



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

RAYAN FIDEL MARTINS MONTEIRO

EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO-SISTÊMICO DE β -
CARIOFILENO EM CAMUNDONGOS FÊMEA SAUDÁVEIS E EM
MODELO DE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA

BELÉM - PA

2021

RAYAN FIDEL MARTINS MONTEIRO

EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO-SISTÊMICO DE β -
CARIOFILENO EM CAMUNDONGOS FÊMEA SAUDÁVEIS E EM
MODELO DE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Gilmara de
Nazareth Tavares Bastos

Belém - PA

2021

RAYAN FIDEL MARTINS MONTEIRO

EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO-SISTÊMICO DE β -CARIOFILENO EM
CAMUNDONGOS FÊMEA SAUDÁVEIS E EM MODELO DE INFLAMAÇÃO
SISTÊMICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Neurociências e Biologia Celular da
Universidade Federal do Pará, como
requisito para obtenção de título de
Mestre em Neurociências e Biologia
Celular, aprovado com o conceito

Belém (PA), 30 de Julho de 2021.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos

Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina dos Reis Ferreira

Prof^a. Dr^a. Karen Renata Matos Oliveira

Prof. Dr. Anderson Bentes Lima

*Não tenhamos pressa,
mas não percamos tempo.*

José Saramago

AGRADECIMENTOS

Agradeço às instituições de fomento desse trabalho de pesquisa que perpassam pelos investimentos na Universidade Federal do Pará, no Instituto de Ciências Biológicas e no Programa de Pós Graduação em Neurociências e Biologia Celular. Agradeço também aos laboratórios parceiros desse projeto: Laboratório de Neuropatologia Experimental, sob o nome da professora Elizabeth Yamada, e também ao Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde, sob o nome da professora Tereza Ferreira.

Agradeço à minha família pelo apoio e acolhimento, do qual foi essencial à minha dedicação ao projeto. Dentro desse acolhimento familiar também se inclui meus amigos pessoais e em especial agradeço aos meus amigos de faculdade, dos quais compartilham dos mesmos desafios provenientes do “pós graduação”.

Além dessa base familiar, é essencial d’eu lembrar que existiu um outro acolhimento, mas este esteve presente durante a execução dessa dissertação. Por tanto agradeço imensamente ao Laboratório de Neuroinflamação (LNI) pelo excelente espaço de trabalho que me proporcionou todo apoio e troca de experiência científica para realização desse projeto, desse forma, eu agradeço em nome da professora Gilmara Bastos à todos do LNI dos quais eu tive o prazer de ajudar, dividir bancada, discutir e formar amizades.

RESUMO

Todas as funções do sistema endocanabinoide (SEC) ainda não são completamente lucidadas, entretanto esse sistema é conhecido por apresentar um efeito neuromodulador, atribuído essencialmente aos receptores canabinóide do tipo I (CB1R), dos quais a ativação sistêmica induz efeitos psicoativos. Diferentemente, o efeito imunomodulador do SEC, atribuído essencialmente sobre os receptores canabinóide do tipo II (CB2R), tem sido demonstrado como alternativa de tratamento de diversas doenças inflamatórias agudas ou crônicas, incluindo doenças neurodegenerativas em modelos animais via ativação crônica de CB2R. Entretanto, ainda não está claro os efeitos desse tratamento logo após sua administração. Neste sentido, procuramos investigar os efeitos do tratamento agudo-sistêmico do β -cariofileno (BCP), um fito-canabinóide agonista de CB2R em modelo murino de neuroinflamação induzidos por LPS. Realizamos o teste de Campo aberto (CA) 2 e 4 h após a indução de *sickness behavior* por Lipopolissacarídeo (LPS) e demonstramos que nos animais pré-tratados com BCP, na janela de 2 h, houve manutenção na qualidade de movimento nos animais que receberam LPS sem alteração na indução de *sickness behavior*, e aumento da atividade na região aversiva do aparato nos animais que não receberam LPS. Indicando efeito imuno e neuromodulador do BCP. Realizamos também o teste do Labirinto aquático de Morris (LAM) 24 h após a inoculação de LPS, entretanto não foi possível discriminar alterações no aprendizado, porém os animais inoculados e não tratados demonstraram ser mais propensos a formar memória espacial. Por fim, observamos que o pré-tratamento com BCP aumenta a peroxidação lipídica e concentração de nitrito no encéfalo 2 h após a inoculação de LPS, sugerindo assim, aumento imediato do estresse oxidativo pelo tratamento agudo com BCP em modelos de neuroinflamação. Portanto, é de fundamental importância a continuidade da pesquisa dos efeitos neurológicos e imunológicos imediatos ao tratamento com BCP em modelos de animais saudáveis e em modelos neuroinflamatórios para melhor determinação dos riscos atribuídos a esse tratamento, bem como, a adição do tratamento agudo em detrimento do crônico em diferentes patologias neurológicas.

Palavras Chave: Neuroinflamação; Lipopolissacarídeo; *Sickness Behavior*; Sistema Endocanabinóide; β -cariofileno.

ABSTRACT

All the functions of the endocannabinoid system (ECS) are not yet fully understood, however this system is known to have a neuromodulatory effect, essentially attributed to cannabinoid type I receptors (CB1R), which systemic activation induces psychoactive effects. In contrast, the immunomodulatory effect of ECS, attributed mainly to cannabinoid type II receptors (CB2R), has been demonstrated as an alternative treatment for several acute or chronic inflammatory diseases, including neurodegenerative diseases in animal models via chronic CB2R activation. However, the effects of this treatment are still unclear shortly after its administration. In this sense, we seek to investigate the effects of the acute-systemic treatment of β -caryophyllene (BCP), a phyto-cannabinoid agonist of CB2R in a murine model of neuroinflammation induced by LPS. We performed the open field test (OF) 2 and 4 h after the induction of sickness behavior by Lipopolysaccharide (LPS) and demonstrated that in animals pretreated with BCP, in the 2 h window, there was maintenance in the quality of movement in animals that received LPS without alteration in the induction of sickness behavior, and increased activity in the aversive region of the apparatus in animals that did not receive LPS. Indicating the immune and neuromodulatory effect of BCP. We also performed the Morris Water Labyrinth (MWM) test 24 h after inoculation of LPS, however it was not possible to discriminate changes in learning, however the inoculated and untreated animals proved to be more likely to form spatial memory. Finally, we observed that pretreatment with BCP increases lipid peroxidation and nitrite concentration in the brain 2 h after LPS inoculation, thus suggesting an immediate increase in oxidative stress by acute treatment with BCP in neuroinflammatory models. Therefore, it is of fundamental importance to continue researching the immediate neurological and immunological effects of BCP treatment in healthy animal models and in neuroinflammatory models for better determination of the risks attributed to this treatment, as well as the addition of acute treatment to the detriment of the treatment. chronic in different neurological pathologies.

Key words: Neuroinflammation ; Lipopolysaccharide; Sickness Behavior; Endocannabinoid System; β -caryophyllene.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. NEUROINFLAMAÇÃO	8
1.2. LPS COMO MODELO INDUTOR DE NEUROINFLAMAÇÃO VIA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA	9
1.3. SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E β -CARIOFILENO	10
2. OBJETIVO GERAL	12
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. ANIMAIS	13
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	13
3.3. DROGAS E TRATAMENTO	13
3.4. TESTES COMPORTAMENTAIS	14
3.4.1. Campo aberto (CA)	14
3.4.2. Labirinto aquático de Morris (LAM)	15
3.5. ANÁLISE BIOQUÍMICA	16
3.5.1. Mensuração da Peroxidação Lipídica	16
3.5.2. Atividade da Catalase	17
3.5.3. Quantificação de Nitrito	17
3.5.4. Mensuração de citocinas no encéfalo	17
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
4. RESULTADOS	19
4.1. A DOSE DE 50 mg/kg DE BCP APRESENTOU MELHOR RESPOSTA À INDUÇÃO DE <i>SICKNESS BEHAVIOR</i>	19
4.2. O TRATAMENTO AGUDO COM BCP INIBIU O DÉFICIT LOCOMOTOR INDUZIDO POR LPS	19
4.3. O TRATAMENTO COM BCP INDUZIU MAIOR ATIVIDADE EXPLORATÓRIA NA REGIÃO CENTRAL DO CA.	20
4.4. O COMPRIMENTO DO LAM IMPOSSIBILITOU A DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DO BCP	21
4.5. O TRATAMENTO AGUDO COM BCP AUMENTOU O ESTRESSE OXIDATIVO NO ENCÉFALO	22
4.6. A INOCULAÇÃO DE LPS E O TRATAMENTO COM BCP NÃO INDUZIRAM ALTERAÇÃO NO NÍVEIS DE CITOCINAS	23
5. DISCUSSÃO	24
5.1. O TRATAMENTO AGUDO COM BCP MANTEVE A QUALIDADE DO MOVIMENTO NO PICO DAS ALTERAÇÕES DE <i>SICKNESS BEHAVIOR</i>	24
5.2. TRATAMENTO AGUDO COM BCP INDUZIU AUMENTO DA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA EM REGIÃO AVERSIVA	24
5.3. O COMPRIMENTO DO LAM IMPOSSIBILITOU A DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DO BCP	26
5.4. O TRATAMENTO AGUDO COM BCP AUMENTOU O ESTRESSE OXIDATIVO NO ENCÉFALO.	27
6. CONCLUSÕES	28

1. INTRODUÇÃO

1.1. NEUROINFLAMAÇÃO

A neuroinflamação é um processo patológico encontrado em diversas doenças do Sistema Nervoso Central (SNC), sejam elas agudas ou crônicas. De forma geral ela se caracteriza por uma mudança no microambiente neural de tal maneira a desorganizar o parênquima cerebral e conseqüentemente provocar déficits cognitivos e motores (Shabab et al., 2017). Tal processo aparece como possível indutor de doenças neurais (Qin et al., 2007; Teeling and Perry, 2009), como possível agravante de doenças neurodegenerativas (Perry et al., 2007) e, também, como consequência de processos inflamatórios sistêmicos exacerbados, tais como sepse (Widmann and Heneka, 2014).

Esse microambiente neuroinflamatório se apresenta com elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α (fator de necrose tumoral α), IL-1 β (interleucina 1 β) e IL-6 (interleucina 6); elevados níveis de fatores de transcrição indutores de inflamação tais com NF κ B (nuclear factor- κ B), JNK (c-Jun N-terminal kinase) e p38 MAPKs (mitogen activated protein kinases); ativação de células gliais tais com astrócito e micróglia; e elevados níveis de processo neurodegenerativo (Shabab et al., 2017).

