

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**EFEITO DE AGONISTAS DO RECEPTOR CANABINOIDE 2 NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR *Mycobacterium bovis* BCG**

MAGAIVER ANDRADE SILVA

Rio de Janeiro
Julho de 2016

S586 Silva, Magaiver Andrade

Efeito de agonistas do receptor canabinoide 2 na resposta inflamatória induzida por *Mycobacterium bovis* BCG / Magaiver Andrade Silva. – Rio de Janeiro, 2016.

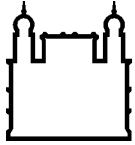
xx, 98 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 77-91

1. Receptor CB2. 2. Migração celular. 3. Beta-cariofileno. 4. GP1a. 5. Inflamação. Título.

CDD 616.9294



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Magaiver Andrade Silva

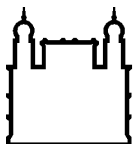
**Efeito de agonistas do receptor canabinoide 2 na resposta inflamatória
induzida por *Mycobacterium bovis* BCG**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Dra. Maria das Graças Muller de O. Henriques

RIO DE JANEIRO

Julho de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: *Magaiver Andrade Silva*

EFEITO DE AGONISTAS DO RECEPTOR CANABINOIDE 2 NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR *Mycobacterium bovis* BCG

ORIENTADORA: Dra. Maria das Graças Muller de O. Henriques

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Adriana Ribeiro Silva - Presidente (FIOCRUZ/IOC)

Prof. Dr. Rodrigo Tinoco Figueiredo (UFRJ)

Prof. Dr. João Alfredo de Moraes Gomes Silva (UFRJ)

Prof. Dr. Mônica Freiman de Souza Ramos – Revisor e suplente (UFRJ)

Prof. Dr. Vera Carolina Bordallo Bittencourt – Suplente (UNIRIO)

Rio de Janeiro, 21 de Julho de 2016

**Dedico este trabalho à mulher mais importante da minha vida, minha mãe
Luiza Andrade, que sempre foi a minha fonte de luz e inspiração.**

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Dra. Maria das Graças Henriques e Dra. Elaine Cruz Rosas pela oportunidade que me deram em realizar esse sonho. E ainda, por toda dedicação, atenção, orientação, apoio e por tudo que aprendi durante esses anos. Vocês foram fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui, ajudando tanto para meu crescimento profissional quanto pessoal. Sou profundamente grato a vocês.

À minha grande amiga, Msc. Luana Barbosa Correa, por todas as nossas conversas e por me ajudar em vários experimentos durante esses quatro anos.

À Dr. André Candea, por me ensinar o modelo de pleurisia e a quimiotaxia.

Ao Dr. Leonardo Noboru Seito por me ensinar e me auxiliar com todo carinho e dedicação à técnica de *western blotting*.

À toda a equipe do Laboratório de Farmacologia Aplicada, Msc. Tatiana Pádua, Msc. Perla Villani, Msc. Thadeu Costa, Érika Cunha, Msc. Catarina Bastos Trigo de Negreiros e o Dr. Fausto Ferraris, por todas as nossas conversas e pelo auxílio na bancada.

À Dra. Fátima Vergara e Dra. Maria Fernanda Costa Silva pelas discussões sobre o trabalho e por me auxiliarem nos experimentos *in vitro*.

À Dra. Carmen Penido e Dra. Mariana Souza pelo carinho e pelas contribuições enriquecedoras feitas a esta tese e ao artigo.

Ao Dr. Raghavendra Nulgulmnalli Manjunathiah pelo ensaio *in silico*.

À Dra. Helene Santos Barbosa por permitir a realização do experimento de imunofluorescência no Laboratório de Biologia Estrutural e pela dedicação na obtenção das fotos do experimento.

À Dra. Patrícia Bozza por permitir a realização da coloração dos corpúsculos lipídicos no Laboratório de Imunofarmacologia.

À Dra. Carla Freitas e o Dr. Alan de Brito Carneiro pelo auxílio com a coloração de corpúsculos lipídicos e pelas sugestões experimentais.

Ao Dr. Otávio Menezes de Lima Junior, que possibilitou o meu primeiro contato no Laboratório de Farmacologia Aplicada e à minha grande amiga Dra. Simone Machado Campos Cavalher que me apoiou desde a primeira vez que estive no Rio de Janeiro.

À Márcia Câmara por todas as conversas que possibilitaram me conhecer melhor e que sem isso essa caminhada teria sido muito mais difícil.

Ao Antônio Novaes, meu companheiro da vida que eu amo e tem estado ao meu lado nos melhores e piores momentos, e que me incentivou e apoiou em tudo o que eu precisei.

À minha família incrível, em especial à minha avó, Ana de Carvalho Andrade, e aos meus tios e tias maravilhosos por acreditarem em mim e por toda ajuda quando necessária.

Ao meu Pai pela minha vida e por torcer sempre pelo meu sucesso.

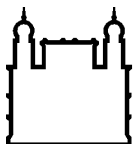
À minha irmã Maiara Andrade por toda a sua delicadeza, carinho e incentivo.

Às duas pessoas que eu mais admiro nessa vida, minha mãe, a quem eu dedico essa tese, e ao meu avô, Manoel F. de Andrade (*in memoriam*) a quem devo parte da minha educação, meu grande mestre.

Ao auxílio financeiro fornecido pelo CNPq, FAPERJ, CAPES e FIOCRUZ.

E por fim, a todas as energias misteriosas que regem esse Universo e que me deram forças para que tudo isso se concretizasse. Reverências! MUITO OBRIGADO!

“If you don't make mistakes, you're not working on hard enough problems.
And that's a mistake.”
— Frank Wilczek.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

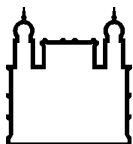
EFEITO DE AGONISTAS DO RECEPTOR CANABINOIDE 2 NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR *Mycobacterium bovis* BCG

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Magaiver Andrade Silva

Os receptores canabinoides do tipo 2 (CB2) são expressos em células hematopoiéticas e nos últimos anos tem sido considerada sua importância na modulação da resposta inata – imune. A ativação dos receptores CB2 induz efeitos anti-inflamatórios em diferentes modelos experimentais de inflamação, incluindo em processos de origem infecciosa. Entretanto, não existem estudos descrevendo o efeito da ativação deste receptor na reação inflamatória induzida por micobactérias. No presente trabalho, demonstramos a ação de agonistas do receptor CB2, o β -cariofileno (BCP) e o GP1a em dois modelos inflamatórios induzidos pelo *M. bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG), a pleurisia e a inflamação pulmonar. Além disso, investigamos o efeito desses compostos *in vitro*, a fim de esclarecer o mecanismo de ação pelo qual o BCP e o GP1a inibem a migração de neutrófilos e a ativação de macrófagos induzidos pelo BCG. Nossos resultados demonstraram que o BCP (50 mg/kg) reduziu o acúmulo de neutrófilos na pleurisia induzida pelo BCG e inibiu a produção de CXCL1/KC, LTB₄ e NO no lavado pleural. O GP1a desempenhou efeitos similares ao BCP. Na inflamação pulmonar, o pré-tratamento com BCP inibiu a migração de neutrófilos e células mononucleares, a produção IL-12, IFN- γ , IL-10 e CCL2 e a formação de corpúsculos lipídicos nas células presentes no lavado broncoalveolar. O pré-tratamento *in vitro* de neutrófilos murinos com o BCP (10 μ M) reduziu a quimiotaxia induzida pelo LTB₄ (10⁻⁷ M) e a adesão a células endoteliais estimuladas com TNF- α . Em adição, o BCP e o GP1a, inibiram a polimerização do citoesqueleto de actina induzida pelo LTB₄, sugerindo um mecanismo celular pelo qual ambos os agonistas inibem a migração de neutrófilos. Em macrófagos o tratamento com GP1a inibiu a produção de IL-6, TNF- α , IL-10, PGE₂ e NO, além de reduzir a formação de corpúsculos lipídicos, e a expressão de COX-2 induzidos pelo BCG. O GP1a também inibiu fosforilação de p38 e ERK1/2 e reduziu a translocação do fator nuclear NF- κ B, indicando um dos mecanismos pelo qual o GP1a inibe a ativação de macrófagos induzida pelo BCG. Os nossos resultados sugerem que a ativação dos receptores CB2 podem representar um novo alvo na modulação da resposta inflamatória induzida pela micobactéria.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFFECT OF CANNABINOID 2 RECEPTOR AGONISTS IN THE INFLAMMATORY RESPONSE INDUCED BY *Mycobacterium bovis* BCG

ABSTRACT

PHD THESIS IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Magaiver Andrade Silva

Cannabinoid type 2 (CB2) receptors are expressed in hematopoietic cells. In the last years the importance of these receptors in the innate immune response has been considered. CB2 receptors activation induce anti-inflammatory effects in different experimental models of inflammation, including infectious conditions. However, no studies addressing the effect of CB2 agonists on the inflammatory process under mycobacterium infection conditions. In the present study, we demonstrated the action of both CB2 receptor agonists, β -caryophyllene (BCP) and GP1a, using two models of inflammation caused by *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG), pleurisy and pulmonary inflammation. Furthermore, we investigated the effect of these compounds *in vitro* in order to elucidate the mechanism of action through which BCP and GP1a inhibit neutrophils migration and macrophages activation induced by BCG. Our results showed that BCP (50 mg/kg) reduced neutrophils accumulation in BCG-induced pleurisy and inhibited CXCL1/KC, LTB₄, and NO production in the pleural wash. GP1a pre-treatment showed similar effects to BCP. In pulmonary inflammation, BCP prevented neutrophils and mononuclear cells migration, production of IL-12, IFN- γ , IL-10 and CCL2, and lipid bodies formation in total leukocytes present in bronchoalveolar lavage fluid. *In vitro*, BCP pretreatment prevent murine neutrophils chemotaxis induced by LTB₄ (10⁻⁷ M) and adherence to endothelial cells stimulated by TNF- α . Moreover, BCP and GP1a impaired LTB₄-induced actin polymerization, suggesting a cellular mechanism through which both CB2 receptor agonists prevent neutrophil migration. In BCG-stimulated murine macrophages, GP1a pre-treatment inhibited IL-6, TNF- α , IL-10, PGE₂ and NO production, reduced the lipid bodies formation and COX-2 expression. GP1a also reduced p38 and ERK1/2 phosphorylation and NF- κ B translocation to the nucleus, indicating a molecular mechanism by which GP1a inhibits macrophage activation induced by BCG. These results suggest that CB2 receptor may represent a new target for modulating the inflammatory reaction induced by mycobacteria.

