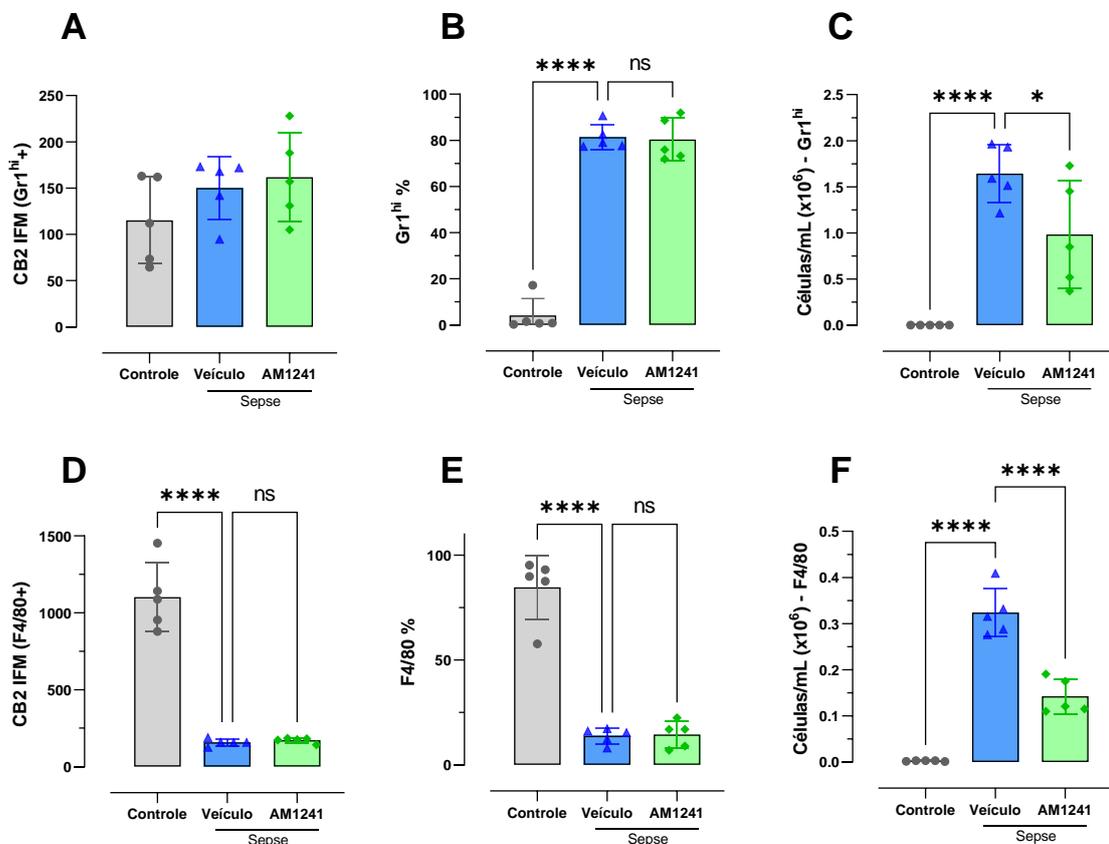
4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR CB₂ EM CÉLULAS MIELOIDES

O receptor CB₂ é expresso principalmente em macrófagos (CD45⁺, F4/80⁺) em comparação com neutrófilos (CD45⁺, Gr1^{high}). Durante a sepse, foi possível observar uma redução da expressão do receptor CB₂ em macrófagos (Fig. 11D), mas não em neutrófilos (Fig. 11A), em comparação com o grupo controle. O tratamento com AM1241 não alterou estes parâmetros. Além disso, a sepse aumentou a porcentagem de neutrófilos (CD45⁺, Gr1^{high}) em relação aos leucócitos totais e, conseqüentemente, a porcentagem de macrófagos (CD45⁺, F4/80⁺) diminuiu, independentemente do tratamento com AM1241 (Fig. 11B e 11E). No entanto, a avaliação das contagens de células mostrou que o tratamento com AM1241 reduziu o número total de neutrófilos e macrófagos no BAL de camundongos sépticos (Fig. 11C e 11F). Tomados em conjunto, esses resultados mostram uma redução da expressão do receptor CB₂ em macrófagos durante a sepse induzida por pneumonia, e o agonista do receptor CB₂ AM1241 foi capaz de reduzir a migração de macrófagos e neutrófilos para o local inflamatório. Portanto, é possível sugerir que esta importante redução na expressão dos receptores CB₂ nos macrófagos, células que desempenham papéis importantes na resposta imunitária, pode apresentar conseqüências cruciais na gravidade da sepse induzida por pneumonia.

A redução da migração celular para os pulmões nos camundongos tratados com AM1241 é consistente com estudos anteriores que demonstram a redução da adesão e migração de leucócitos em camundongos tratados com agonistas do receptor canabinoide CB₂ submetidos a modelos agudos de endotoxemia e sepse (Lehmann et al., 2012; Leite-Avalca; Zampronio; Lehmann, 2021).