Dentro deste microambiente, se destaca o papel modulatório da micróglia. A micróglia é responsável por fazer o papel de vigilância e limpeza do SNC contra agentes estranhos, e por diversos outros papéis: como a modulação da plasticidade sináptica, sinaptogênese e neurogênese; suporte trófico; e recrutamento de quimiocinas e células imunes (Butovsky and Weiner, 2018). No processo neuroinflamatório, este tipo celular se apresenta como o principal envolvido na indução, na manutenção e no agravamento da neuroinflamação (Block et al., 2007; Prinz et al., 2019). Um único déficit primário em micróglia é capaz de gerar, em modelo murino, um comportamento semelhante ao de pacientes com transtorno do espectro autista (Zhan et al., 2014); Disfunções na resposta microglial estão relacionadas a manutenção de um fenótipo distrófico capaz de sustentar quadros de diversas doenças neurodegenerativas (Krasemann et al., 2017); bem como processos inflamatórios sistêmicos podem agravar quadros de doenças neurodegenerativas através da resposta de micróglia distróficas à esses processos (Perry & Holmes, 2014).

Em suma, a neuroinflamação se apresenta como um quadro patológico comum à diversas doenças neurais, onde se destaca, principalmente, as doenças neurodegenerativas que assolam, na sua maioria, pessoas idosas, dos quais serão mais de 20% da população mundial em 2050, segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde).

1.2. LPS COMO MODELO INDUTOR DE NEUROINFLAMAÇÃO VIA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina encontrada na parede celular de bactérias gram-negativas (Mayer et al., 1985). Esses micro-organismos são os principais agentes etiológicos causadores de septicemia, provocando processos inflamatórios agudos que podem culminar em disfunções do SNC, tais como déficits de aprendizado e memória (Angus & van der Poll, 2013; Widmann & Heneka, 2014).

Por outro lado, o LPS é incapaz de, sozinho, provocar déficit neuronal, a presença de LPS em cultura de neurônio não causa morte celular, entretanto, em cultura mista de células gliais e neurônios é observado morte de neurônio, (Bronstein et al., 1995), ou seja, a resposta proveniente da exposição ao LPS é inteiramente causada pela resposta de defesa do organismo.

Essa molécula é altamente conservada ao longo da evolução, sendo a mesma essencial à sobrevivência desses micro-organismos. Dessa forma, a presença da mesma e altas quantidades no hospedeiro é indicativo de processo infeccioso, sendo a mesma considerada um PAMP (Padrões Moleculares Associados a Patógenos), ou seja, plantas e mamíferos são capazes de reconhecer rapidamente o aumento da concentração dessa molécula no organismo e poder responder rapidamente para combater o processo infeccioso. O reconhecimento de PAMPs é realizado pelos PRRs (Receptores Reconhecedores de Padrões), dentre esses receptores se encontram os TLRs (Receptores semelhantes a Toll). Os TLRs se encontram em diversas células do sistema imunológico, células gliais e células epiteliais. A partir do contato com os PAMPs esses receptores desencadeiam alterações celulares mediadas principalmente pela ativação de fatores de transcrição tais com NF κ B, JNK e p38 MAPKs. A ativação desses fatores culmina essencialmente na liberação de prostaglandinas via atividade da ciclo oxigenase 2 (COX2), óxido nítrico (NO) via óxido nítrico sintase induzida (iNOS), e citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Jin et al., 2010; Widmann & Heneka, 2014).

A promoção desse processo inflamatório gera dor, dano tecidual, recrutamento de monócitos e aumento de citocinas pró-inflamatórias locais e séricas. Esse conjunto de mudanças é identificado pelo SNC via nervo vago, e por meio das células epiteliais dos vasos que irrigam o encéfalo (Tracey, 2002). Em contra partida o SNC também responde promovendo um conjunto de alterações comportamentais e metabólicas de defesa, tais como baixa no apetite, diminuição de atividades físicas e sociais, fadiga, alteração de termorregulação e energia. Esse conjunto de alterações comportamentais já é bem descrito e classicamente conhecido como “*Sickness Behavior*” (Hart, 1988).

Portanto é bem claro a comunicação do sistema imunológico com SNC, de forma que o SNC é capaz reconhecer sinais do sistema imunológico e responder de diversas formas. Bem como, é notável que nos últimos anos tem se relacionado aumento de citocinas pró-inflamatórias séricas, episódios infecciosos, doenças inflamatórias crônicas, tais como AIDS, obesidade, diabetes e doenças autoimunes à doenças neurológicas, tal como ansiedade, depressão, e doenças neurodegenerativas (Block et al., 2007; Dantzer et al., 2008; Teeling & Perry, 2009; Heneka et al., 2015; Felger, 2018).

Diante disso, o LPS tem sido bastante usado no estudo da fisiopatologia de diversas doenças neurais, bem como, para a pesquisa por tratamento das mesmas (Batista et al., 2019).

1.3. SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E β -CARIOFILENO

As funções do sistema endocanabinoide (SEC) ainda não são completamente lucidadas, entretanto esse sistema apresenta um efeito neuromodulador, atribuído essencialmente aos receptores canabinóide do tipo I (CB1R), dos quais a ativação sistêmica induz efeitos psicoativos (Castillo et al., 2012). Diferentemente, o efeito imunomodulador do SEC, atribuído essencialmente sobre os receptores canabinóide do tipo II (CB2R), tem sido demonstrado como alternativa de tratamento de diversas doenças inflamatórias agudas ou crônicas, incluindo doenças neurodegenerativas em modelos animais (Pini et al., 2012; Kelly et al., 2020). Os CB2R são encontrados principalmente em células imunes de mamífero provenientes tanto do clone linfoide quanto do clone mieloide, bem como, em células epiteliais dos vasos sanguíneos, exercendo efeito inibitório à ativação e/ou à migração dessas células por meio, principalmente, da ativação da proteína quinase A (Borner et al., 2009; Basu & Dittel, 2011; Persidsky et al., 2015). O SEC também se faz presente em células gliais de mamíferos, exercendo efeito inibitório da ativação dessas células principalmente por meio da ativação de CB2R (Ehrhart et al., 2005; Stella, 2010; Merighi et al., 2012a; Merighi et al., 2012b).

Nesse sentido, nos últimos anos o uso crônico de agonistas de CB2R em modelos murinos de doenças neuroinflamatórias e/ou inflamatórias sistêmicas, tais como obesidade (Wu et al., 2020), doença de Parkinson (Price et al., 2009; Concannon et al., 2015), Septicemia (Tschop et al., 2009), acidente vascular cerebral (Ronca et al., 2015), e doença de Alzheimer (Wu et al., 2013), tem se mostrador promissor como alternativa aos tratamentos clássicos com drogas anti-inflamatórias, e alternativa também ao tratamento com agonistas de CB1R, dos quais provocam efeitos psicoativos.

Entretanto, a presença de CB2R em neurônios tem instigado, nos últimos anos, a investigação dos possíveis efeito neuromoduladores desses receptores (Chen et al., 2017). Consequentemente, se busca entender os possíveis efeitos comportamentais do uso de agonistas de CB2R tanto para entender possíveis efeitos colaterais, quanto para o possível uso desse tratamento não só para doenças inflamatórias, mas também para doenças relacionadas ao estado emocional, tais como ansiedade e depressão. Camundongos nocaute para CB2R apresentam aumento da agressividade e consequente diminuição da interação social, enquanto que o tratamento com agonista em camundongos selvagens tende a diminuir a agressividade (Rodriguez-Arias et al., 2015). Ademais, camundongos nocaute para CB2R apresentam déficits em testes de memória contextual, entretanto esse efeito está relacionado à presença de CB2R em micróglia (Garcia-Gutierrez et al., 2013; Li & Kim, 2016a; 2017). Portanto, apesar do tratamento com agonista de CB2R se apresentar como promissor a diversas doenças inflamatórias, ainda não está claro as consequências da ativação sistêmica desses receptores sobre o comportamento.

Neste sentido, procuramos investigar os efeitos do β -cariofileno (BCP), um fito-canabinóide encontrado em alta concentração no óleo de copaíba (*Copaifera* spp) (Veiga Junior et al., 2007) e em diversas outras plantas, tais como na goiaba vermelha (*Psidium cattleianum*) e amarela (*Psidium cattleianum* var. *Lucidium*), orégano (*Origanum vulgare*), e pimenta negra (*Piper nigrum*) (Mockute et al., 2001; Orav et al., 2004; Biegelmeier et al., 2011). Atualmente o BCP é aprovado pela USFDA (*United States Food and Drug Administration*) para o uso direto em alimentos para consumo humano (n° 21CFR172.515). Gertsch et al. (2008) demonstraram que a molécula de BCP é um agonista de CB2R, bem como, demonstraram que o BCP é capaz de reduzir os níveis de TNF- α e IL-1 β liberados por células sanguíneas humanas *in vitro*, assim como, é capaz de atenuar a formação de edema em camundongos.

Dessa mesma forma, nos últimos anos, vários trabalhos vêm demonstrando o efeito anti-inflamatório (Klauke et al., 2014) analgésico (Fiorenzani et al., 2014), antimicrobiano e antioxidante (Dahham et al., 2015) *in vitro* e *in vivo* em resposta a doenças agudas, tal como a septicemia, ou crônicas do BCP em mamíferos (Meza & Lehmann, 2018).

Assim, o BCP se mostra como um potencial terapêutico para diversas doenças inflamatórias, crônicas ou agudas, incluindo doenças neurodegenerativas. Entretanto, ainda não é claro os efeitos do tratamento agudo da mesma, sendo de grande relevância a investigação dos possíveis efeitos neuro e imunomoduladores do BCP em animais saudáveis e em processo neuroinflamatório.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento agudo-sistêmico de BCP em animais saudáveis e em modelo de inflamação sistêmica induzida por LPS.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sendo a avaliação desses efeitos sobre:

- As alterações comportamentais de *Sickness behavior*
- O comportamento exploratório em CA.
- O aprendizado e a memória espacial de longo prazo
- O estresse oxidativo no encéfalo.
- Os níveis de citocinas pro-inflamatórias no encéfalo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados 77 camundongos (*Mus musculus*) (CEUA-UFGA n°: 5819011118) da linhagem *Swiss* fêmeas com 8-9 semanas de idade, que foram obtidos do biotério do Instituto de Evandro Chagas (IEC). A escolha do sexo dos animais foi determinada pelo interesse em diminuir o estresse proveniente de possíveis “brigas”, que poderiam influenciar comportamentos, comuns em gaiolas de camundongos macho. Os animais foram mantidos em gaiolas com sistema de microisolamento (ALESCO AL21), onde água e ração foram disponibilizados *ad libitum*. Os animais foram separados em três experimentos (Figura 1):

Experimento A:

- i. Salina/Veículo (n = 5);
- ii. LPS/Veículo (n = 7);
- iii. Salina/BCP (n = 4);
- iv. LPS/BCP (25 mg/kg) (n = 4);
- v. LPS/BCP (50 mg/kg) (n = 7);
- vi. LPS/BCP (75 mg/kg) (n = 4).

Experimento B:

- i. Salina/Veículo (n = 6);
- ii. LPS/Veículo (n = 6);
- iii. Salina/BCP (n = 6);
- iv. LPS/BCP (n = 6).