Lista de Siglas e Abreviaturas

2-AG	2-aracdonoilglicerol
AA	Ácido araquidônico
AC	Adenilato ciclase
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i> (adenosina difosfato)
AEA	<i>Arachidonoylethanolamine</i> (Anandamida)
Akt/PKB	<i>Akt/Potein kinase B</i> (proteína quinase B)
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
AP-1	<i>Activator protein-1</i> (proteína ativadora-1)
APS	<i>Ammonium persulfate</i> (persulfato de amônio)
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (adenosina trifosfato)
BAL	<i>Bronchoalveolar lavage</i> (lavado broncoalveolar)
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BCP	Beta-cariofileno (β -cariofileno)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina sérica bovina)
CB	Canabinoide
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFA	<i>Complete Freund's adjuvant</i> (Adjuvante completo de Freund)
CL	Corpúsculo lipídico
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
CR	<i>Complement Receptor</i> (receptor do complemento)
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i> (proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc)
CXCL	Ligante de quimiocinas CXC
Dex	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitól
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etileno diamino-tetra acético)

EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiaminotetracético de etilenoglicol)
EIA	<i>Enzyme Immunoassay</i> (Ensaio imunoenzimático)
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
EPM	Erro padrão da média
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinases</i> (quinase regulada por sinal extracelular)
ESAT-6	<i>Early secretory antigenic target-6 kDa</i>
F-actina	Filamentos de actina
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (isotiocianato de fluoresceína)
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> (receptor acoplado à proteína G)
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i> (solução salina balanceada de Hank's)
HEPES	N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-etanosulfônico
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (vírus da imunodeficiência humana)
HSL	<i>Hormone-sensitive lipase</i> (hormônio lipase sensível)
i.m.	Intramuscular
i.n.	intranasal
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratorácica
IA	Índice de adesão
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i> (molécula de adesão intercelular-1)
IFN	Interferon
IgG	imunoglobulina G
IKK	<i>IκB kinase</i> (quinase I κ B)
IL	Interleucina
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> (óxido nítrico sintase induzida)
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i> (quinase associada ao receptor de IL-1)
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i> (c-Jun N-terminal quinase)
K _i	Constante de dissociação
LAM	Lipoarabinomanana
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>

LPS	Lipopolissacarídeo
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MAC-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MAL	<i>MyD88 adaptor-like</i> (adaptador semelhante a MyD88)
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i> (proteína quinase ativada por mitógeno)
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> (proteína quimioatrante de monócitos)
MDP	<i>Muramyl dipeptide</i> (dipeptídeo muramil)
MDR	<i>Multi drug resistant</i> (resistência a multi medicamentos)
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i> (quinase ativadora de MAP quinase)
MKK	<i>Mitogen activated protein (MAP) kinase kinase</i> (proteína quinase quinase ativada por mitógeno)
MOI	Multiplicity of infection (multiplicidade de infecção)
MMP	<i>Matrix metalloproteinase 9</i> (Metaloproteinase de matriz)
MPO	Mieloperoxidase
MR	<i>Mannose receptor</i> (receptor de manose)
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> (Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>)
MTT	<i>3-(4,5 dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt)</i> (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
MyD88	<i>Myeloid Differentiation (MyD) 88</i> (fator de diferenciação mielóide 88)
NAG	N-acetilglucosaminidase
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa B</i> (Fator nuclear-kappa B)
NK	<i>Natural killer</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i> (receptor do tipo NOD)
NLRP3	<i>NLR Pyrin Domain Containing 3</i> (NLR contendo o domínio de pirina 3)
NO	<i>Nitric oxide</i> (óxido nítrico)
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i> (domínio de ligação de nucleotídeos por oligomerização)
NP-40	<i>Nonidet P-40</i>
OPD	<i>Orthophenylenediamine</i> (ortofenilenediamina)

PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> (padrão molecular associado ao patógeno)
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (solução salina tamponada)
PD-1	<i>Programmed death-protein-1</i> (proteína de morte programada 1)
PD-L1	<i>Programmed death-ligand-1</i> (ligante de proteína de morte programada)
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PMN	Polimorfonuclear
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoreto
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> (receptores ativados por proliferador de peroxissoma)
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> (receptor de reconhecimento padrão)
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucléico)
RNI	<i>Reactive nitrogen intermediates</i> (espécies intermediárias de nitrogênio)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
SFB	Soro fetal bovino
TAB	<i>TAK1-binding protein</i> (proteína ligadora de TAK1)
TAG	Triacilglicerol
TAK1	Transforming growth factor β activated kinase-1
TB	Tuberculose
THC	tetrahydrocannabinol
TIR	<i>Toll/interleukin-1 (IL-1) receptor</i> (receptor de Toll/IL-1)
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i> (proteína adaptadora contendo domínio TIR)
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Receptor do tipo <i>Toll</i>)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)
TNFR	<i>TNF receptor</i> (receptor de TNF)
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i> (fator associado ao receptor de TNF)
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i> (molécula adaptadora relacionada à TRIF)
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-beta</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
v.o..	via oral
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> (molécula de adesão celular 1)

VLA-4 *Very late antigen-4*

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspecto gerais da tuberculose	1
1.2	A resposta inata do hospedeiro contra o <i>M. tuberculosis</i>	3
1.2.1	Reconhecimento da micobactéria e ativação de macrófagos.....	3
1.2.2	Recrutamento e o papel dos neutrófilos durante a infecção.....	8
1.3	Canabinoides	10
1.3.1	Receptores canabinoides	14
1.3.2	Agonistas dos receptores CB2 na inflamação	16
1.3.2.1	Agonistas sintéticos.....	16
1.3.2.2	O fitocanabinoide β -cariofileno.....	17
2	JUSTIFICATIVA	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	Objetivo geral	21
3.2	Objetivos específicos	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	Animais	22
4.2	Anticorpos e Reagentes	22
4.3	<i>Mycobacterium bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin (BCG).....	23
4.4	Tratamento <i>in vivo</i>	24
4.5	Pleurisia induzida por BCG	24
4.6	Inflamação pulmonar induzida por BCG.....	24
4.6.1	Contagem total e diferencial de leucócitos	25
4.7	Isolamento de neutrófilos da medula óssea de camundongos.....	25
4.8	Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos.....	26
4.9	Ensaio de adesão de neutrófilos	27
4.10	Ensaio de polimerização do citoesqueleteto de actina	27
4.11	Citometria de fluxo	28
4.12	Cultura de células de linhagem.....	28
4.13	Ensaio de citotoxicidade	29
4.14	Tratamento e estimulação de macrófagos com BCG	29

4.14.1	Pré-tratamento.....	30
4.14.2	Pós-tratamento	30
4.15	-Corpúsculos lipídicos	30
4.16	Dosagem de citocinas.....	31
4.17	Quantificação de mediadores lipídicos	32
4.18	Dosagem de nitrito.....	32
4.19	Detecção das proteínas por <i>western blotting</i>	33
4.19.1	Obtenção de extrato total e nuclear.....	33
4.19.2	Eletroforese e imunomarcação.....	34
4.20	Análise estatística	35
5	RESULTADOS	36
5.1	Efeito do BCP na migração de leucócitos durante a pleurisia induzida pelo BCG.....	37
5.2	Efeito do BCP na produção de mediadores inflamatórios na pleurisia induzida por BCG	45
5.3	Efeito do BCP na ativação de neutrófilos <i>in vitro</i>	47
5.4	Cinética da migração de leucócitos para o pulmão após instilação intranasal do BCG	51
5.5	Efeito do BCP na inflamação pulmonar induzida pelo BCG.....	53
5.6	Efeito do BCP na produção de mediadores inflamatórios na inflamação pulmonar induzida por BCG	55
5.7	Expressão dos receptores CB2 em macrófagos estimulados pelo BCG	58
5.8	Efeito do GP1a na produção de mediadores pró-inflamatórios e na expressão da COX-2 por macrófagos estimulados com BCG	59
5.9	Efeito do GP1a na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados com BCG.....	63
5.10	Efeito do GP1a na sinalização intracelular induzida pelo BCG em macrófagos	65
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÃO	76
8	REFERÊNCIAS	77
9	ANEXOS	92
9.1	ANEXO I Efeito do BCP na produção de IL-12 e CCL2 na pleurisia induzida pela BCG	93

9.2 ANEXO II - Avaliação da adesão de neutrófilos à células endoteliais tratadas ou não com BCP	94
9.3 ANEXO III – Avaliação <i>in silico</i> da interação entre o GP1a e o PPAR γ 95	
9.4 ANEXO IV – Artigo	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Mapa de distribuição de novos casos de TB no mundo no ano de 2014 ..	2
Figura 1.2. Imunopatogenia da tuberculose	3
Figura 1.3. Sinalização dos TLRs envolvidos no reconhecimento de padrões associados à micobactéria	5
Figura 1.4 Estrutura química de alguns representantes dos grupos canabinoides ...	15
Figura 5.1. Avaliação dose-reposta do BCP na migração de leucócitos durante a pleurisia induzida pelo BCG.	38
Figura 5.2. Efeito do pré-tratamento com BCP na migração celular em diferentes períodos de tempo na pleurisia induzida pelo BCG.	40
Figura 5.3 Efeito do BCP na migração de neutrófilos e na expressão de CD11b em células Ly6G ⁺ CD11b ⁺	42
Figura 5.4. Efeito do pré-tratamento com BCP na migração de linfócitos durante a pleurisia induzida pelo BCG	44
Figura 5.5. Efeito do BCP na produção de mediadores pró-inflamatórios durante a pleurisia induzida pelo BCG.	46
Figura 5.6. Efeito do BCP na quimiotaxia e adesão de neutrófilos as células endoteliais	48
Figura 5.7. Efeito do BCP na polimerização dos filamentos de actina em neutrófilos estimulados com LTB ₄	50
Figura 5.8. Cinética da migração de leucócitos para o pulmão após instilação intranasal de BCG.	52
Figura 5.9. Efeito do BCP na migração de leucócitos e formação de corpúsculos lipídicos durante inflamação pulmonar induzida pelo BCG	54
Figura 5.10. Efeito do BCP na produção de mediadores inflamatórios durante inflamação pulmonar induzida pelo BCG	56
Figura 5.11. Macrófagos murinos estimulados por BCG aumenta a expressão do receptor CB2	58
Figura 5.12. Efeito de diferentes concentrações do GP1a na produção de TNF- α	60
Figura 5.13. Pós-tratamento de macrófagos com GP1a inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios induzidos por BCG	61

Figura 5.14. Pré-tratamento de macrófagos com GP1a inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios e a expressão COX-2 induzidas por BCG	62
Figura 5.15 Efeito do GP1a na formação de corpúsculos lipídicos e na expressão do PPAR γ por macrófagos estimulados por BCG.....	64
Figura 5.16. Cinética da fosforilação das MAPKs em macrófagos estimulados com BCG	66
Figura 5.17. Efeito do GP1a na fosforilação das MAPKs e na translocação nuclear do NF- κ B em macrófagos estimulados com BCG.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Agonistas dos receptores CB2	13
Tabela 5 1. Efeito do GP1a na viabilidade de macrófagos murinos J774A.1	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Aspecto gerais da tuberculose*

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), que inclui as espécies *M. tuberculosis* (Mtb), *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti* e *M. microti* (1). Em 2014 foram registrados cerca de 9,6 milhões de novos casos de TB no mundo (Figura 1.1), com aproximadamente 1,5 milhões de óbitos observando-se ainda um aumento dos casos de TB multi-drogas resistente (2). O Brasil ocupa 17^a lugar entre os 22 países que concentram 80% dos casos de TB no mundo e, na última década, foram diagnosticados, em média, 73 mil novos casos de tuberculose por ano, evidenciando que TB é um sério problema de saúde pública (3).