Embora haja carência de dados acerca da expressão e ativação dos receptores CB₂, sabe-se que a sua ativação desempenha um papel fundamental na polarização e migração de leucócitos, regulando a resposta inflamatória desregulada (Kurihara et al., 2006). Šahinović et al (2023) mostraram que baixos níveis de AEA e 2-AG são preditores de necessidade de ventilação mecânica invasiva, enquanto baixa concentração de AEA está associada ao tempo de internação hospitalar superior a 10 dias. Esses achados sobre a expressão/ativação do receptor CB₂ em leucócitos podem representar um novo mecanismo pelo qual a resposta imune durante a sepse é comprometida.

Figura 11 – Expressão do receptor CB₂ em células inflamatórias no BAL de camundongos submetidos à sepse induzida por pneumonia



Os camundongos foram inoculados (i.t.) com 3×10^8 UFC de *K. pneumoniae*. Seis e 12 h após receberam veículo ou o agonista CB₂ (AM1241) e 24 h após, foram sacrificados. Nas células do BAL coletado dos camundongos foi avaliada a expressão de CB₂ pela intensidade de fluorescência mediana (IFM) em neutrófilos (CD45+,

Gr1^{high}) (A) e macrófagos (CD45+, F4/80+) (D). (B) Porcentagem de neutrófilos (CD45+, Gr1^{high}) em relação aos leucócitos totais (CD45+, Gr1⁻, Gr1^{low}). (E) Porcentagem de macrófagos (CD45+, F4/80+) em relação aos leucócitos totais (CD45+, F4/80-). Contagens de células de neutrófilos (C) e macrófagos (F). Os resultados representam a média \pm desvio padrão e cada ponto representa um animal (n = 5). *p<0,05, análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Tukey.

5 CONCLUSÃO

Na sepse experimental, a expressão dos receptores CB₂ reduziu em macrófagos presentes no foco infeccioso. O tratamento dos animais sépticos com o agonista de receptores CB₂ AM1241 reduziu o dano hepático, atenuou a hipotermia, diminuiu a inflamação e lesão pulmonar, e a inflamação sistêmica. Além disso, a ativação de receptores CB₂ parece ter contribuído para a resolução da inflamação ao promover o aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. Finalmente, o tratamento foi capaz de aumentar a sobrevivência dos animais. Portanto, os receptores CB₂ são alvos potenciais para controlar o processo inflamatório desregulado que ocorre em quadros graves e agonistas destes receptores podem ser uma terapia adjuvante no tratamento da sepse.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, H. R. et al. Treatment with recombinant human tumor necrosis factor-alpha protects rats against the lethality, hypotension, and hypothermia of gram-negative sepsis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 1, p. 34–39, 1991.
- ALVES, G. F. et al. Pharmacological Inhibition of FAK-Pyk2 Pathway Protects Against Organ Damage and Prolongs the Survival of Septic Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. February, p. 1–14, 1 fev. 2022.
- ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe Sepsis and Septic Shock. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 9, p. 840–851, 29 ago. 2013.
- ARONS, M. M. et al. Effects of ibuprofen on the physiology and survival of hypothermic sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 27, n. 4, p. 699–707, abr. 1999.
- ASSREUY, J. Nitric Oxide and Cardiovascular Dysfunction in Sepsis. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 165–173, 1 jun. 2006.
- BAKKER, J.; NIJSTEN, M. W. N.; JANSEN, T. C. Clinical use of lactate monitoring in critically ill patients. **Annals of Intensive Care**, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2013.
- 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, 1 set. 2011.
- BECK, M. A. et al. Selenium deficiency increases the pathology of an influenza virus infection. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 8, p. 1481–1483, 27 jun. 2001.
- 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, p. 54–63, fev. 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. October, p. 105978, jan. 2020.
- CHEN, D. et al. Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 3, p. 312–316, 9 mar. 2017.
- CLEMMER, T. P. et al. Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. **Critical Care Medicine**, v. 20, n. 10, p. 1395–1401, out. 1992.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885–891, dez. 2002.
- CURTO-REYES, V. et al. Spinal and peripheral analgesic effects of the CB2 cannabinoid receptor agonist AM1241 in two models of bone cancer-induced pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 3, p. 561–573, 2010.
- DE BACKER, D. et al. Microvascular Blood Flow Is Altered in Patients with Sepsis.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v. 166, n. 1, p. 98–104, 1 jul. 2002.

DEVANE, W. A. et al. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946–1949, 18 dez. 1992.

ESPOSITO, S. et al. Sepsis and septic shock: New definitions, new diagnostic and therapeutic approaches. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, p. 204–212, set. 2017.

FONT, M. D.; THYAGARAJAN, B.; KHANNA, A. K. Sepsis and Septic Shock – Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making. **Medical Clinics of North America**, v. 104, n. 4, p. 573–585, jul. 2020.