Experimento C:

- i. Salina/Veículo (n = 5);
- ii. LPS/Veículo (n = 5);
- iii. Salina/BCP (n = 5);
- iv. LPS/BCP (n = 6).

3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para os experimentos A e B todos os grupos foram submetidos primeiramente ao teste do Campo Aberto uma semana após a habituação (1º dia), no dia seguinte (2º dia) tiveram a ração retirada da gaiola 1 h antes até 1 h depois do tratamento com BCP ou veículo (Óleo de oliva) por via oral, 30 min após o tratamento os animais receberam inoculação de LPS ou veículo (solução salina) i.p. Por fim, 2 ou 4 h após a inoculação todos os animais foram submetidos novamente ao teste de Campo aberto (CA). Sendo a eutanásia dos animais do experimento A e B no 7º dia e no 3º dia respectivamente. Para o experimento C aplicamos, 1 semana após a chegada dos animais ao biotério, o mesmos tempos de inoculação e tratamento dos experimentos A e B, sendo a eutanásia realizada 2 h após a inoculação de LPS (Figura 1).

3.3. DROGAS E TRATAMENTO

Os camundongos foram inoculados por via intraperitoneal (i.p.) com uma única dose (1 mg/kg) de LPS (*Escherichia coli* O111:B4, Sigma-Aldrich/L2630) diluído

em NaCl 0,9% ou inoculados com o mesmo volume de NaCl 0,9% (Salina). Bem como, foram tratados com Óleo de Oliva (Veículo) ou BCP (Sigma-Aldrich/W225207) por via oral nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg 30 min antes da administração de LPS (Figura 1).

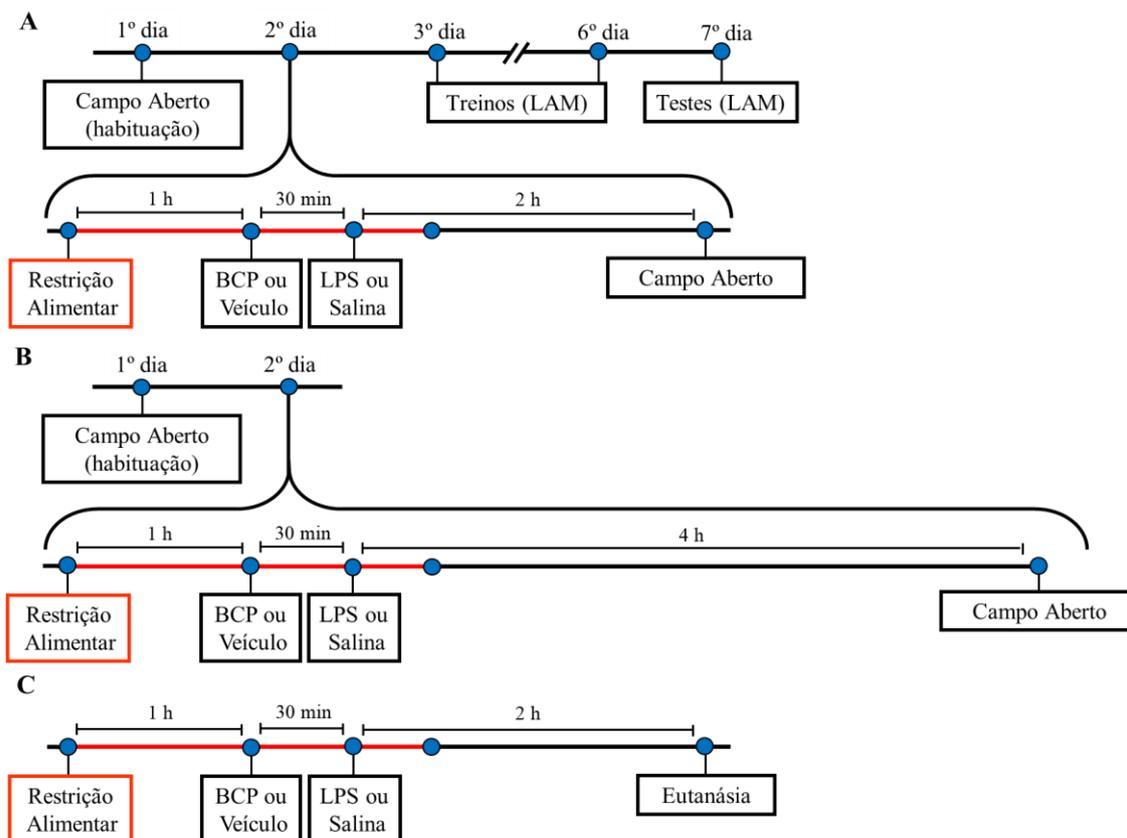


Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental: A linha horizontal vermelha representa o período de restrição alimentar.

3.4. TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1. Campo aberto (CA)

O teste do CA foi realizado para a avaliação da atividade exploratória. O mesmo foi realizado 24 h antes (habituação) e 2 ou 4 h após a inoculação de LPS (Figura 1). O aparato do campo aberto consiste em um ambiente circular de acrílico medindo 30 cm de diâmetro e 30 cm de altura, com a parede na cor cinza e fundo preto (Figura 2). Para realização do teste, cada animal foi gentilmente colocado no aparato e o teste teve a duração de 5 minutos para cada animal. Após cada sessão de teste o aparato foi limpo com álcool 10% para remover possíveis pistas olfatórias. Todos os testes foram filmados e as gravações foram posteriormente analisadas com o auxílio do programa *ANY-maze Video Tracking System (Stoeling Co®)* para processamento e análise de parâmetros comportamentais intrínsecos ao teste comportamental, sendo a velocidade média calculada pela distância percorrida dividida pelo tempo móvel (s) dos animais.

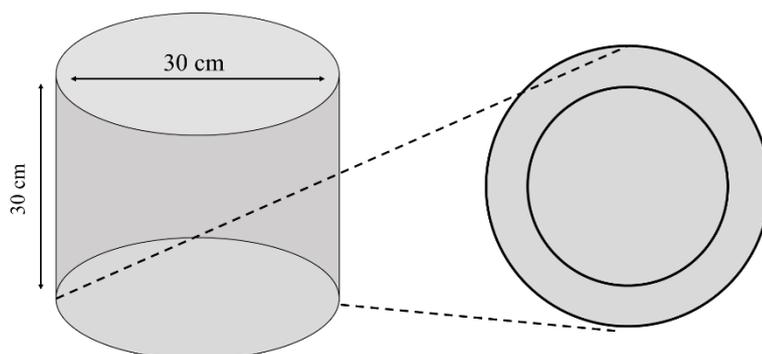


Figura 2. Representação gráfica do aparato do campo aberto: Destacada as dimensões do aparato (à esquerda), e a representação da região periférica e central (à direita).

3.4.2. Labirinto aquático de Morris

O teste do Labirinto aquático de Morris (LAM) foi realizado 24 horas após a inoculação com LPS. O aparato consiste em uma piscina circular com 80 cm de diâmetro, 33 cm de profundidade, onde em um dos quadrantes, há uma plataforma quadrada (64 cm^2) de escape a 0,5 cm abaixo da superfície da água e invisível ao animal. Pistas distais (desenhos geométricos) foram colocadas nas paredes da sala onde o teste foi realizado (Figura 3).

Realizamos quatro dias consecutivos de Treino com quatro treinos por dia e um último dia de teste (Figura 1A). Em cada treino, cada animal foi gentilmente colocado na água com a cabeça direcionada para a parede da piscina, e lhe foi permitido nadar livremente durante 60 segundos até que encontre a plataforma de escape, localizada no centro de um dos quadrantes da piscina (Figura 3), nos casos em que o animal não encontrou a plataforma o mesmo foi gentilmente guiado até a mesma, lá permanecendo por 5 segundos, nos casos em que o animal encontrou a plataforma o mesmo foi retirado da piscina 5 segundos após o encontro. Entre os intervalos de cada treino o animal foi mantido 30 segundos fora da piscina antes de ser reinserido na mesma. A posição em que o animal foi colocado na piscina variou de maneira semi-aleatória durante os dias de Treino, mas a plataforma permaneceu fixa em um dos quadrantes da piscina.

No último dia, a plataforma foi retirada da piscina, sendo que nesse dia o animal permaneceu na água somente 60 segundos, a fim de avaliar a memória de retenção. Todos os testes foram filmados e as gravações foram posteriormente analisadas com o auxílio do programa *ANY-maze Video Tracking System* (Stoeling Co©) para processamento e análise de parâmetros comportamentais intrínsecos ao teste comportamental.

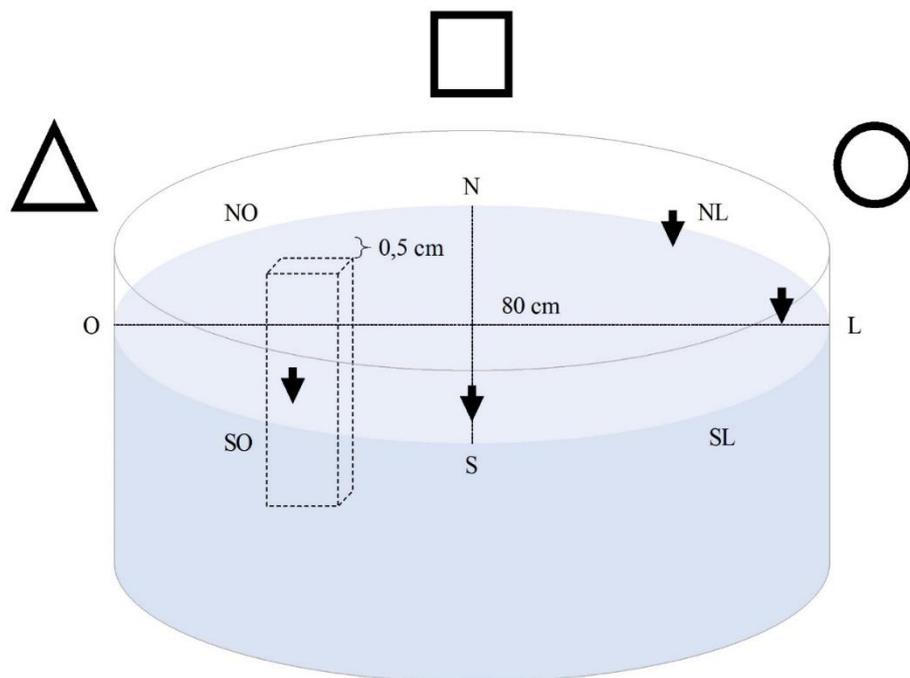


Figura 3. Representação gráfica do aparato do Labirinto aquático de Morris: As setas pretas indicam as posições de entrada, das quais são equidistantes à plataforma (SO, S, L e NL). Os desenhos geométricos dispostos em torno da piscina representam as pistas distas.