A transmissão das micobactérias se dá predominantemente pelas vias aéreas, acometendo principalmente os pulmões, no caso das micobactérias pertencentes ao complexo MTBC. Ao atingir os pulmões, as micobactérias são rapidamente detectadas e fagocitadas por macrófagos alveolares e células dendríticas (4-6). Durante este processo, os macrófagos alveolares secretam citocinas e quimiocinas induzindo uma resposta inflamatória local com acúmulo celular (5, 7). Na sequência destes eventos, ocorre uma migração de monócitos da corrente sanguínea para o local da infecção, a apresentação de antígenos de Mtb por células dendríticas a linfócitos T nos nódulos linfáticos e a formação de granulomas (8, 9). Geralmente, 90% dos indivíduos infectados, controlam com sucesso a infecção de forma assintomática, sendo os bacilos contidos num estado dormente no interior do granuloma enquanto o indivíduo se mantiver imunocompetente (10, 11). Entretanto, alguns fatores podem contribuir com o desenvolvimento da doença como a imunossupressão, diabetes, desnutrição e idade avançada (12-15). Esses fatores levam à reativação da doença levando à liberação e à disseminação do bacilo na fase ativa da doença (Figura 1.2).

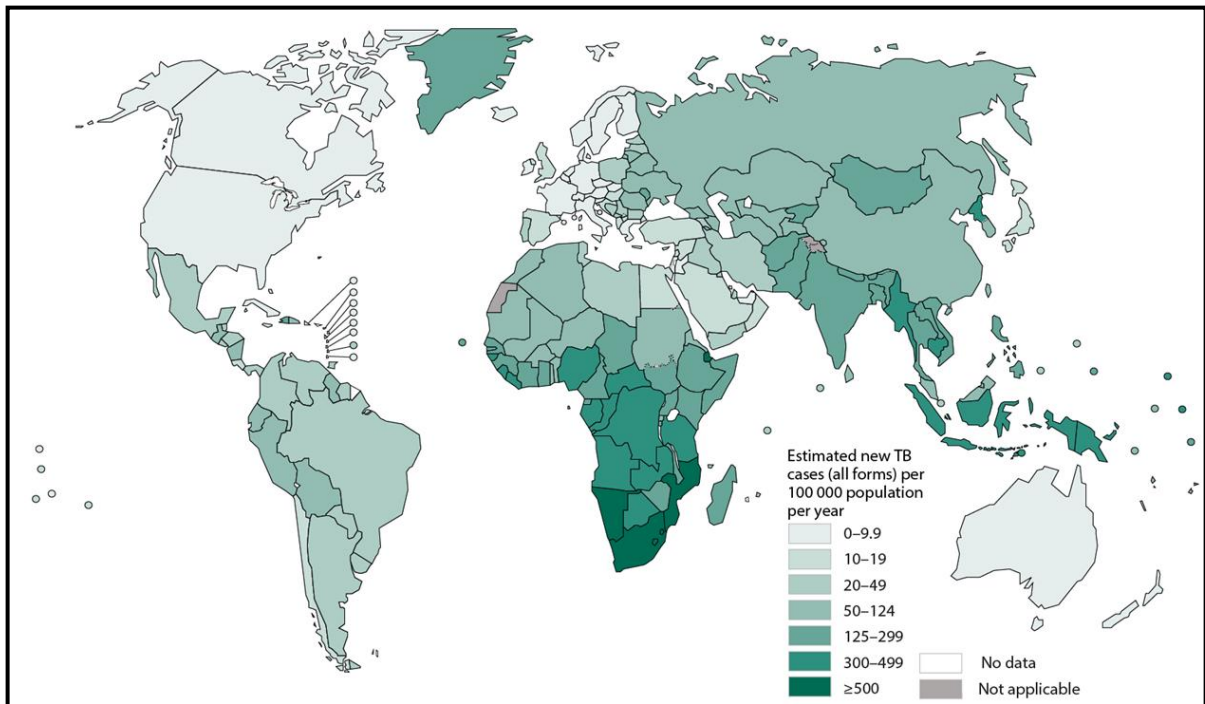


Figura 1.1. Mapa de distribuição de novos casos de TB no mundo no ano de 2014. Fonte: (2)

Durante muitas décadas a pesquisa relacionada à defesa do hospedeiro ao Mtb foi centralizada nas células T, devido à sua marcante habilidade de gerar uma resposta imune específica seguida da resposta de memória para infecções subsequentes (16). Indiscutivelmente, as células T desempenham um papel crucial na proteção contra ao Mtb, sendo classicamente conhecido o papel das células T CD4 e CD8 na modulação da produção de interferon- γ (INF- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e na sobrevivência do hospedeiro (17-20). No passado o papel da resposta inata após a infecção por Mtb foi subestimada na maioria dos estudos. No entanto, nos últimos anos, diversos trabalhos demonstraram que a resposta inata é bastante efetiva e até mesmo fundamental contra a infecção (21, 22). As principais células envolvidas na resposta inata à infecção por Mtb são macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK (*natural killer*) e linfócitos T $\gamma\delta$ (22). Neste trabalho, daremos enfoque ao estudo do envolvimento de macrófagos e neutrófilos à micobactéria, uma vez que estas células são o nicho primário de replicação do Mtb e o primeiro tipo celular a migrar para o foco inflamatório, respectivamente (6).

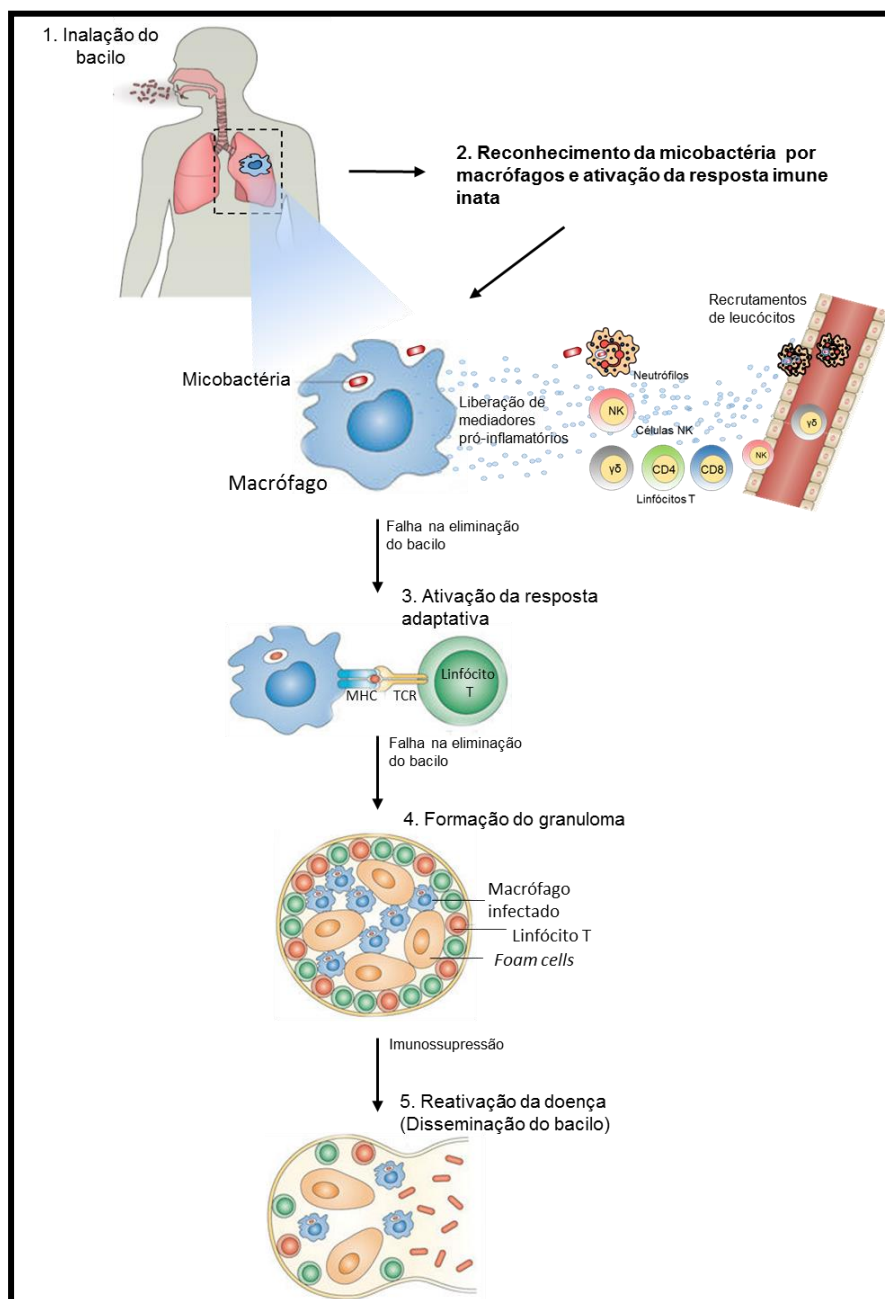


Figura 1.2. Imunopatogenia da tuberculose. Adaptado de (10)

1.2 A resposta inata do hospedeiro contra o *M. tuberculosis*

1.2.1 Reconhecimento da micobactéria e ativação de macrófagos

Imediatamente após a infecção, células mielóides, dentre as quais destacamos os macrófagos, detectam o Mtb através de receptores da membrana celular. Esta detecção desencadeia a ativação da resposta inflamatória, que desempenha um papel importante no controle e/ou eliminação do microorganismo.

Os macrófagos são capazes de reconhecer o Mtb através de diferentes receptores, como os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (23). Os PRRs são estruturas altamente conservadas evolutivamente que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) expressos pela micobactéria. Dentre esses PRRs estão os receptores de manose (MR), os receptores de ligação ao nucleotídeo contendo domínio com seqüência repetida de resíduos do aminoácido leucina (NOD like receptors - NLRs) e os receptores do tipo "Toll" (TLRs) (23).

Os MRs estão envolvidos com a fagocitose da micobactéria. Estes receptores MRs induzem a fagocitose através do reconhecimento de resíduos da lipoarabinomanana manosilados (ManLAM) expressos na parede da micobactéria (24, 25). Além dos MRs, os receptores de complemento (CRs) também são importantes na fagocitose da micobactéria, no entanto não são PRRs. Os CRs fagocitam Mtb pelo reconhecimento da bactéria opsonizada ou não por componentes do complemento (26-28). Os NLRs, são PRRs intracelulares que regulam a resposta imune inata do hospedeiro (29). Na infecção pela micobactéria, destacam-se o NOD2 e o inflamassoma NLRP3 que são ativados pelo dipeptídeo muranil (MPD), encontrado na parede micobacteriana (30-32). Além disso, a micobactéria secreta a proteína ESAT-6 que é um potente ativador do NLRP3 (33). A ativação desses receptores induzem a produção de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , TNF- α e NO, e controlam o crescimento intracelular do Mtb em macrófagos (31-33).