GEROULANOS, S.; DOUKA, E. T. Historical perspective of the word “sepsis”. **Intensive Care Medicine**, v. 32, n. 12, p. 2077–2077, 27 nov. 2006.

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

HALL, S. et al. Selective CB2 Receptor Agonist, HU-308, Reduces Systemic Inflammation in Endotoxin Model of Pneumonia-Induced Acute Lung Injury. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, 2022.

HENKIN, C. S. et al. Sepse : uma visão atual Sepsis : current aspects. **Scientia Medica**, v. 19, n. July, p. 135–145, 2009.

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. In: **Cannabinoids**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. v. 168p. 53–79.

HOWLETT, A. C.; ABOOD, M. E. CB 1 and CB 2 Receptor Pharmacology. In: **Advances in Pharmacology**. 1. ed. Winston-Salem: Elsevier Inc., 2017. v. 80p. 169–206.

HUANG, M.; CAI, S.; SU, J. The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, p. 5376, 29 out. 2019.

JIANG, Q.; CHEN, Z.; JIANG, H. Flufenamic acid alleviates sepsis-induced lung injury by up-regulating CBR1. **Drug Development Research**, v. 81, n. 7, p. 885–892, 2020.

JOFFRE, J. et al. Endothelial Responses in Sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 202, n. 3, p. 361–370, 1 ago. 2020.

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, jan. 2014.

KINGSLEY, S. M. K.; BHAT, B. V. Differential Paradigms in Animal Models of Sepsis. **Current Infectious Disease Reports**, v. 18, n. 9, 2016.

KORNEEV, K. V. Mouse Models of Sepsis and Septic Shock. **Molecular Biology**, v. 53, n. 5, p. 704–717, 18 set. 2019.

KURIHARA, R. et al. Effects of peripheral cannabinoid receptor ligands on motility and polarization in neutrophil-like HL60 cells and human neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 18, p. 12908–12918, 2006.

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.; ZAMPRONIO, A.; LEHMANN, C. Cannabinoid Receptor 1 and 2 Signaling Pathways Involved in Sepsis. **Shock**, v. 56, n. 5, p. 673–681, nov. 2021.

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, p. 109556, maio 2020.

LOLIS, E.; BUCALA, R. Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 8, p. 635–645, ago. 2003.

LU, H. C.; MACKIE, K. Review of the Endocannabinoid System. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, v. 6, n. 6, p. 607–615, 2021.

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, nov. 2017.

MACHADO, F. R. et al. Sepsis in Brazilian emergency departments: a prospective multicenter observational study. **Internal and Emergency Medicine**, v. 18, n. 2, p. 409–421, 2 mar. 2023.

MACHADO, F.; SILVA, E. Coagulation and Sepsis. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 175–182, 1 jun. 2006.

MALFITANO, A. M. et al. What we know and do not know about the cannabinoid receptor 2 (CB2). **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 5, p. 369–379, 2014.

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, jun. 1995.

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

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.

POOL, R.; GOMEZ, H.; KELLUM, J. A. Mechanisms of Organ Dysfunction in Sepsis. **Critical care clinics**, v. 34, n. 1, p. 63–80, jan. 2018.

ROSA, M.; PESSOA, R.; ARAGÃO, A. Sepse, um problema de saúde pública: a atuação e colaboração da enfermagem na rápida identificação e tratamento da doença. **Revista eletrônica Evidência & Enfermagem**, v. 1, n. 1, p. 34–39, 3 jan. 2019.

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.

RUETTEN, H.; THIEMERMANN, C. Effect of calpain inhibitor I, an inhibitor of the proteolysis of I κ B, on the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, n. 4, p. 695–704, 13 jun. 1997.

ŠAHINOVIĆ, I. et al. Endocannabinoids, Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol, as Prognostic Markers of Sepsis Outcome and Complications. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 8, n. 5, p. 802–811, 1 out. 2023.

SAITO, H. et al. Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 124, n. 10–12, p. 1047–1058, 2003.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801, 23 fev. 2016.

SORDI, R. 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, abr. 2013.

SUGIURA, T. et al. 2-Arachidonoylglycerol: A Possible Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand in Brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 215, n. 1, p. 89–97, out. 1995.

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.

WALLEY, K. R. et al. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 11, p. 4733–4738, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Improving the prevention, diagnosis and clinical. Seventieth world health assembly. **Provisional agenda item 12.2**, v. A70/13, n. April, p. 1–6, 2017.

ZHANG, B. et al. Activation of CB2 receptor inhibits pyroptosis and subsequently ameliorates cecal ligation and puncture-induced sepsis. **International**

Immunopharmacology, v. 99, n. August, p. 108038, 2021.

ZHOU, J. et al. Electroacupuncture pretreatment protects septic rats from acute lung injury by relieving inflammation and regulating macrophage polarization. **Acupuncture in Medicine**, v. 00, n. 37, 2022.