3.5. ANÁLISE BIOQUÍMICA

Para as análises bioquímicas fizemos a eutanásia de 21 animais 2 h após a inoculação de LPS (Figura 1: C). A eutanásia dos animais foi realizada com a inoculação de dose letal de xilazina e cetamina, em seguida o encéfalo foi dissecado e imediatamente armazenado a menos - 80°C até o dia da diluição. As amostras foram posteriormente pesadas e diluídas em solução salina na mesma proporção do peso do encéfalo para as análises bioquímicas.

Para a determinação da concentração de proteínas das amostras pelo método de Bradford as mesmas foram novamente diluídas na mesma proporção de volume do homogeneizado e utilizado como padrão de referência soluções de albumina sérica bovina fração V (Sigma) com leitura de absorbância a 595 nm.

3.5.1. Mensuração da Peroxidação Lipídica

Para se determinar a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), os produtos resultantes da peroxidação lipídica, foi utilizado o método de Winterbourn et al (1985) modificados para análise em espectrofotometria. O método baseia-se na alteração da coloração da amostra quando a mesma é colocada para reagir com o ácido tiobarbitúrico a 1 % na temperatura de 90 a 100 °C e em meio ácido. Em microtubolos de 2 ml foram colocados 25 µl de BHT (solução etanólica a 2 %), 250 µL de HCl 25%, 250 µL de solução de ácido tiobarbitúrico (1%) dissolvido em solução

aquosa de NaOH a 0,05N e 250 μ L de amostra. Foi-se feito um branco com todas as soluções colocando-se, no lugar da amostra, solução salina 0,9%. Posteriormente, os tubos contendo a mistura foram incubados em banho fervente (100 °C) durante 10 minutos e resfriados em banho de gelo. Em seguida, adicionado 750 μ L de butanol em cada tubo e agitado em vórtex até a transferência total da coloração rósea da camada inferior para a superior. A mistura foi então centrifugada por 5 minutos a 12000 rpm. Em seguida 200 μ l do sobrenadante foi distribuído em duplicata em uma placa de 96 poços. Por fim a absorvância foi aferida ao comprimento de onda de 532 nm. A amplificação da peroxidação durante o ensaio foi prevenida pela adição de um antioxidante (butil-hidroxi-tolueno- BHT). A concentração de TBARs foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do malondialdeído (MDA) ($\epsilon = 1,56 \times 10^{-5} \cdot M^{-1} \cdot mL^{-1}$) (Winterbourn et al., 1985).

Concentração de MDA: (Absorbância/1,56)/concentração de proteína

3.5.2. Atividade da Catalase

A atividade da enzima Catalase foi determinada pela quantificação da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio em 240 nm de leitura de absorvância durante 8 min, pela enzima presente na amostra. Utilizou-se a solução de peróxido de hidrogênio 10 mM em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,4). Para isso, foi adicionado 150 μ l desta solução na cubeta, com acréscimo de 30 μ L da amostra, 120 μ l de água destilada e 2,7 ml de peróxido de hidrogênio.

Atividade da Catalase: (Absorbância/0,071)/concentração de proteína

3.5.3. Quantificação de Nitrito

Para determinar a quantificação de nitrito (Griess Reagent System) nós utilizamos uma placa de 96 poços, acrescentamos 50 μ l de amostra (duplicata), mais 50 μ l Solução de Sulfanilamida (Dinâmica), incubada por 5-10 min em temperatura ambiente, protegida da luz, acrescentamos então mais 50 μ l de Solução de NED (Dinâmica), incubada em temperatura ambiente por 5-10 min, protegida da luz. Finalmente, mensuramos a absorvância (550 nm) dentro de 30 min. Os resultados foram compilados em uma posterior curva padrão de nitrito (Neon) para determinar a concentração (μ M) nas amostras, corrigidas pela concentração de proteína por método de Bradford (mg).

3.5.4. Mensuração de citocinas no encéfalo

A mensuração de citocinas pro-inflamatórias no encéfalo foi realizada por método de ELISA em 450 nm de leitura de absorvância seguindo as orientações do kit de análise, sendo o kit Cloud-Clone Corp SEA079Ra para a mensuração da citocina IL-6, e

o kit Cloud-Clone Corp SEA133Ra para a mensuração da citocina TNF- α , corrigidas pela concentração de proteína por método de Bradford (mg).

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise de variância (ANOVA) com um critério seguida de pós-teste de Tukey para análise da curva de dose de BCP (Figura 4) e para análise do número de entradas na área da plataforma (Figura 7C). ANOVA com dois critérios seguidas de pós-teste de Tukey para as demais análises, considerando o grau de significância de 95% ($p < 0,05$). Todos os dados foram expressos como média e desvio padrão da média (DPM) ou erro padrão da média (EPM).

4. RESULTADOS

4.1. A DOSE DE 50 mg/kg DE BCP APRESENTOU MELHOR RESPOSTA À INDUÇÃO DE *SICKNESS BEHAVIOR*

Avaliamos o desempenho das doses de 25, 50 e 75 mg/kg de BCP sobre as alterações comportamentais de *sickness behavior* induzidas por LPS. A dose de 50 mg/kg de BCP foi capaz de induzir maior distância percorrida, menor tempo de imobilidade e maior velocidade média em relação as outras doses testadas, apesar de não haver diferença estatística entre as doses (Figura 4) diante a indução de *sickness Behavior* 2 h após a inoculação de LPS. Portanto, as análises posteriores dos efeitos do BCP foram investigadas sobre esta dose.

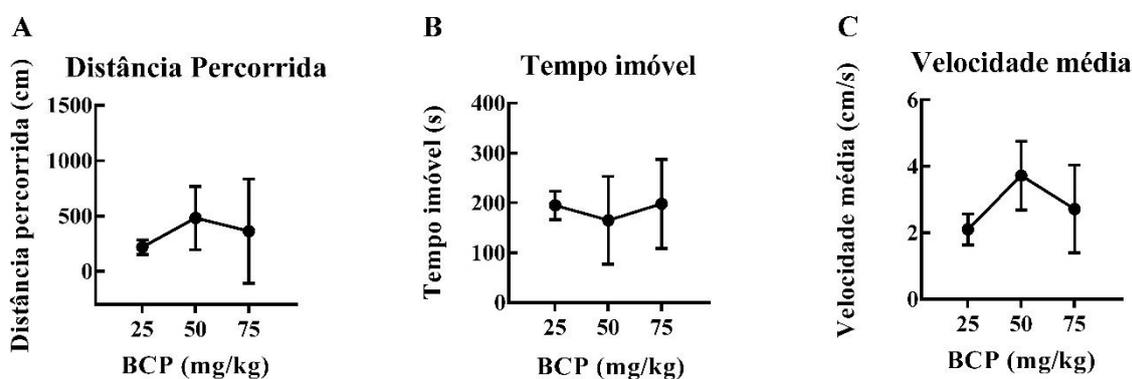


Figura 4. Curva dose resposta de BCP: As doses de 25, 50 e 75 mg/kg de BCP foram avaliadas por perspectiva de comportamento exploratório em CA após 2 h da inoculação de 1 mg/kg de LPS (Figura 1A), sendo os dados expostos como média ± D.P.M.

4.2. O TRATAMENTO AGUDO COM BCP INIBIU O DÉFICIT LOCOMOTOR INDUZIDO POR LPS

A indução de *sickness behavior* induzido por LPS é refletida em CA pela baixa da atividade exploratória. Igualmente nós demonstramos esse efeito 2 e 4 h após sua inoculação, sendo esse efeito mais significativo às 2 h e se refletindo pela baixa distância percorrida, alta imobilidade e diminuição da velocidade média em CA obtida pelos animais inoculados e não tratados com BCP em relação ao grupo controle (Figura 5).

Entretanto, apesar do tratamento com 50 mg/kg de BCP ter mantido o efeito de baixa mobilidade nos animais, ele pôde manter a velocidade média a níveis basais no pico de alterações comportamentais induzidos por LPS (2 h) (Figura 5E). Porém 4 h após a inoculação esse mesmo efeito não foi observado, indicando que o tratamento agudo com BCP melhorou a qualidade da atividade motora no pico das alterações de *sickness behavior* até pelo menos 150 min após o tratamento.

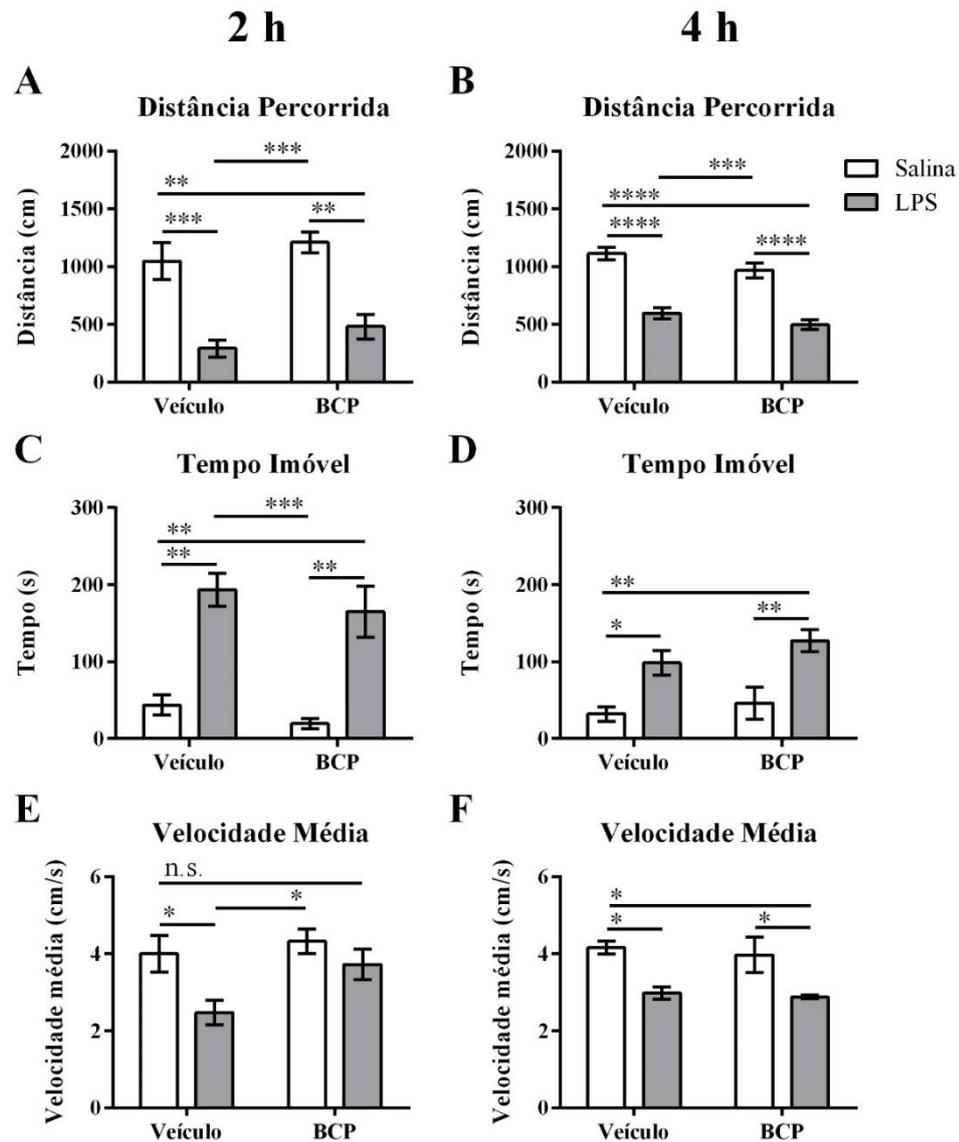


Figura 5. Atividade exploratória em CA 2 e 4 h após a inoculação: Todos os dados são apresentados como média \pm E.P.M.. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; n.s. não significativo.