Os TLRs reconhecem uma variedade de PAMPs de micobactéria (Figura 1.3) O Mtb é reconhecido pelo TLR2, TLR4 e TLR9, através dos componentes da parede ou do DNA micobacteriano. O TLR2 e TLR4 estão localizados na superfície celular e o TLR9 no compartimento endossomal (34, 35). Além destes TLRs, trabalhos mais recentes, também sugerem a participação do TLR8 na infecção por micobactérias (36-38).

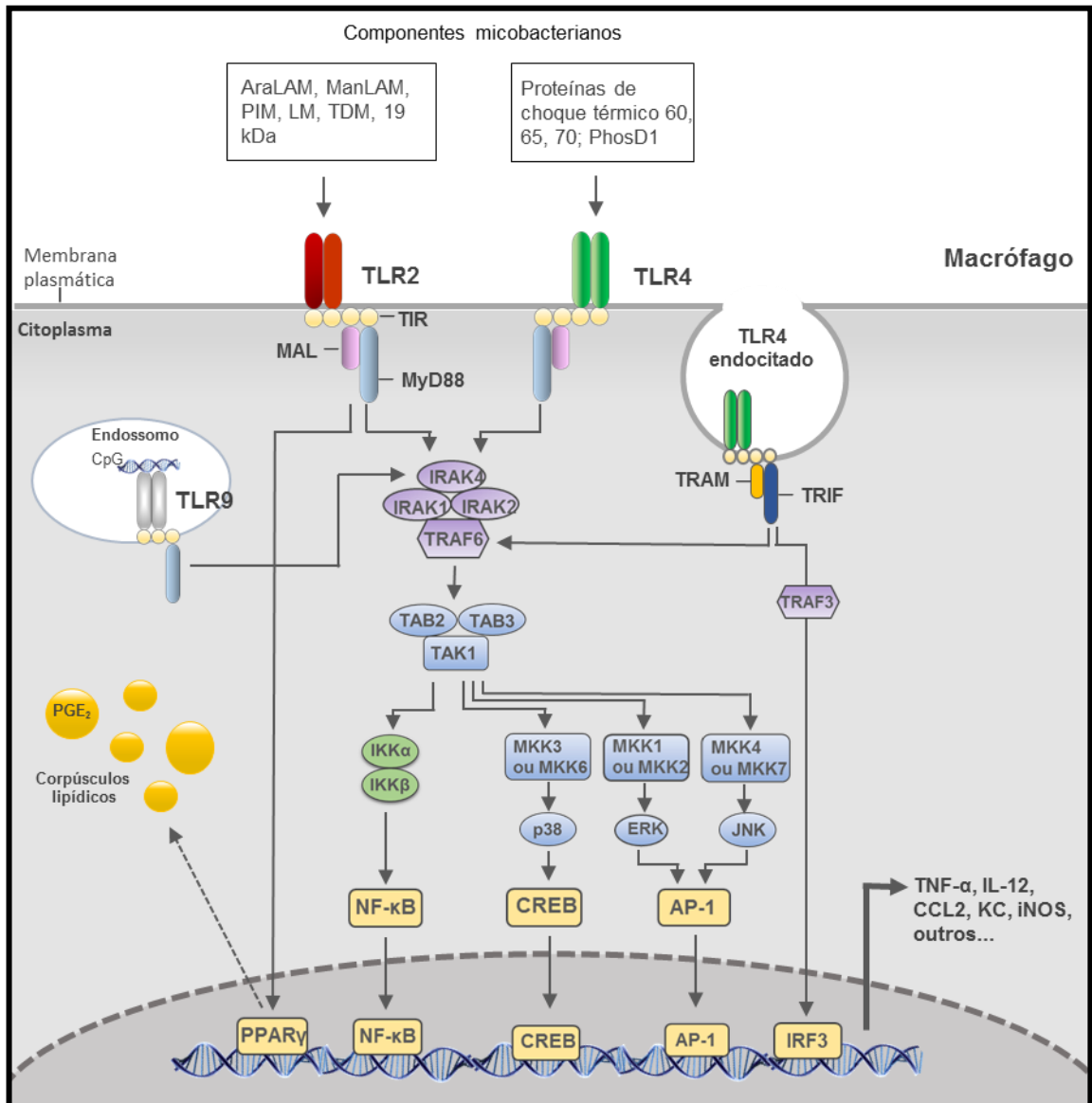


Figura 1.3. Sinalização dos TLRs envolvidos no reconhecimento de padrões associados à micobactéria. Os TLRs são apresentados na membrana plasmática e nos endossomas, onde detectam componentes micobacterianos através de TLR2, TLR4 e TLR9. Após a estimulação ativam duas vias que envolve o MyD88 e/ou TRIF, levando à ativação de fatores transcripcionais e resultando na produção de quimiocinas e citocinas. AraLAM, lipoarabinomanana capeada de arabinose; ManLAM, lipoarabinomanana capeada de manose; PIM, fosfatidil dimanosídeo, LM, lipomanana; TDM, dicomilato trehalose; 19 kDa; lipoproteína 19 kDa; PhoS1, glicoproteína; AP-1, proteína ativadora-1; CREB, proteína de ligação ao elemento responsivo de AMPc; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; IKK, quinase inibidora de κ B; IRAK, quinase associada à interleucina-1; IRF, fator regulador de IFN; JNK, JUN N-terminal quinase; MAL, adaptador semelhante a MyD88; MEK, quinase ativadora de MAPK; MKK, MAP quinase quinase; TAB, proteína ligadora de TAK1; TAK1, quinase 1 ativada por $TGF\beta$ (also known as MAP3K7); TRAF, fator associado ao receptor de do fator de necrose tumoral (TNF); TRAM, molécula adaptadora relacionada à TRIF. Adaptado de (39)

A interação dos componentes micobacterianos com TLRs induz a ativação do macrófago por uma sinalização intracelular dependente de moléculas adaptadoras que apresentam o domínio citoplasmático do receptor de TIR (do inglês, *Toll-IL-1*

receptor), essas moléculas são: MyD88, MAL (também conhecido como TIRAP), TRIF e TRAM. O MyD88 desempenha um papel central nesse processo, uma vez que é uma molécula comum para o início da sinalização dos receptores TLR2, TLR4 e TLR9. O TLR4 também pode induzir sinais intracelulares através de uma via independente da MyD88, que é a via do TRIF e TRAM. O MyD88 induz o recrutamento e a associação sequencial das proteínas, IRAK, TRAF e TAK1 ao complexo receptor, resultando na ativação das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) (40-44). Em mamíferos, já foram descritas pelo menos 14 MAPKs, das quais a p38, ERK1/2 e JNK1/2 são extensivamente estudadas no contexto da resposta imune inata (45). A fosforilação das MAPKs pela TAK 1 induz a ativação de fatores de transcrição, como o AP-1 e CREB (46-48). Simultaneamente, a TAK1 fosforila o IKK β do complexo IKK, resultando na ativação do NF κ B via fosforilação e subsequente degradação das proteínas I κ B (45, 48). A ativação desses fatores leva à transcrição de vários genes pró-inflamatórios e anti-inflamatórios que regulam a inflamação induzida pelas micobactérias, incluindo os responsáveis pela produção de citocinas (IL-12, TNF- α , IL-10), quimiocinas (CCL2/MCP-1 e CXCL8/IL-8), iNOS e COX-2 (para produção de NO e PGE₂) (44, 45, 48-52) (Fig. 1.3)

As citocinas orquestram a ativação e a migração celular desempenhando um papel importante no desenvolvimento da resposta inflamatória durante a infecção por micobactérias. O TNF- α é uma das primeiras moléculas efetoras da resposta imune na tuberculose (53). Durante o processo infeccioso, o TNF- α auxilia na contenção da infecção através da indução da formação do granuloma (8, 53-55) e contribui para migração de leucócitos, tais como os neutrófilos, para o tecido infectado (56, 57). A importância do TNF- α no controle das infecções micobacterianas tem sido demonstrada pela reativação da doença com o uso de drogas anti-TNF- α (58), e também em animais deficientes para TNF- α ou seu receptor, TNFR (53, 59, 60).

A IL-12 também desempenha um papel crucial no controle da infecção micobacteriana, esta molécula estimula os linfócitos T a produzirem IFN- γ e aumentam a migração de células dendríticas para os linfonodos (61-63). Uma das mais importantes ações do IFN- γ na infecção por micobactérias é ativar o macrófago induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que são

importantes para induzir morte do patógeno (63). Em sinergismo com TNF- α , o IFN- γ estimula a produção de NO podendo levar à morte da bactéria pelo macrófago (64, 65). Além disso, o IFN- γ , como também a IL-12, são importantes na indução da proliferação de células T no modelo de pleurisia induzida pelo BCG (66).

A quimiocina CXCL8/IL-8 (análogo murino: CXCL1/KC) é um potente quimioatraente para neutrófilos. A IL-8 é encontrada no lavado broncoalveolar (67) e no fluido pleural (68) de pacientes com TB e tem sido sugerido como um biomarcador da TB ativa (69). Uma outra quimiocina presente nesse processo é a MCP-1/CCL2 que através do seu receptor CCR2, induz a atração de diferentes tipos celulares como linfócitos T, monócitos, macrófagos e células NK (70-72). Na infecção pleural induzida pelo BCG, foi demonstrado que a produção de CCL2 é importante para o recrutamento de linfócitos T $\gamma\delta$, e também linfócitos T CD4 e T CD8 (72).

Além das citocinas e quimionas, os mediadores lipídicos também participam do processo inflamatório induzido pela micobactéria. O LTB₄ é um derivado do metabolismo do ácido araquidônico (AA) pela enzima 5-lipoxigenase (5-LO). Assim como a IL-8, o LTB₄ é um potente quimioatraente para os neutrófilos (73, 74) e exerce suas funções por se ligar principalmente ao receptor BLT1 (75). No soro e em fluidos pleurais de pacientes com TB existem elevadas concentrações de LTB₄ (76, 77) que contribui ativamente para a migração de neutrófilos para o sítio infectado (77). Além de induzir a migração de neutrófilos, o LTB₄ é importante para a migração de eosinófilos e linfócitos T durante a pleurisia induzida pelo BCG em camundongos, evidenciando o seu papel na migração celular durante a infecção (78, 79).

Um outro mediador lipídico envolvido na resposta à micobactéria é a PGE₂, um derivado eicosanóide do AA, sintetizado pela ação da enzima ciclooxigenase do tipo 2 (COX-2). A PGE₂ está associada a um perfil anti-inflamatório na infecção pela micobactéria (80-82). O aumento de PGE₂ relaciona-se com aumento de IL-10 e com inibição da produção de TNF- α por macrófagos infectados pelo BCG (81). Além disso, foi descrito que PGE₂ em altas concentração induz efeitos imunossupressores por inibir a produção de citocinas do perfil Th1, como IFN- γ , assim como a produção de TNF- α , que são essenciais para o combater a micobactéria (83, 84). É importante ressaltar que na infecção por BCG e Mtb, a produção de PGE₂ tem sido associada

com formação de corpúsculos lipídicos (CLs) em macrófagos (85, 86). Os CLs são organelas constituídas de um núcleo de lipídios neutros (colesterol e triacilglicerol) envolto por uma monocamada de fosfolipídios associada a proteínas (87, 88). Os CLs compartimentalizam precursores eicosanóides, como o AA e enzimas como a COX-2 e lipoxigenase (LOX) (89-92). Assim, os CLs são importantes sítios de produção de eicosanóides, como a PGE₂ e LTB₄ (81, 93).

O aumento da formação CLs é associado com a patologia de diversas condições inflamatórias e infecciosas (87, 94). Na infecção pelo Mtb foi demonstrado que os CLs servem como fonte de nutrientes fornecido pelos ácidos graxos (95, 96), e podem contribuir com a resistência do bacilo a fármacos antimicobacterianos, como a rifampicina e isoniazida (97, 98). Além disso, os produtos dos CLs, como a PGE₂ podem induzir efeitos imunossupressores como reportado anteriormente. Esses dados demonstram que os CLs podem contribuir com a patogênese da TB. Além do Mtb, as espécies *M. leprae* (99) e *M. bovis* BCG (81) também induzem o acúmulo de CLs dentro da célula hospedeira. Em macrófagos infectados com BCG, a formação de CLs é dependente da sinalização de TLR2 e CD36 que induzem a ativação do receptor nuclear, PPAR γ (81, 85, 100). Foi demonstrado que a formação de CLs e a produção de PGE₂ induzida pelo BCG foi potencializada pela ação da rosiglitazona, um agonista do PPAR γ . Em contrapartida, esses eventos foram revertidos com o uso do antagonista do PPAR γ , GW9662. Além de reduzir a formação de CLs e os níveis de PGE₂, o GW9662 aumentou a capacidade do macrófago em induzir a morte do BCG (85). O papel da ativação do PPAR γ na regulação da biogênese de CLs e na produção de PGE₂ foi confirmada em macrófagos infectados com Mtb utilizando RNAi para silenciar a expressão de PPAR γ (86). Esses dados indicam que a formação do CLs e a produção de PGE₂ é dependente da ativação do PPAR γ durante a infecção pelo BCG e que a formação dessas organelas através do PPAR γ pode contribuir para a sobrevivência da bactéria.

1.2.2 Recrutamento e o papel dos neutrófilos durante a infecção

Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa contra as infecções bacterianas, migrando rapidamente em grande número a favor de um gradiente de

mediadores quimiotáticos, como CXCL8, CXCL1 e LTB4 produzidos no sítio infeccioso (101). Estas células rapidamente fagocitam e posteriormente, matam as bactérias através da produção e secreção de diferentes agentes antimicrobianos. Estes efetores antibacterianos compreendem peptídeos, espécies reativas de oxigênio (ROS) e diferentes enzimas, como elastase, lisozima e mieloperoxidase que são armazenadas nos grânulos. No entanto, o excesso na liberação desses agentes podem levar ao dano tecidual (102).

Os neutrófilos constituem a maior população de células envolvidas na resposta imune inata presente no lavado broncoalveolar e no escarro de pacientes com TB ativa (103). Há uma relação inversamente proporcional entre o desenvolvimento da TB pulmonar e o número de neutrófilos no sangue periférico de indivíduos que entraram em contato com pacientes com TB ativa (104). Isto se reforça com dados experimentais que demonstram que a depleção de neutrófilos do sangue periférico reduziu a quantidade de peptídeos antimicrobianos e resultou em um aumento do crescimento do BCG e do *Mtb in vitro* (104). Neutrófilos infectados com a micobactéria aumentam a produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- α (105). Tem sido demonstrado, que peptídeos antimicrobianos provenientes de neutrófilos aumentam a capacidade do macrófago em restringir o crescimento da micobactéria (106). Além da cooperação entre neutrófilos e macrófagos, há também, a interação entre neutrófilos e células dendríticas no desenvolvimento da resposta imune adquirida contra o patógeno (107, 108). Os neutrófilos aumentam a habilidade das células dendríticas migrarem para o linfonodo e ativar a resposta específica de linfócitos T CD4 contra a *Mtb* (108).

Embora o papel protetor dos neutrófilos contra a infecção micobacteriana tenha sido evidenciado, nos últimos anos tem crescido o número de trabalhos destacando o papel prejudicial desta célula no contexto da infecção. Um estudo identificou uma assinatura molecular de 86 genes capazes de distinguir a TB ativa de outras doenças inflamatórias. A análise relevou que esses genes são de proteínas envolvidas na sinalização intracelular de IFN- γ . Além disto, foi observado a intensa expressão de IFNs do tipo I em neutrófilos de pacientes com TB ativa. Embora o IFN- γ seja crucial na defesa do hospedeiro, os IFNs do tipo I podem ser nocivos ao hospedeiro na TB, evidenciando a possibilidade dos neutrófilos contribuírem para a patogênese da TB (109). De acordo com esse estudo, outros

trabalhos têm enfatizado o papel deletério dos neutrófilos na patogênese da TB (110-112). Foi demonstrada a predominância de neutrófilos produtores da proteína S100A8/A9 dentro de granulomas de pacientes com TB ativa, assim como aumento da concentração de S100A8/A9 no soro de pacientes com TB, o que se correlaciona proporcionalmente com o número de neutrófilos circulantes, com aumento da concentração sérica de CXCL8 e com o dano no tecido pulmonar (110). Além disso, os neutrófilos podem reduzir a resposta imune mediada por linfócitos T através do ligante de morte programada 1 (PD-L1) que altamente expresso em neutrófilos sanguíneos de pacientes com TB (113). A interação entre PD-L1 e seu receptor na superfície de linfócitos, inibe a função efetora de linfócitos T na TB (114), assim o aumento da expressão de PD-L1 em neutrófilos pode ser possível fator patogênico na doença. Em adição, os neutrófilos infectados com BCG *in vitro* são grandes produtores da citocina anti-inflamatória, IL-10 (115). Foi demonstrado na infecção experimental *in vivo* com BCG que os neutrófilos induzem a formação de CLs e a produção de PGE₂ e TGF- β por macrófagos, sugerindo que os neutrófilos podem favorecer a sobrevivência do patógeno por induzir um ambiente anti-inflamatório durante a infecção (116). Alguns estudos tem demonstrado que a depleção de neutrófilos em camundongos infectados com Mtb, reduz a produção de IL-10 aumentando a produção de TNF- α no pulmão, além de diminuir o dano tecidual, a carga bacteriana e prolongar a sobrevivência dos animais (111, 115, 117, 118). Estes trabalhos, sugerem que a resposta inflamatória exacerbada mediada pela intensa migração de neutrófilos pode ser nociva para o hospedeiro, evidenciando a importância da modulação desse processo.

1.3 Canabinoides

Os canabinoides são substâncias farmacologicamente ativas que modulam tanto processos fisiológicos quanto patológicos, através da ativação de receptores canabinoides, CB1 e CB2 (119, 120). Os agonistas canabinoides são responsáveis por diversos efeitos biológicos, como analgésico, antiemético, antitumoral e também anti-inflamatório (121-128), e são classificados em três grupos baseado na sua origem: canabinoides endógenos (endocanabinoides), fitocanabinoides e canabinoides sintéticos (120). Os endocanabinoides (eCBs) são eicosanóides

derivado de ácidos graxos de cadeia polinsaturada, como AA e compreende amidas, ésteres e éter (129). A anandamida (AEA) foi o primeiro endocanabinoide descrito no cérebro de mamíferos e em outros tecidos (130), seguido do 2-aracdoinoilglicerol (2-AG) (131, 132). A AEA e o 2-AG representam as principais substâncias dessa classe. Os eCBs juntamente com os receptores canabinoides e as enzimas que regulam a sua biosíntese e degradação, constituem o “sistema endocanabinoide” (133). O grupo dos fitocannabinoides é composto por substâncias classicamente ativas extraídas da *Cannabis sativa*, cuja atividade farmacológica está associada à classe terpenofenólica. Os fitocannabinoides são os responsáveis pelos efeitos da *C. sativa* e classificados em dois grupos: os cannabinoides psicoativos, como o tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC), e os não psicoativos, como exemplos, o canabidiol e canabinol (134, 135). Dentre todos os cannabinoides contidos nesta planta, o THC, primeiro canabinoide isolado, é reconhecidamente, o principal composto responsável pelo efeito psicoativo da maconha (136). Atualmente várias moléculas têm sido isoladas de diferentes espécies vegetais com afinidade para os receptores canabinoides, como as alquilamidas derivados de *Echinacea angustifolia* e *Otanthus maritimus*, e também o sesquiterpeno, β -cariofileno, encontrado em várias espécies vegetais, incluindo a maconha (137-140). Desta forma, os fitocannabinoides são classificados como as substâncias de origem vegetal que interagem com os receptores canabinoides (137, 138).

O isolamento e a caracterização da estrutura química dos THC e endocannabinoides possibilitaram o desenvolvimento dos cannabinoides sintéticos. A partir do THC foi possível a síntese de vários compostos que apresentam estruturas químicas similares ou distintas do TCH com diferentes níveis de afinidade para os receptores canabinoides (120, 141). Os cannabinoides sintéticos tem sido extensivamente utilizado como uma ferramenta farmacológica em estudos *in vivo* ou *in vitro* a fim de explorar o potencial terapêutico do sistema canabinoide. Exemplos desses agonistas e as respectivas afinidades com seus receptores são mostrados na Tabela 1.1. Tanto os cannabinoides de origem natural quanto os de origem sintética podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em cannabinoides clássicos, não-clássicos, aminoalquilindóis e eicosanóides (120) (Figura 1.4). Os cannabinoides clássicos incluem moléculas que possuem uma estrutura tricíclica com anel dibenzopirano. Este grupo inclui compostos naturais,

como THC e seus análogos sintéticos, como exemplo o JWH-133. Os canabinoides não-clássicos são representados por compostos que possuem estruturas similares ao THC, com estrutura bicíclica ou tricíclica e não apresentam o anel pirano. O membro mais representativo desse grupo é o CP55,940. O terceiro grupo, os aminoalquilindóis têm estruturas completamente diferentes dos grupos anteriores. Dentre estes canabinoides, que incluem o WIN55,212-2, foram desenvolvidos primeiramente como drogas anti-inflamatórias e analgésicas, sendo posteriormente descoberta a ligação destes agonistas aos receptores CB1 e CB2 (142). Os eicosanóides compõem a última classe de agonistas canabinoides, a qual é constituída pelos endocanabinoides (AEA e 2-AG) e seus análogos sintéticos, como metanandamida.

Além dos agonistas aqui descritos, nos últimos anos diversos agonistas foram sintetizados afim de obter moléculas com uma maior afinidade para os receptores CB1 ou CB2, como exemplo, uma série de tricíclicos pirazólicos tem sido sintetizada, principalmente a fim de se obter agonistas seletivos CB2, dentre estes destaca-se o GP1a (discutido mais adiante) (143, 144). Existem ainda os antagonistas dos receptores canabinoides, como exemplo, o AM280, potente antagonista dos receptores CB1 e o AM680, antagonista dos receptores CB2.