4.3. O TRATAMENTO COM BCP INDUZIU MAIOR ATIVIDADE EXPLORATÓRIA NA REGIÃO CENTRAL DO CA.

Apesar do tratamento com BCP (50 mg/kg) não ter alterado o tempo de exploração na região central do aparato 150 e 270 min após o tratamento (Figura 6A), a atividade exploratória na região central foi significativamente maior 150 min, porém não em 270 min (Figura 6B). Sugerindo assim, uma alteração comportamental dependente do tempo pós tratamento. Portanto, o tratamento com BCP induziu uma maior atividade na região central de CA. Por outro lado, nos animais inoculados com LPS, o tratamento com BCP não induziu as mesmas alterações na região central do CA (Figura 6D; E).

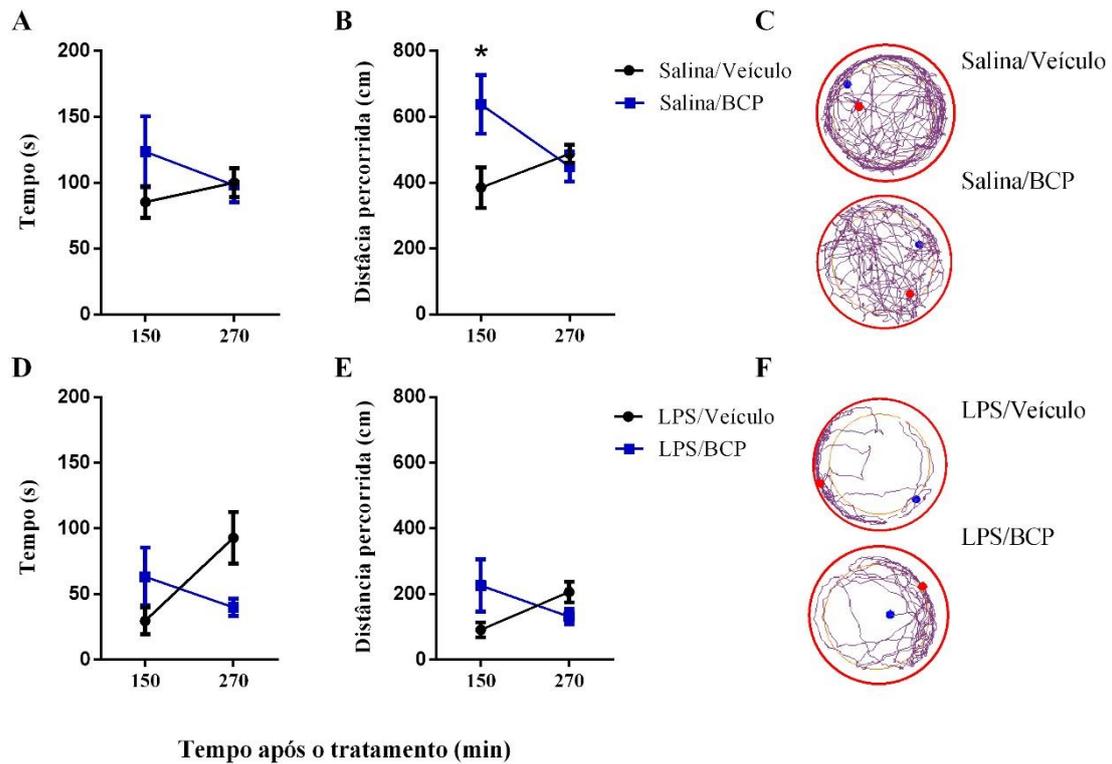


Figura 6. Atividade exploratória na região central do CA 150 e 270 min após tratamento com BCP ou Veículo: (A, D) Tempo de exploração na região central; (B, E) Distância percorrida na região central; (C, F) Representação gráfica da trajetória em CA em 150 min, os pontos azuis representam o local onde os animais se encontravam no início do registro da trajetória, enquanto que os pontos vermelhos representam onde os animais se encontravam no final do registro. Todos os dados são apresentados como média \pm E.P.M.. * $p < 0,05$ entre os grupos em 150 min.

4.4. O COMPRIMENTO DO LAM IMPOSSIBILITOU A DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DO BCP

A análise da latência dos dias de treino não revelou diferença entre os grupos, bem como, o grupo controle não apresentou robusta curva de aprendizado, dada pela não significância entre os dias de treino (Figura 7A). Da mesma forma, no dia de teste a análise de exploração dos primeiros 30 s de teste o grupo controle não apresentou preferência à Zona Alvo (ZA) em relação a média das Outras Zonas (ZO) (Figura 7B), demonstrando não formação de memória espacial da plataforma. Ademais, o grupo LPS/Veículo demonstrou significativo maior número de entradas no espaço do qual a plataforma estava nos dias de treino em relação ao grupo controle (Figura 7C) mesmo sem preferência significativa por ZA (Figura 7B).

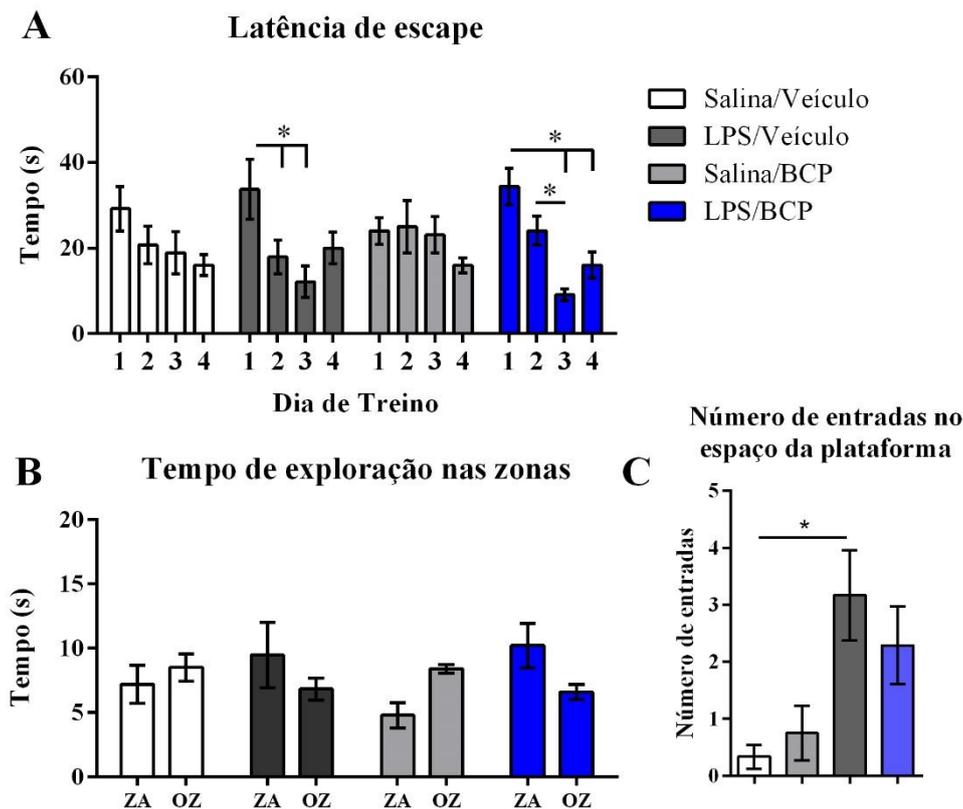


Figura 7. Curva de aprendizagem e memória de retenção em LAM: ZA (Zona alvo) correspondente à zona na qual havia a plataforma, OZ (Outras zona) correspondente à média das outras 3 zonas de análise. Todos os dados são apresentados como média \pm E.P.M.. * $p < 0,05$.

4.5. O TRATAMENTO AGUDO COM BCP AUMENTOU O ESTRESSE OXIDATIVO NO ENCÉFALO.

O pré-tratamento agudo com BCP (50 mg/kg) aumentou a peroxidação lipídica 2 h após a inoculação de LPS (Figura 8B). Ademais, apesar da média do grupo LPS/BCP ser superior as demais médias na mensuração da atividade da Catalase, a mesma não é significativamente diferente das demais (Figura 8A).

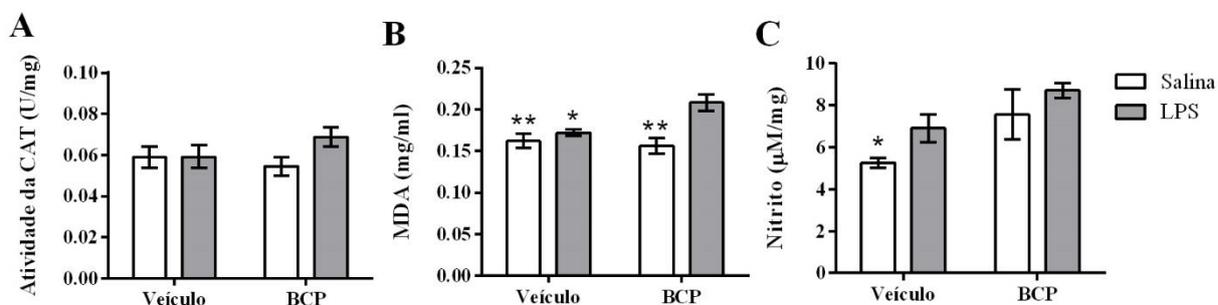


Figura 8. Atividade oxidativa no encéfalo 2h após a inoculação de LPS: (A) Atividade da enzima Catalase. (B) Concentração de MDA determinada por TBARS. (C) Concentração de Nitrito. Todos os dados são apresentados como média \pm E.P.M.. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo LPS/BCP.

4.6. A INOCULAÇÃO DE LPS E O TRATAMENTO COM BCP NÃO INDUZIRAM ALTERAÇÃO NO NÍVEIS DE CITOCINAS

A análise da mensuração das citocinas IL-6 e TNF- α no encéfalo não revelou alterações das respectivas concentrações entre os grupos analisados 2 h após a inoculação de LPS (Figura 9). Isso sugere que nem a inoculação de LPS conseguiu induzir expressão das respectivas citocinas e nem mesmo o pré-tratamento agudo-sistêmico de BCP demonstrou alterar essas concentrações no encéfalo.

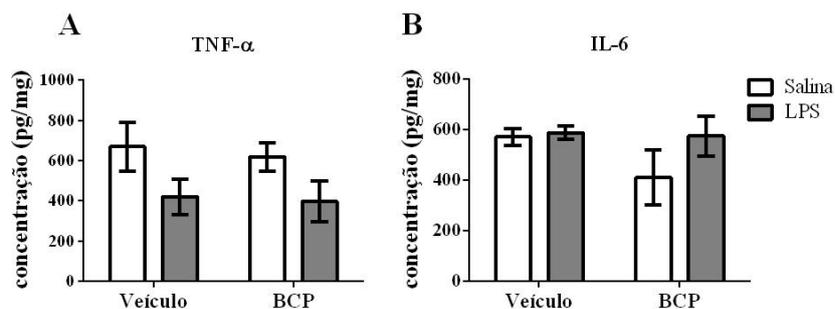


Figura 9. Concentração de citocinas pro-inflamatórias no encéfalo 2h após a inoculação de LPS: (A) Concentração de TNF- α . (B) Concentração de IL-6. Todos os dados são apresentados como média \pm E.P.M..

5. DISCUSSÃO

5.1. O TRATAMENTO AGUDO COM BCP MANTEVE A QUALIDADE DO MOVIMENTO NO PICO DAS ALTERAÇÕES DE *SICKNESS BEHAVIOR*

O LPS induz alterações comportamentais de *sickness bahavior* que perduram por 24 h, sendo o pico de alterações comportamentais 2 h após a inoculação. Esse pico está relacionado diretamente aos níveis de citocinas pro-inflamatórias no soro e no SNC (Dantzer, 2004). Mais recentemente foi demonstrado que essas alterações comportamentais induzidas por LPS estão diretamente relacionadas à ativação de receptores de IL-1 β expressos em neurônios do hipocampo (Li et al., 2017).

Diante disso, o tratamento com BCP manteve as alterações induzidas por LPS de diminuição da atividade locomotora em CA 2 e 4 h após a inoculação (figura 4), porém os animais tratados com BCP mantiveram a velocidade de locomoção somente no pico das alterações de *sickness behavior* (Figura 5E). Isso demonstra que o tratamento com BCP pôde manter a qualidade do movimento por pelo menos 150 min após o tratamento e ao mesmo tempo manter as alterações de *sickness behavior*. Essas alterações comportamentais induzidas por processo infeccioso/inflamatório em mamíferos são essenciais a sobrevivência e recuperação do hospedeiro, bem como, estão relacionadas à diminuição da transmissão do patógeno (Hart, 1988; Dantzer, 2004). Por outro lado, sugerimos a recuperação da velocidade locomotora a um efeito analgésico e periférico exercido pelo tratamento. Klauke et al (2014) demonstraram que o tratamento com BCP exerce um efeito analgésico dependente da ativação do CB2R, e esse efeito foi relacionado a uma atenuação do processo inflamatório. Ademais, o efeito anti-inflamatório do tratamento com 50 mg/kg de BCP também é presente em animais nocaute para CB2R (Gertsch et al., 2008), sugerindo assim outras vias de atuação dessa droga.

Portanto, nossos resultados sugerem o tratamento agudo com BCP como droga analgésica e anti-inflamatória, exercendo esse efeito até pelo menos 150 min após o tratamento e que, além disso, não apresenta promover alteração no comportamento de *sickness behavior*.

5.2. TRATAMENTO AGUDO COM BCP INDUZIU AUMENTO DA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA EM REGIÃO AVERSIVA

O tratamento agudo com BCP induziu maior atividade no centro do aparato de CA 150, mas não em 270 min após o tratamento (Figura 6). Esse mesmo efeito exercido pelo BCP já foi observado recentemente 15 min após o tratamento e atribuído a um efeito ansiolítico da droga, sendo este efeito revertido pelo uso de antagonistas de CB2R (Bahi et al., 2014). De fato, comumente esse aumento ou diminuição da atividade no centro do aparato de CA é reportado com ansiolítico ou ansiogênico, respectivamente. Similarmente, García-Gutiérrez et al (2012) demonstraram que o tratamento agudo com agonista sintético de CB2R tem efeito ansiolítico, enquanto que o tratamento agudo com o antagonista de CB2R tem efeito ansiogênico, curiosamente, o tratamento crônico tem

efeito inverso, sendo o agonista induzindo um efeito ansiogênico e o antagonista induzindo um efeito ansiolítico, sendo os efeitos do tratamento crônico atribuídos a mudança de expressão de receptores GABA no córtex e na Amígdala (Garcia-Gutierrez et al., 2012). Por outro lado, Li & Kim (2016) reportaram que uso de camundongos nocaute para CB2R e o uso de tratamento agudo de antagonista não possuem nenhum efeito sobre o comportamento de exploração a regiões aversivas em testes padrão de comportamento semelhante ao ansioso, entretanto o uso de camundongos nocaute para receptores canabinóides é questionável pois o SEC está presente no desenvolvimento do SNC (Harkany et al., 2007; Li & Kim, 2016a). Ademais, é discutível se os mais recorrentes testes de modelo murino para a análise do comportamento semelhante ao ansioso, tais com CA, labirinto em cruz elevado, caixa claro-escuro e labirinto em zero, de fato avaliam com precisão tal comportamento, pois outros comportamentos podem alterar o tempo e a atividade exploratória em regiões aversivas nesses testes (Ennaceur & Chazot, 2016). Sendo assim, preferimos reportar esse resultado como aumento de atividade na região aversiva de CA.

Além disso, recentemente foi demonstrado que a super-expressão de CB2R de neurônios glutamatérgicos do hipocampo também induziu aumento da atividade no centro do aparato de CA sem alterar o comportamento no labirinto em zero, e a maioria das alterações nos teste relacionados à memória de trabalho e de longo prazo foram associados à presença ou não de CB2R em micróglia (Li & Kim, 2017). Isso sugere que aumento da atividade no centro do aparato de CA pode não estar necessariamente associada a um efeito ansiolítico, bem como, as alterações comportamentais provenientes da ação do SEC, não necessariamente estão envolvidas com a presença ou não dos receptores canabinóides em neurônios.

Por outro lado, esse comportamento pode estar relacionado à via mesolímbica de recompensa. A ativação crônica de CB2R no hipocampo aumenta a transmissão sináptica excitatória (Kim & Li, 2015), complementarmente, camundongos nocaute para CB2R tem enfraquecimento de transmissão sináptica excitatória no hipocampo (Li & Kim, 2016b). Bem como, o fortalecimento da sinapse hipocampo-*nucleus accumbens* aumenta o comportamento direcionado a objetivos similarmente como o uso de antidepressivos está associado ao fortalecimento dessa via, e diferentemente como o estresse crônico está associado ao enfraquecimento da mesma (LeGates et al., 2018). O *nucleus accumbens* tem papel importante na via mesolímbica sobre a regulação dos níveis de dopamina, está associado a regulação da atividade motora e também à alterações comportamentais provenientes do uso drogas de abuso, entretanto, sua função não é totalmente lucidada, porém a entrada hipocampo-*nucleus accumbens* apresenta papel importante na regulação da atividade dessa área (Perez & Lodge, 2018; Scudder et al., 2018). Portanto, a ativação de CB2R em neurônios glutamatérgicos do hipocampo pode alterar e/ou ajudar a explicar o comportamento de aumento da atividade em regiões aversivas via *nucleus accumbens*.

Ademais, o SEC também está envolvido na regulação da via mesolímbica pela presença de CB2R em neurônios dopaminérgicos da área tegmentar ventral (Zhang et al., 2014). Concomitantemente, o tratamento crônico com agonista de CB2R inibe a

auto administração de cocaína e a alta atividade induzida pela cocaína em modelo murino, sendo esses efeitos não observados em camundongos nocaute de CB2R (Xi et al., 2011).

Por tanto, a via mesolímbica de recompensa tem papel importante na alterações comportamentais no uso de drogas de abuso e na atividade motora, porém sua função ainda não foi totalmente lucidada, similarmente o SEC demonstra ter papel regulador nessa via, mas também apresenta papel importante na formação de memória e, possivelmente, no comportamento semelhante ao ansioso. Entretanto mais estudos são necessários para lucidar a função do SEC no SNC sobre o que diz respeito a sua presença em neurônios, mas também sobre sua presença células glia e como essa interação altera o comportamento. Ademais é importante investigar as alterações comportamentais do tratamento agudo, bem como, as consequências do tratamento crônico de agonistas de CB2R.

5.3. O COMPRIMENTO DO LAM PODE TER IMPOSSIBILITADO A DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DO BCP

A análise dos dias de treino do LAM não revelou formação de curva de aprendizagem no grupo controle, portanto, não foi possível discriminar possíveis déficits de aprendizagem nos grupos LPS ou BCP (50 mg/kg) (Figura 7A). Ademais, a análise do dia de teste não revelou preferência dos grupos controle pela ZA, impossibilitando, também, discriminação de possíveis déficits de memória entre os grupos (Figura 7B). Acreditamos que o comprimento do aparato não possibilitou a discriminação dos grupos, sendo o mesmo impróprio para análise de aprendizado e memória de camundongos suíços fêmea adultos. O comprimento do LAM se apresenta fundamental para a análise discriminatória dos grupos (Vorhees & Williams, 2006). Noh et al (2014) apresentaram resultado semelhante utilizando camundongos ICR machos e 1 m de diâmetro de aparato, porém utilizando 10 cm de diâmetro de plataforma, ademais os animais inoculados com LPS também demonstraram maior tempo de permanência na zona do qual estava a plataforma em relação ao controle, apesar de não significativo (Noh, Jeon, & Seo, 2014). Esse último estudo e nossos resultados com os grupos do Experimento A sustentam a qualidade de nossos resultados no LAM.

Mais interessante, os animais dos quais foram inoculados com LPS demonstraram maior número de entradas no espaço da plataforma em relação aos grupos que não receberam LPS, sendo essa diferença significativa entre os grupos que não foram tratados com BCP (Figura 7C). Acreditamos que esse comportamento se deve a um aumento da dificuldade do teste para os animais que receberam LPS. Isso pode ser observado pelo aumento do tempo de latência no primeiro dia de treino nesses animais (Figura 7A). Essa maior dificuldade, dada por um possível déficit cognitivo ou motor nesses animais 24 h após a inoculação, poderia ter induzido maior prioridade para formação da memória espacial da área da plataforma. Entretanto, temos poucos dados para sustentar essa hipótese.