Tabela 1.1. Agonistas dos receptores CB2

Canabinoide	CB1	CB2	Grupos	Classe
β -cariofileno	Fraca ligação K_i =	Agonista seletivo K_i = 155 nM	Fitocanabinoide	Outras
THC	Agonista parcial K_i = 5,05 nM	Agonista parcial K_i = 3,13 nM	Fitocanabinoide	Clássico
GP1a	Fraca ligação K_i = 363 nM	Agonista seletivo K_i = 0,037 nM	Sintético	Outras
CP-55940	Agonista integral K_i = 0,58 nM	Agonista integral K_i = 0,69 nM	Sintético	Não clássico
JHW-133	Fraca ligação K_i = 677 nM	Agonista seletivo K_i = 3,4 nM	Sintético	Não-Clássico
JWH-015	Fraca ligação K_i =383 nM	Agonista seletivo K_i = 14 nM	Sintético	Aminoalquilindol
O-1966	Fraca ligação K_i = 5055 nM	Agonista seletivo K_i = 23,1 nM	Sintético	Aminoalquilindol
O-2137	Fraca ligação K_i = 2700 nM	Agonista seletivo K_i = 11 nM	Sintético	Outras
JHW-133	Fraca ligação K_i = 677 nM	Agonista seletivo K_i = 3,4 nM	Sintético	Clássico
WIN55,212-2	Agonista integral K_i = 1,9 nM	Agonista integral K_i = 0,3 nM	Sintético	Aminoalquilindol
Anandamida	Agonista parcial K_i = 89 nM	Agonista parcial K_i = 371 nM	Endógeno	Eicosanóide
2-AG	Agonista integral K_i = 142 nM	Agonista integral K_i = 1400 nM	Endógeno	Eicosanóide

Adaptado de (145)

1.3.1 Receptores canabinoides

O CB1 e o CB2 são os principais receptores do sistema canabinoide. Ambos pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), mais especificamente à proteína G inibitória (G_i) (146). A ativação dos receptores canabinoides inibe a AC reduzindo o acúmulo do AMPc intracelular (146-150) e modula a ativação de diferentes membros da família das MAPKs, incluindo ERK1/2, p38 e JNK1/2 (146-148, 151-155). Além do CB1 e CB2, outros receptores canabinoides foram descritos, são eles: GPR55 (156), GPR18 (157) e GPR119 (158). Além da ativação via GPCRs, os canabinoides podem desempenhar suas ações por ativar os PPARs, incluindo o PPAR γ (159-162).

Os receptores CB1 e CB2 são expressos no sistema nervoso central (SNC) e na periferia. No entanto, o receptor CB1 é predominantemente expresso no SNC e está associado com os efeitos psicotrópicos dos agonistas canabinoides, como o THC (163-166). Os efeitos psicotrópicos induzidos pela ativação dos receptores CB1 limitam o seu potencial terapêutico. Entretanto, o CB2 não produz efeitos psicoativos e são expressos majoritariamente na periferia (120, 166, 167). Estudos revelaram que o CB2 é expresso em todas as células hematopoéticas, sendo que os níveis de expressão variam entre as diferentes populações celulares (165, 166). Além disso, o estado de ativação celular também influencia na expressão do CB2 (168, 169). Macrófagos provenientes de diferentes tecidos aumentam a expressão de CB2 após o estímulo com IFN- γ , sugerindo que macrófagos ativados durante um processo inflamatório podem ser mais sensíveis à ação de agonistas canabinoides do que aqueles em estado de repouso (169).

A investigação sobre a estrutura e a atividade de fitocannabinoides e endocannabinoides contribuiu para o desenvolvimento de compostos sintéticos com elevada potência e seletividade para os receptores canabinoides. Os canabinoides sintéticos, que podem ser agonistas e antagonistas, permitem uma melhor compreensão biológica das ações dos receptores CB1 e CB2 (141, 147). Visto que a expressão de CB2 encontra-se distribuída principalmente em células do sistema imune, como neutrófilos e macrófagos, esses receptores se tornaram um alvo importante na modulação do sistema imune, especialmente em condições inflamatórias (170, 171). Como o presente estudo se propôs a investigar os efeitos

de agonistas seletivos do receptor CB2, apenas as funções destas substâncias no processo inflamatório serão reportadas a seguir.

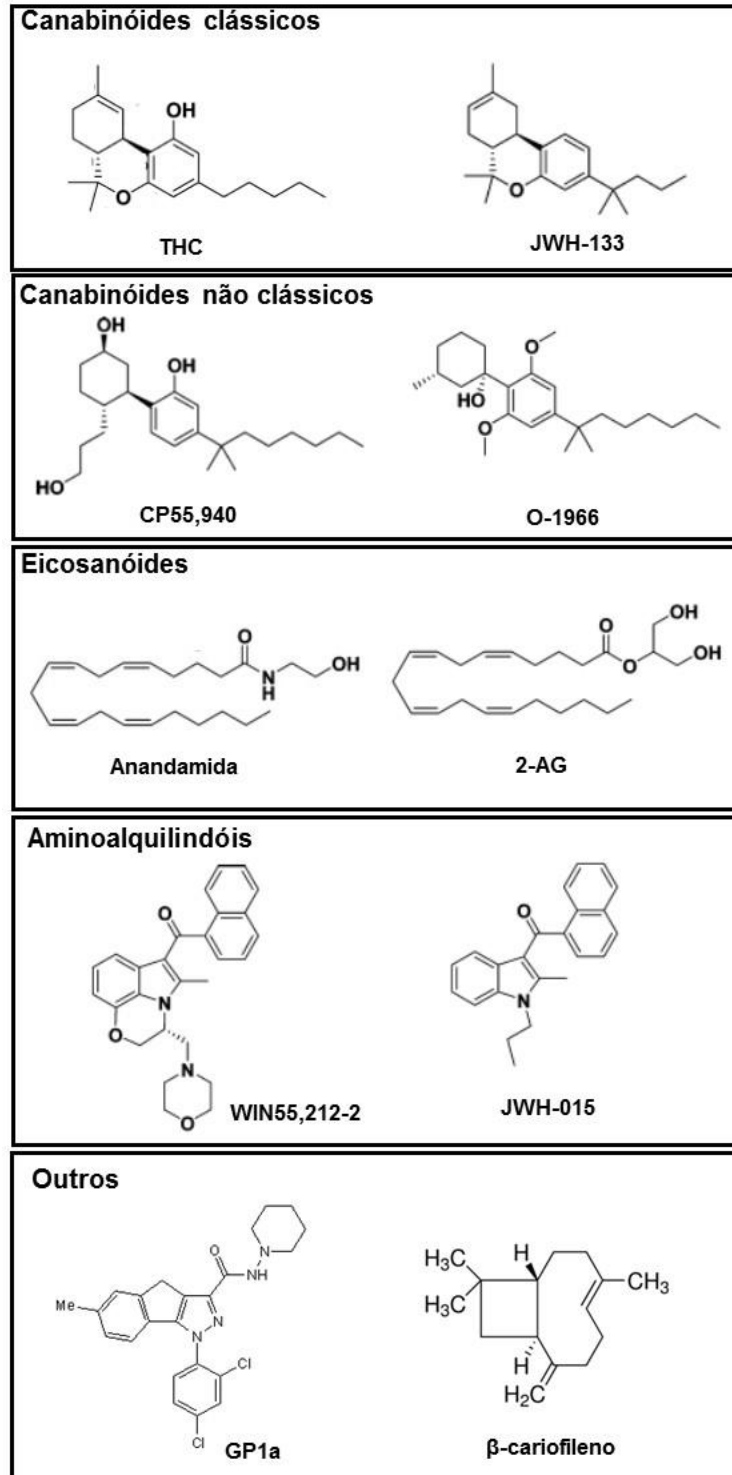


Figura 1.4 Estrutura química de alguns representantes dos grupos canabinóides. Adaptado de (171)

1.3.2 Agonistas dos receptores CB2 na inflamação

1.3.2.1 Agonistas sintéticos

Dentre os canabinoides sintéticos seletivos para CB2, o JWH-133 e o JWH-015 são amplamente utilizados em modelos experimentais de inflamação (147, 172-176). Além destes compostos, novas séries de agonistas sintéticos CB2 vem sendo sintetizadas (141), incluindo os tricíclicos pirazólicos (143, 144). O GP1a é um dos primeiros tricíclicos pirazólicos que foi descrito com atividade agonista para o receptor CB2. Esta molécula possui alta afinidade e seletividade, sendo em torno de 10.000 vezes mais seletiva para o CB2 em relação ao CB1 ($CB_{2/1}$ $K_i = 0.037/363$ nM) (143).

Nos últimos anos, alguns estudos demonstraram o efeito desses agonistas em diferentes modelos experimentais de inflamação, como colite, sepse, artrite, peritonite, uveíte e isquemia cerebral (125, 171-173, 177-179). Esses compostos têm grande potencial anti-inflamatório, inibindo a migração de leucócitos, e a produção de mediadores pró-inflamatórios *in vivo* e *in vitro*. Dados da literatura demonstram que o JHW-133 inibe a migração de neutrófilos durante a isquemia cerebral (173) e também reduziu o influxo de células mononucleares, como linfócitos T e células NK na colite experimental (172). O outro agonista, GP1a também inibe a migração de linfócitos T, macrófagos e micróglia, além de reduzir a diferenciação de linfócitos Th1/Th17 no SNC em um modelo de encefalomielite (180). O GP1a também inibiu a migração de neutrófilos na sepse experimental induzida por CLP e apresentou um potencial antimicrobiano, por reduzir a carga bacteriana no pulmão dos animais (177). Em adição, tem sido demonstrado que GP1a é capaz de inibir a migração de células dendríticas (CDs) para os linfonodos poplíteos de camundongos, por reduzir a produção de MMP9 (181).

Um dos possíveis mecanismos celulares pelo qual a ativação de CB2 inibe a migração celular pode ser devido a fatores associados com a interação leucócito-endotélio. Através da microscopia intravital, Ramirez e colaboradores (174) demonstraram que camundongos estimulados com LPS e tratados com agonistas seletivos CB2, JWH-133 ou O-1966, apresentaram uma redução na interação leucócito-endotélio no cérebro. Esses efeitos inibitórios foram confirmados em

estudos *in vitro* como o de quimiotaxia, transmigração e adesão celular. Já foi demonstrado que o pré-tratamento de monócitos/macrófagos murinos com O-2137 ou JWH-015 inibe a quimiotaxia induzida por RANTES/CCL5 e CCL2/CCL3, respectivamente (175, 182). De maneira similar, em um ensaio de transmigração, o JWH-015 reduz a quimiotaxia de micróglia ativada com LPS em direção a adenosina difosfato (183), como também a quimiotaxia de linfócitos T induzida por CXCL12 (184). Além de células mononucleares, o JWH-015 impede a migração de neutrófilos em direção ao estímulo quimiotático CXCL2 e fMLP (173, 176). Em adição, tem sido evidenciado alguns dos mecanismos moleculares que contribuem no entendimento das ações desempenhados pelos agonistas CB2 na migração celular. Foi demonstrado que monócitos humanos tratados com JWH-015 tiveram uma redução na expressão de receptores de quimiocinas, CCR2 e CCR1 (175), e uma inibição na ativação das integrinas LFA-1 e VLA-4 (185). Já em neutrófilos, a redução da quimiotaxia pode estar relacionada com a inibição da atividade da RhoA (uma proteína envolvida na reorganização do citoesqueleto de actina) (176) e com a ativação da MAPK p38 (173).

Além do efeito direto desses agonistas sobre os leucócitos, essas substâncias podem modular a ativação das células endoteliais, uma vez que os receptores CB2 também são expressos nestas células (186, 187). O pré-tratamento de células endoteliais com JWH-015, JWH-133 ou O-1966 inibe a adesão e transmigração de monócitos, provavelmente por reduzir a expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1 e VCAM-1 na superfície das células endoteliais (174, 187). Os estudos apresentados, demonstram claramente que a ativação de CB2 inibe a migração celular tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Em adição aos efeitos sobre a migração celular, os agonistas canabinoides modulam a produção de mediadores pró-inflamatórios. O JWH-133 reduz a produção de IL-12 e IL-23, e induz aumento na produção de IL-10 por micróglia (152, 153) e por macrófagos murinos ativados por LPS e IFN- γ (151).

1.3.2.2 O fitocanabinoide β -cariofileno

O β -cariofileno (BCP) é um sesquiterpeno encontrado no óleo essencial de diversas espécies vegetais, como maconha (*Cannabis sativa*), orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), copaíba (*Copaifera sp*), erva baleeira

(*Cordia verbenacea*) e da pimenta do reino (*Piper nigrum*) (139, 188-190). O BCP é um agonista seletivo do receptor canabinoide CB2 ($K_i = 155$ nM), embora a sua estrutura química, bicíclica com um anel ciclobutano o diferencia totalmente da estrutura dos canabinoides clássicos (139). O BCP tem se destacado por apresentar diversos efeitos biológicos, como antioxidante, analgésico, antiviral, ansiolítico, anestésico, anticarcinogênico e também anti-inflamatório em modelos experimentais (139, 191-198).

Na inflamação, tem sido descrito que este sesquiterpeno é capaz de modular a migração celular, a produção de mediadores pro-inflamatórios e a ativação de vias de sinalização intracelular. Foi demonstrado que o BCP inibe principalmente o influxo de neutrófilos para o sítio inflamatório, nos modelos experimentais de colite, edema de pata e inflamação renal (198-202). Além disso, na colite, o BCP reduziu a atividade enzimática da N-acetilglucosaminidase (NAG), a qual é um marcador do acúmulo de macrófagos no sítio inflamado (198, 202). Além da migração celular, o BCP também modula a produção de mediadores em processos inflamatórios induzidos por diferentes agentes. Na colite, o BCP inibiu a expressão do RNA mensageiro e os níveis protéicos de TNF- α , IL-1 β , KC e IFN- γ e reduziu a ativação de ERK1/2 e dos fatores de transcrição, NF- κ B e CREB (198). O BCP também foi capaz de inibir a produção de PGE₂ e a expressão de iNOS e COX-2 no edema de pata induzido pela carragenina (200), além de inibir a produção de NO e espécies reativas de oxigênio na artrite experimental induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA) (203). Os estudos *in vitro*, demonstraram que o BCP é capaz de inibir a ativação de macrófagos, monócitos e micróglia induzida por LPS ao reduzir a produção de citocinas e quimiocinas (como CXCL1/KC, MIP-2, TNF- α , IL-1 β), a fosforilação das MAPKs e ativação do NF- κ B (139, 198, 204).

Embora o efeito anti-inflamatório do BCP tenha sido evidenciado em diferentes modelos de inflamação, não existem estudos que descrevam a sua ação ou de outros agonistas do receptor CB2 na resposta inflamatória causada por micobactérias. A inflamação causada por essas bactérias, incluindo o *M. bovis*, ativa diferentes vias intracelulares, e resulta em diversos eventos inflamatórios. Assim, o estudo de substâncias com atividade imunomoduladora no processo inflamatório induzido por micobactérias, possibilita a identificação de mecanismos de ação ainda não descritos para uma determinada substância. Dessa forma, ressalta-se a

importancia de trabalhos que investiguem a ação de agonistas CB2 no processo inflamatório induzido pelo *Micobacterium sp.*, contribuindo para identificação de novos agentes que possam modular a inflamação causada por essas bactérias.

2 JUSTIFICATIVA

A inflamação exacerbada contribui para a patologia da TB. A intensa migração de neutrófilos para o pulmão tem sido associada ao dano tecidual, aumento da carga bacteriana e redução na sobrevivência de animais em modelos experimentais de TB. Em adição, eventos inflamatórios induzidos pela micobactéria, como a formação de corpúsculos lipídicos que contribuem para a persistência do patógeno no hospedeiro. Estes fatores evidenciam a necessidade de modular a resposta inflamatória durante a infecção micobacteriana.

Recentemente, vem sendo discutido uma nova estratégia de tratamento da doença adjunta ao uso de antibióticos, a terapia direcionada ao hospedeiro (TDH). A TDH para TB objetiva modular as vias inflamatórias a fim de reduzir a inflamação exacerbada e o dano tecidual; e também, contribuir com os mecanismos efetores da resposta imune inata e adaptativa, enquanto os antibióticos matam a micobactéria (205, 206). Neste contexto, estudos com abordagem farmacológica que visam investigar os efeitos de substâncias com potencial imunomodulador no processo inflamatório causado por micobactérias representam uma oportunidade de descoberta de moléculas que podem contribuir com a terapia convencional da TB.

Os agonistas naturais e sintéticos do receptor canabinoide CB2 são substâncias com um grande potencial imunomodulador e vêm sendo amplamente explorados como agentes anti-inflamatórios em diversos modelos experimentais. No entanto, a ação de canabinoides na resposta inflamatória induzida por bactérias tem sido pouco explorada e não há relatos na literatura que demonstrem o seu papel na inflamação induzida por micobactérias.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Estudar o efeito anti-inflamatório e o mecanismo de ação do fitocanabinoide β -cariofileno (BCP) e do canabinoide sintético GP1a na resposta induzida pelo *M. bovis* BCG.

3.2 *Objetivos específicos*

1. Avaliar o efeito do BCP *in vivo* nos modelos de pleurisia e inflamação pulmonar induzidos pelo BCG.
2. Estudar o efeito do BCP *in vitro*, avaliando sua ação em neutrófilos.
3. Estudar o efeito do GP1a *in vitro*, avaliando sua ação em macrófagos estimulados pelo BCG.
4. Investigar a ação do GP1a na sinalização intracelular de macrófagos estimulados pelo BCG.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6, machos, pesando entre 18 e 25 g, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Farmacologia Aplicada de Farmanguinhos até o momento do uso, com temperatura controlada de 23° C ± 2° C, livre acesso à água e ração e sendo submetidos a um ciclo de 12 h de claro/escuro. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA, FIOCRUZ), sob licença número LW 052/08 e de acordo com as recomendações da *International Association for the Study of Pain* (207).

4.2 Anticorpos e reagentes

β-carofileno, ácido etileno diamino-tetra acético (EDTA), ácido etilenodiaminotetracético de etilenoglicol (EGTA), acrilamida, azul de bromofenol, bisacrilamida, coquetel de inibidores de protease, cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio (MgCl₂), cloreto de potássio (KCl), dexametasona, dimetilsulfóxido (DMSO), ditioeritrol (DTT), RPMI-1640 (*Roosevelt Park Memorial Institute*), dodecil sulfato de sódio (SDS), fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF), glicerol, ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-etanosulfônico (HEPES), LPS (de *E. coli* O111:B4), 2-mercaptoetanol, nitrito de sódio, persulfato de amônio (APS), salina tamponada com fosfato (PBS), HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) trisaminometano (Tris, Trizma[®]), Tween 20, cacodilato de sódio, tiocarbohidrazida (THC), Triton X-100, faloidina TRITC, albumina sérica bovina (BSA), inibidor de protease e fosfatase e ambos os reagentes, sulfonilamida e naftiletlenodiamina utilizados para a preparação da solução de Greiss foram adquiridos da *Sigma Aldrich* (EUA). DAPI e meio de montagem foram obtidas da *Vector Laboratories* (EUA). Soro fetal bovino (SFB) e *Nonidet* (N)P-40 foram adquiridos da *Gibco/Life Technologies* (EUA). GP1a foi adquirida da *Tocris* (Reino Unido). Os pares de anticorpos para o ELISA foram

adquiridos da *R&D Systems* (EUA). Kits de EIA para dosagem de PGE₂ e LTB₄ foram adquiridos da *Cayman Chemical Company* (EUA). *Hyperfilm*, membrana de PVDF *Hybound* e reagente ECL[®] *Plus* (*Enhanced chemiluminescence, Pierce*) foram adquiridos da *Amershan Biosciences* (Reino Unido). Anticorpos monoclonais de cabra anti-COX-2 murina e de camundongo anti- α -tubulina murina foram obtidos da Santa Cruz *Biotechnologies* (EUA). Os anticorpos monoclonais murinos acoplados a fluorocromos: anti- CD11b/CD18 (FITC); anti-Ly6G (1A8) (PE); anti-CD3 (FITC), anti-CD8 (PerCP), anti-CD4 (APC) e anti-TCR $\gamma\delta$ (APC-Cy) foram adquiridos de BD *Pharmigen* (EUA). Anticorpos monoclonais de coelho anti-fosfo-p38, anti-p38, anti-fosfo-ERK1/2, anti-ERK1/2, anti- fosfo-JNK, anti-JNK, anti-fosfo-CREB, anti-CREB, anti-PPAR γ , anti-NF- κ B murina e o kit para dosagem de AMP cíclico foram obtidos da *Cell Signalling Technology* (EUA). Anticorpos anti-imunoglobulina (Ig)G de camundongo, de cabra e de coelho conjugados a peroxidase (HRP) foram obtidos da *Enzo Life Sciences* (EUA). *Isoton* foi obtido da *Coulter* (EUA). Solução de *Giemsa*, *May Grünwald* e *Entellan*[®] foram adquiridas da Merck (Alemanha). Dexametasona (*Decadron*[®], 4 mg/ml - Brasil), pentobarbital sódico 3 % (*Hypnot*[®] - *Synthec*, Brasil), cloridrato de xilazina 2 % (*Xilazin*[®] - *Synthec*, Brasil) e cloridrato de quetamina 10 % (*Cetamin*[®] - *Synthec*, Brasil) foram obtidos comercialmente.

4.3 Mycobacterium bovis *Bacilo Calmette-Guérin* (BCG)

Para os estudos *in vivo*, foi utilizado o *M. bovis* BCG (cepa Moreau) da marca ImunoBCG[®] (Fundação Athaúfo de Paiva, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) obtidos comercialmente. O líófilo foi ressuspendido em salina estéril. Para estimulação de macrófagos *in vitro*, foi utilizado o *M. bovis* BCG (cepa Moreau) na forma de vacina liofilizada que foi gentilmente fornecida pela Fundação Athaúfo de Paiva (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e estocada a 4 °C. Previamente aos ensaios, as ampolas de BCG vacinal foram irradiadas com uma dose de 100.000 rads em um irradiador de céσιο-137 (Marca: Cis, Modelo: IBL, número de série: 94460, com atividade atual de 200 rads/min) localizado no Laboratório de Farmacologia Aplicada de Farmanguinhos (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O conteúdo das ampolas foi ressuspendido em meio de cultura (RPMI) antes de sua utilização nos experimentos *in vitro* com macrófagos murinos.