5.4. O TRATAMENTO AGUDO COM BCP AUMENTOU O ESTRESSE OXIDATIVO NO ENCÉFALO

O tratamento crônico com agonistas de CB2R demonstra a capacidade de reduzir o estresse oxidativo presente em modelos animais de doenças neurodegenerativas (Gomez-Galvez et al., 2016). Da mesma forma, o tratamento crônico com BCP também demonstra esse efeito pela diminuição da peroxidação lipídica e de nitrito, e aumento da atividade da CAT, da superóxido dismutase, e da glutathione (Javed et al., 2016; Ojha et al., 2016; Hashiesh et al., 2020).

Diferentemente, nós observamos que o tratamento agudo com BCP aumentou significativamente a peroxidação lipídica e a concentração de nitrito nos animais que receberam LPS, bem como, também é observado um aumento da atividade da CAT nesses mesmos animais, mesmo que não significativo (Figura 8). Similarmente aos nossos resultados, Merigui, et al (2012) demonstraram que a exposição a um agonista de CB2R em células micróglia expostas ao LPS exacerba a produção de nitrito 30 min depois da exposição, entretanto o mesmo não é verdade 4 h após a exposição, ademais esses efeitos não ocorrem na presença de antagonista de CB2R.

Portanto, apesar do tratamento crônico com BCP demonstrar ser muito efetivo na diminuição do estresse oxidativo, o tratamento agudo, por outro lado parece demonstrar aumento do estresse oxidativo principalmente em micro-ambientes neuroinflamatórios. Acreditamos que esse efeito pode ocorrer pelo aumento da bio-disponibilidade de endocanabinóides logo após o tratamento agudo. O principal endocanabinóide responsável pela ativação de CB2R é o 2-araquidonilglicerol (2-AG). A síntese de 2-AG no encéfalo é dada pela atividade da diacilglicerol lipase β (DAGL- β), essa enzima converte o diacilglicerol em 2-AG, por outro lado a monoacilglicerol lipase (MAGL) converte 2-AG em glicerol e ácido araquidônico (AA), do qual, este último é o principal produto para a produção de prostaglandinas via COX2. Portanto, a ativação de CB2R por BCP ampliaria a bio-disponibilidade de 2-AG, o que por sua vez exacerbaria a atividade da COX2, da qual é induzida por LPS no encéfalo. Similarmente, a inativação da DAGL- β (Wilkerson et al., 2016), e da MAGL (Nomura et al., 2011), tem demonstrado amplo efeito anti-inflamatório em modelos murinos de neuroinflamação via diminuição da biodisponibilidade de AA e consequente supressão do efeito da COX2. Entretanto, ainda possuímos poucos dados para confirma essa hipótese.

Apesar de toda peroxidação lipídica induzida, o desafio com LPS não demonstrou a indução de citocinas pro- inflamatórias. Já é bem caracterizado, o LPS como indutor citocinas pro-inflamatória que apresentam, essencialmente, papel comunicativo (Dantzer, 2004). A janela de atuação das citocinas pro-inflamatórias é igualmente bem descrita e fundamental para a pesquisa da progressão de doenças inflamatórias (Norden, Trojanowski, Villanueva, Navarro, & Godbout, 2016; Skelly, Hennessy, Dansereau, & Cunningham, 2013). Por tanto, a não indução do aumento de concentração de TNF- α e IL-6 após inoculação de LPS (Figura 9) nos nossos resultados nos sugere a repetição dos ensaios para a determinação das concentrações dessas citocinas após o pre-tratamento agudo-sistêmico com BCP.

6. CONCLUSÕES

1. O tratamento agudo-sistêmico com BCP recuperou a qualidade do movimento em modelo de inflamação sistêmica, sendo esse efeito observado duas horas, mas não quatro horas após a inoculação de LPS.
2. O tratamento agudo-sistêmico com BCP induziu maior atividade na região aversiva do CA, sendo esse efeito observado até pelo menos 150 minutos após o tratamento.
3. Os animais que receberam LPS apresentaram preferência pela região periférica de CA e o tratamento com BCP não alterou esse comportamento.
4. Em nossos resultados uso do LAM com 80 cm de diâmetro de aparato, demonstrou não ser eficaz para demonstrar formação de aprendizado e memória espacial em camundongos fêmea adultos da linhagem Suíço.
5. Os animais tratados com LPS demonstraram uma preferência pela área da qual estava a plataforma no dia de teste do LAM.
6. O tratamento com BCP não alterou o comportamento de aprendizado e memória espacial no aparato do LAM.
7. O tratamento com BCP aumentou o estresse oxidativo no encéfalo em modelo de neuroinflamação 2 horas após inoculação de LPS.
8. Em nossos resultados a inoculação de LPS e o tratamento com BCP não induziu alteração nos níveis de citocinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angus, D.C., and van der Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369(21), 2063. doi: 10.1056/NEJMc1312359.
- Bahi, A., Al Mansouri, S., Al Memari, E., Al Ameri, M., Nurulain, S.M., and Ojha, S. (2014). beta-Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. *Physiol Behav* 135, 119-124. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.06.003.
- Basu, S., and Dittel, B.N. (2011). Unraveling the complexities of cannabinoid receptor 2 (CB2) immune regulation in health and disease. *Immunol Res* 51(1), 26-38. doi: 10.1007/s12026-011-8210-5.
- Batista, C.R.A., Gomes, G.F., Candelario-Jalil, E., Fiebich, B.L., and de Oliveira, A.C.P. (2019). Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 20(9). doi: 10.3390/ijms20092293.
- Biegelmeier, R., Andrade, J.M., Aboy, A.L., Apel, M.A., Dresch, R.R., Marin, R., et al. (2011). Comparative analysis of the chemical composition and antioxidant activity of red (*Psidium cattleianum*) and yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) strawberry guava fruit. *J Food Sci* 76(7), C991-996. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02319.x.
- Block, M.L., Zecca, L., and Hong, J.S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8(1), 57-69. doi: 10.1038/nrn2038.
- Borner, C., Smida, M., Holtt, V., Schraven, B., and Kraus, J. (2009). Cannabinoid receptor type 1- and 2-mediated increase in cyclic AMP inhibits T cell receptor-triggered signaling. *J Biol Chem* 284(51), 35450-35460. doi: 10.1074/jbc.M109.006338.
- Bronstein, D.M., Perez-Otano, I., Sun, V., Mullis Sawin, S.B., Chan, J., Wu, G.C., et al. (1995). Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. *Brain Res* 704(1), 112-116. doi: 10.1016/0006-8993(95)01189-7.
- Butovsky, O., and Weiner, H.L. (2018). Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 19(10), 622-635. doi: 10.1038/s41583-018-0057-5.
- Castillo, P.E., Younts, T.J., Chavez, A.E., and Hashimoto, Y. (2012). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron* 76(1), 70-81. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.020.
- Chen, D.J., Gao, M., Gao, F.F., Su, Q.X., and Wu, J. (2017). Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation. *Acta Pharmacol Sin* 38(3), 312-316. doi: 10.1038/aps.2016.149.
- Concannon, R.M., Okine, B.N., Finn, D.P., and Dowd, E. (2015). Differential upregulation of the cannabinoid CB(2) receptor in neurotoxic and inflammation-driven rat models of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 269, 133-141. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.04.007.
- Dahham, S.S., Tabana, Y.M., Iqbal, M.A., Ahamed, M.B., Ezzat, M.O., Majid, A.S., et al. (2015). The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene beta-Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules* 20(7), 11808-11829. doi: 10.3390/molecules200711808.
- Dantzer, R. (2004). Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur J Pharmacol*, 500(1-3), 399-411. doi:10.1016/j.ejphar.2004.07.040
- Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., and Kelley, K.W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9(1), 46-56. doi: 10.1038/nrn2297.
- Ehrhart, J., Obregon, D., Mori, T., Hou, H., Sun, N., Bai, Y., et al. (2005). Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J Neuroinflammation* 2, 29. doi: 10.1186/1742-2094-2-29.

- Ennaceur, A., and Chazot, P.L. (2016). Preclinical animal anxiety research - flaws and prejudices. *Pharmacol Res Perspect* 4(2), e00223. doi: 10.1002/prp2.223.
- Felger, J.C. (2018). Imaging the Role of Inflammation in Mood and Anxiety-related Disorders. *Curr Neuropharmacol* 16(5), 533-558. doi: 10.2174/1570159X15666171123201142.
- Fiorenzani, P., Lamponi, S., Magnani, A., Ceccarelli, I., & Aloisi, A. M. (2014). In vitro and in vivo characterization of the new analgesic combination Beta-caryophyllene and docosahexaenoic Acid. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 596312. doi:10.1155/2014/596312.
- Garcia-Gutierrez, M.S., Garcia-Bueno, B., Zoppi, S., Leza, J.C., and Manzanares, J. (2012). Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABA(A) receptors. *Br J Pharmacol* 165(4), 951-964. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01625.x.
- Garcia-Gutierrez, M.S., Ortega-Alvaro, A., Busquets-Garcia, A., Perez-Ortiz, J.M., Caltana, L., Ricatti, M.J., et al. (2013). Synaptic plasticity alterations associated with memory impairment induced by deletion of CB2 cannabinoid receptors. *Neuropharmacology* 73, 388-396. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.05.034.
- Gomez-Galvez, Y., Palomo-Garo, C., Fernandez-Ruiz, J., and Garcia, C. (2016). Potential of the cannabinoid CB(2) receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 64, 200-208. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.03.017.
- Harkany, T., Guzman, M., Galve-Roperh, I., Berghuis, P., Devi, L.A., and Mackie, K. (2007). The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci* 28(2), 83-92. doi: 10.1016/j.tips.2006.12.004.
- Hart, B.L. (1988). Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* 12(2), 123-137. doi: 10.1016/s0149-7634(88)80004-6.
- Hashiesh, H.M., Meeran, M.F.N., Sharma, C., Sadek, B., Kaabi, J.A., and Ojha, S.K. (2020). Therapeutic Potential of beta-Caryophyllene: A Dietary Cannabinoid in Diabetes and Associated Complications. *Nutrients* 12(10). doi: 10.3390/nu12102963.
- Heneka, M.T., Carson, M.J., El Khoury, J., Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., et al. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 14(4), 388-405. doi: 10.1016/S1474-4422(15)70016-5.
- Javed, H., Azimullah, S., Haque, M.E., and Ojha, S.K. (2016). Cannabinoid Type 2 (CB2) Receptors Activation Protects against Oxidative Stress and Neuroinflammation Associated Dopaminergic Neurodegeneration in Rotenone Model of Parkinson's Disease. *Front Neurosci* 10, 321. doi: 10.3389/fnins.2016.00321.
- Jin, M., Suh, S.J., Yang, J.H., Lu, Y., Kim, S.J., Kwon, S., et al. (2010). Anti-inflammatory activity of bark of *Dioscorea batatas* DECNE through the inhibition of iNOS and COX-2 expressions in RAW264.7 cells via NF-kappaB and ERK1/2 inactivation. *Food Chem Toxicol* 48(11), 3073-3079. doi: 10.1016/j.fct.2010.07.048.
- Kelly, R., Joers, V., Tansey, M.G., McKernan, D.P., and Dowd, E. (2020). Microglial Phenotypes and Their Relationship to the Cannabinoid System: Therapeutic Implications for Parkinson's Disease. *Molecules* 25(3). doi: 10.3390/molecules25030453.
- Kim, J., and Li, Y. (2015). Chronic activation of CB2 cannabinoid receptors in the hippocampus increases excitatory synaptic transmission. *J Physiol* 593(4), 871-886. doi: 10.1113/jphysiol.2014.286633.
- Klauke, A.L., Racz, I., Pradier, B., Markert, A., Zimmer, A.M., Gertsch, J., et al. (2014). The cannabinoid CB(2) receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. *Eur Neuropsychopharmacol* 24(4), 608-620. doi: 10.1016/j.euroneuro.2013.10.008.
- Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., Baufeld, C., Calcagno, N., El Fatimy, R., et al. (2017). The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in

- Neurodegenerative Diseases. *Immunity* 47(3), 566-581 e569. doi: 10.1016/j.immuni.2017.08.008.
- LeGates, T.A., Kvarta, M.D., Tooley, J.R., Francis, T.C., Lobo, M.K., Creed, M.C., et al. (2018). Reward behaviour is regulated by the strength of hippocampus-nucleus accumbens synapses. *Nature* 564(7735), 258-262. doi: 10.1038/s41586-018-0740-8.
- Li, M., Li, C., Yu, H., Cai, X., Shen, X., Sun, X., et al. (2017). Lentivirus-mediated interleukin-1beta (IL-1beta) knock-down in the hippocampus alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced memory deficits and anxiety- and depression-like behaviors in mice. *J Neuroinflammation* 14(1), 190. doi: 10.1186/s12974-017-0964-9.
- Li, Y., and Kim, J. (2016a). CB2 Cannabinoid Receptor Knockout in Mice Impairs Contextual Long-Term Memory and Enhances Spatial Working Memory. *Neural Plast* 2016, 9817089. doi: 10.1155/2016/9817089.
- Li, Y., and Kim, J. (2016b). Deletion of CB2 cannabinoid receptors reduces synaptic transmission and long-term potentiation in the mouse hippocampus. *Hippocampus* 26(3), 275-281. doi: 10.1002/hipo.22558.
- Li, Y., and Kim, J. (2017). Distinct roles of neuronal and microglial CB2 cannabinoid receptors in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 363, 11-25. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.08.053.
- Mayer, H., Tharanathan, R., and Weckesser, J. (1985). "6 Analysis of Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria," in *Methods in microbiology*. Elsevier), 157-207.
- Merighi, S., Gessi, S., Varani, K., Fazzi, D., Mirandola, P., and Borea, P.A. (2012a). Cannabinoid CB(2) receptor attenuates morphine-induced inflammatory responses in activated microglial cells. *Br J Pharmacol* 166(8), 2371-2385. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01948.x.
- Merighi, S., Gessi, S., Varani, K., Simioni, C., Fazzi, D., Mirandola, P., et al. (2012b). Cannabinoid CB(2) receptors modulate ERK-1/2 kinase signalling and NO release in microglial cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 165(6), 1773-1788. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01673.x.
- Meza, A., and Lehmann, C. (2018). Betacaryophyllene - A phytocannabinoid as potential therapeutic modality for human sepsis? *Med Hypotheses* 110, 68-70. doi: 10.1016/j.mehy.2017.10.025.
- Mockute, D., Bernotiene, G., and Judzentiene, A. (2001). The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in vilnius district (Lithuania). *Phytochemistry* 57(1), 65-69. doi: 10.1016/s0031-9422(00)00474-x.
- Noh, H., Jeon, J., & Seo, H. (2014). Systemic injection of LPS induces region-specific neuroinflammation and mitochondrial dysfunction in normal mouse brain. *Neurochem Int*, 69, 35-40. doi:10.1016/j.neuint.2014.02.008
- Norden, D. M., Trojanowski, P. J., Villanueva, E., Navarro, E., & Godbout, J. P. (2016). Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*, 64(2), 300-316. doi:10.1002/glia.22930
- Nomura, D.K., Morrison, B.E., Blankman, J.L., Long, J.Z., Kinsey, S.G., Marcondes, M.C., et al. (2011). Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation. *Science* 334(6057), 809-813. doi: 10.1126/science.1209200.
- Ojha, S., Javed, H., Azimullah, S., and Haque, M.E. (2016). beta-Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. *Mol Cell Biochem* 418(1-2), 59-70. doi: 10.1007/s11010-016-2733-y.
- Orav, A., Stulova, I., Kailas, T., and Muurisepp, M. (2004). Effect of storage on the essential oil composition of *Piper nigrum* L. fruits of different ripening states. *J Agric Food Chem* 52(9), 2582-2586. doi: 10.1021/jf030635s.

- Perez, S.M., and Lodge, D.J. (2018). Convergent Inputs from the Hippocampus and Thalamus to the Nucleus Accumbens Regulate Dopamine Neuron Activity. *J Neurosci* 38(50), 10607-10618. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2629-16.2018.
- Perry, V.H., Cunningham, C., and Holmes, C. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol* 7(2), 161-167. doi: 10.1038/nri2015.
- Perry, V.H., and Holmes, C. (2014). Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 10(4), 217-224. doi: 10.1038/nrneurol.2014.38.
- Persidsky, Y., Fan, S., Dykstra, H., Reichenbach, N.L., Rom, S., and Ramirez, S.H. (2015). Activation of Cannabinoid Type Two Receptors (CB2) Diminish Inflammatory Responses in Macrophages and Brain Endothelium. *J Neuroimmune Pharmacol* 10(2), 302-308. doi: 10.1007/s11481-015-9591-3.
- Pini, A., Mannaioni, G., Pellegrini-Giampietro, D., Passani, M.B., Mastroianni, R., Bani, D., et al. (2012). The role of cannabinoids in inflammatory modulation of allergic respiratory disorders, inflammatory pain and ischemic stroke. *Curr Drug Targets* 13(7), 984-993. doi: 10.2174/138945012800675786.
- Price, D.A., Martinez, A.A., Seillier, A., Koek, W., Acosta, Y., Fernandez, E., et al. (2009). WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 29(11), 2177-2186. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06764.x.
- Prinz, M., Jung, S., and Priller, J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell* 179(2), 292-311. doi: 10.1016/j.cell.2019.08.053.
- Qin, L., Wu, X., Block, M.L., Liu, Y., Breese, G.R., Hong, J.S., et al. (2007). Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55(5), 453-462. doi: 10.1002/glia.20467.
- Rodriguez-Arias, M., Navarrete, F., Blanco-Gandia, M.C., Arenas, M.C., Aguilar, M.A., Bartoll-Andres, A., et al. (2015). Role of CB2 receptors in social and aggressive behavior in male mice. *Psychopharmacology (Berl)* 232(16), 3019-3031. doi: 10.1007/s00213-015-3939-5.
- Ronca, R.D., Myers, A.M., Ganea, D., Tuma, R.F., Walker, E.A., and Ward, S.J. (2015). A selective cannabinoid CB2 agonist attenuates damage and improves memory retention following stroke in mice. *Life Sci* 138, 72-77. doi: 10.1016/j.lfs.2015.05.005.
- Scudder, S.L., Baimel, C., Macdonald, E.E., and Carter, A.G. (2018). Hippocampal-Evoked Feedforward Inhibition in the Nucleus Accumbens. *J Neurosci* 38(42), 9091-9104. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1971-18.2018.
- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S.Z., Kadir, H.A., and Mohan, G. (2017). Neuroinflammation pathways: a general review. *Int J Neurosci* 127(7), 624-633. doi: 10.1080/00207454.2016.1212854.
- Stella, N. (2010). Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia* 58(9), 1017-1030. doi: 10.1002/glia.20983.
- Skelly, D. T., Hennessy, E., Dansereau, M. A., & Cunningham, C. (2013). A systematic analysis of the peripheral and CNS effects of systemic LPS, IL-1beta, [corrected] TNF-alpha and IL-6 challenges in C57BL/6 mice. *PLoS One*, 8(7), e69123. doi:10.1371/journal.pone.0069123.
- Teeling, J.L., and Perry, V.H. (2009). Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: underlying mechanisms. *Neuroscience* 158(3), 1062-1073. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.07.031.
- Tracey, K.J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature* 420(6917), 853-859. doi: 10.1038/nature01321.
- Tschop, J., Kasten, K.R., Nogueiras, R., Goetzman, H.S., Cave, C.M., England, L.G., et al. (2009). The cannabinoid receptor 2 is critical for the host response to sepsis. *J Immunol* 183(1), 499-505. doi: 10.4049/jimmunol.0900203.
- Veiga Junior, V.F., Rosas, E.C., Carvalho, M.V., Henriques, M.G., and Pinto, A.C. (2007). Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber

- ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne--a comparative study. *J Ethnopharmacol* 112(2), 248-254. doi: 10.1016/j.jep.2007.03.005.
- Vorhees, C.V., and Williams, M.T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1(2), 848-858. doi: 10.1038/nprot.2006.116.
- Widmann, C.N., and Heneka, M.T. (2014). Long-term cerebral consequences of sepsis. *Lancet Neurol* 13(6), 630-636. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70017-1.
- Wilkerson, J.L., Ghosh, S., Bagdas, D., Mason, B.L., Crowe, M.S., Hsu, K.L., et al. (2016). Diacylglycerol lipase beta inhibition reverses nociceptive behaviour in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 173(10), 1678-1692. doi: 10.1111/bph.13469.
- Winterbourn, C.C., Gutteridge, J.M., and Halliwell, B. (1985). Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. *J Free Radic Biol Med* 1(1), 43-49. doi: 10.1016/0748-5514(85)90028-5.
- Wu, J., Bie, B., Yang, H., Xu, J.J., Brown, D.L., and Naguib, M. (2013). Activation of the CB₂ receptor system reverses amyloid-induced memory deficiency. *Neurobiol Aging* 34(3), 791-804. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.011.
- Wu, Q., Ma, Y., Liu, Y., Wang, N., Zhao, X., and Wen, D. (2020). CB₂R agonist JWH-133 attenuates chronic inflammation by restraining M1 macrophage polarization via Nrf2/HO-1 pathway in diet-induced obese mice. *Life Sci* 260, 118424. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118424.
- Xi, Z.X., Peng, X.Q., Li, X., Song, R., Zhang, H.Y., Liu, Q.R., et al. (2011). Brain cannabinoid CB₂ receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat Neurosci* 14(9), 1160-1166. doi: 10.1038/nn.2874.
- Zhan, Y., Paolicelli, R.C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., et al. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci* 17(3), 400-406. doi: 10.1038/nn.3641.
- Zhang, H.Y., Gao, M., Liu, Q.R., Bi, G.H., Li, X., Yang, H.J., et al. (2014). Cannabinoid CB₂ receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(46), E5007-5015. doi: 10.1073/pnas.1413210111.