4.4 Tratamento in vivo

Após 12 h de jejum, os animais foram tratados com o β -cariofileno (BCP) em doses que variaram de 0,5 a 500 mg/kg, via oral (v.o.), 1 h antes da indução da pleurisia por BCG. Na inflamação pulmonar, o BCP (50 mg/kg) foi administrado por v.o. 1 h antes e 24 h depois da instilação intranasal (i.n.) com o BCG. Os animais do grupo controle receberam 200 μ l do veículo (água filtrada contendo 2% de DMSO) por v.o. em ambos os modelos. A dexametasona (Dex, 2 mg/kg) foi utilizada como anti-inflamatório de referência e foi administrada por via intraperitoneal (i.p). Em adição, foi utilizado o GP1a (10 mg/kg, i.p) foi usado para avaliar a ação de um agonista canabinoide seletivo do receptor CB₂ na reação inflamatória induzida pelo BCG. A Dex ou GP1a foram administradas 1 h antes do estímulo em um volume final de 100 μ l de salina estéril.

4.5 Pleurisia induzida por BCG

A pleurisia induzida por BCG foi realizada como descrito por Menezes-de-Lima-Junior e colaboradores (78). A técnica utiliza um cursor que permite a introdução de aproximadamente 2 mm de uma agulha (13 x 5 gauge) no interior do lado direito da cavidade torácica dos camundongos. Foram inoculados 100 μ l de solução salina contendo 4×10^5 UFC de BCG. Os animais controles foram injetados com o mesmo volume de salina estéril. Após 6 ou 24 h, os camundongos foram submetidos à eutanásia com excesso de anestésico (0,2 ml de pentobarbital sódico 3 % Hypnol[®]), sendo posteriormente suas cavidades pleurais expostas e lavadas com 0,5 ml de solução salina tamponada (PBS) contendo EDTA (10 mM).

4.6 Inflamação pulmonar induzida por BCG

Os animais foram anestesiados com a combinação de quetamina (35 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) e instilados com BCG (1×10^6 UFC; i.n.). A migração foi avaliada em 1, 2, 7 ou 15 dias após o estímulo através do lavado broncoalveolar (BAL). Para coleta do BAL, os animais foram submetidos à eutanásia por overdose de anestésico (0,2 mL pentobarbital sódico 3 % - Hypnol[®]). Em seguida, foram

traqueostomizados e uma cânula de polietileno foi inserida ao longo da traqueia e 0,8 ml de PBS contendo EDTA 10 mM foi injetado por duas vezes, totalizando um volume de 1,6 ml de BAL.

4.6.1 Contagem total e diferencial de leucócitos

Os lavados, pleural e broncoalveolar, foram centrifugados a 400 x g por 10 min e os sobrenadantes livres de células foram recolhidos e estocados -80 °C para futuras análises. O *pellet* de células foi acrescido de 0,5 ml de PBS e em seguida foi realizada a contagem total e diferencial de leucócitos.

A contagem total de leucócitos foi realizada em um contador automático de partículas (*Counter Z1, Beckman-Coulter Inc.*, EUA) com uma diluição 1:200 em uma solução isotônica tamponada (ISOTON[®], Beckman Coulter). Para a diferenciação dos leucócitos, 1×10^5 células foram aderidas às lâminas de vidro, após citocentrifugação a 450 rpm, por 5 min (*Cytospin, Shandon Inc.*, EUA). Em seguida, as células foram coradas pelo método de *May-Grünwald-Giemsa*. De acordo com este método, as lâminas ficam imersas em May-Grunwald por 5 minutos, para fixação e coloração de grânulos celulares, 3 minutos em água para retirada do excesso de corante e 15 minutos em Giemsa, para corar o núcleo. A contagem foi realizada em microscópio óptico (*Olympus BX41*, Japão) com objetiva de imersão em óleo, com aumento de 100 x.

4.7 Isolamento de neutrófilos da medula óssea de camundongos

Os camundongos foram submetidos à eutanásia com excesso de anestésico (0,2 ml de pentobarbital sódico 3 %) e seus fêmures e tíbias de ambas as patas traseiras foram dissecados e removidos. A extremidade distal dos ossos foram removidas e cada fêmur e tíbia foi lavado com 2 ml de Hank's sem Ca^{+2} e Mg^{+2} com 1,8 % de citrato de sódio. Em seguida, a suspensão de células foi centrifugada a 400 x g durante 15 min a 22° C e ressuspensa em 2 ml de Hank's sem Ca^{+2} e Mg^{+2} .

Os polimorfonucleares foram obtidos por meio de separação em gradiente constituídos por soluções a 72 e 65 % de *Percoll*. Para isso, as células foram centrifugadas a 1200 x g durante 35 min sem aceleração e desaceleração, em

temperatura ambiente. A camada de células mononucleares, sobre a solução de *Percoll* a 65 % foi descartada e os polimorfonucleares foram recolhidos na interface entre a solução de 72 e 65 % de *Percoll* e lavados duas vezes com Hank's sem Ca^{+2} e Mg^{+2} . A contagem do número de células foi realizada em câmara de Neubauer e a pureza dos neutrófilos foi feita a partir de citoesfregaço em lâminas de vidro após a coloração com solução de *May-Grünwald* e *Giemsa* (> 90 % de pureza).

4.8 Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos

Para avaliar o efeito do BCP na resposta quimiotática de neutrófilos de medula *in vitro* foi utilizado o sistema de câmara de *Boyden* de 48 poços (*Neuroprobe Inc.*, EUA). Esta câmara é composta por dois compartimentos separados por uma membrana: o compartimento superior (onde é depositada a suspensão de células) e o compartimento inferior (onde é colocado o estímulo quimiotático).

Os poços inferiores foram preenchidos com 29 μl do estímulo quimioatraente, LTB_4 (10^{-7} M) ou meio RPMI-1640 (controle), e os poços superiores foram preenchidos com neutrófilos em meio RPMI (10^5 células/poço; 50 μl) previamente tratados com BCP (1, 10 e 100 μM) ou dexametasona (0,05 μM) por 1 h a 37 °C. Os poços foram separados por uma membrana de policarbonato de 5 μm (*Nuclepore*, *Sigma Aldrich*, EUA). A câmara foi incubada em uma estufa umidificada com uma atmosfera controlada de 37° C e 5 % de CO_2 durante 1 h. Em seguida, a membrana de policarbonato foi corada com solução de *May-Grünwald* e *Giemsa*. As células que migraram completamente através da membrana foram contadas por microscopia (aumento de 100 x). A quimiotaxia dos neutrófilos foi calculada e expressa como a média do número de células que migraram em quinze campos aleatórios por poço de quatro replicatas por grupo. A viabilidade dos neutrófilos (tratados ou não com as substâncias, BCP e Dex) foi verificada através do corante Azul de Tripán previamente aos ensaios.

4.9 Ensaio de adesão de neutrófilos

Células endoteliais murinas (tEnd.1) foram plaqueadas em câmaras de cultura de 4 poços (10^4 células/poço) (*Lab-Tek® chambers, Nunc/Thermo Fisher Scientific*, EUA) por 24 h (5 % de CO_2 à 37°C). As células tEnd.1 foram estimuladas com a proteína recombinante murina TNF- α (10 ng/ml) ou incubadas com meio durante 4 h. Em seguida o estímulo foi retirado e as células endoteliais foram lavadas 3 x com PBS (1 x). Os neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos foram pré-tratados com BCP (10 μM) ou apenas com meio durante 1 h a 37°C e então foram adicionados sobre as células tEnd.1 (50 neutrófilos/tEnd.1) por 1 h a 37°C sob agitação. As células que não aderiram foram gentilmente retiradas através de três lavagens repetidas com PBS (1 x). As células aderidas foram fixadas e coradas com *May-Grünwald-Giemsa* e visualizadas em microscópio de luz (100 x, *Olympus BX41*, Japão). O número de neutrófilos aderidos por célula tEnd.1 foi determinado por contagem direta. Os dados foram expressos como um índice de adesão (IA), calculado como segue: $\text{IA} = (\text{tEnd.1 com neutrófilos ligados}) / (\text{número total de células tEnd.1}) \times (\text{neutrófilos ligados às células tEnd.1}) / (\text{número de tEnd.1 totais} \times 100)$.

4.10 Ensaio de polimerização do citoesqueleto de actina

Neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos foram pré-tratados com BCP (10 μM) ou GP1a (10 μM) por 1 h a 37°C em RPMI. Em seguida, as células foram estimuladas com LTB₄ (10^{-7} M) por 5 min. A reação foi interrompida com a adição de paraformaldeído 2 % seguida pela fixação dos neutrófilos em lâminas de vidro (10^5 neutrófilos/lâmina) por citocentrifugação (*Cytospin 3, Shandon Inc.*, EUA, 450 rpm, 5 min). Após a centrifugação, os neutrófilos foram novamente fixados durante 20 min com *paraformaldeído* 4 % em PBS (1 x). Em sequência, as lâminas foram lavadas em PBS (1 x) e as células permeabilizadas com 0,25 % de *Triton X-100* (em PBS/BSA 4 %) por 30 min e incubadas com Faloidina-TRITC (1:500 em PBS/BSA 4 %) por 30 min. Para a marcação dos núcleos as lâminas foram incubadas com DAPI (1:10000) por 5 min. As lâminas foram montadas com *Vecta Shield* e seladas com esmalte incolor. As lâminas foram montadas com *Vecta Shield*

e seladas com esmalte incolor. As imagens foram capturadas de cinco campos distintos de cada lâmina e analisadas em microscópio de fluorescência (100 x, *Nikon Inc.*, EUA). A média de intensidade de fluorescência (MIF) foi determinada pela medição de fluorescência individual de cada célula nas imagens obtidas usando *NIS-Elements Software 4.2* (*Nikon*, Japão).

4.11 Citometria de fluxo

As células recolhidas da cavidade pleural foram plaqueadas (1×10^6 células/poço) em uma placa de 96 poços com fundo em “U” e centrifugadas (400 x g por 2 min). Os *pellets* foram ressuspensos em 100 µl de PBS contendo 0,1 % de azida sódica (PBS-Azida), 10 % de SFB e *Fc Block* (anticorpo anti-CD16/CD32, 1:100) e incubados por 30 min a 4° C para o bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação. Após centrifugação as células foram incubadas (30 min, 4° C) com os anticorpos monoclonais acoplados a fluorescência: anti-CD11b/CD18 conjugado a FITC (1:100), anti-Ly6G conjugado a PE (1:100), anti-CD3 mAb conjugado a FITC, anti-CD8 conjugado a PerCP, anti-CD4 conjugado. Isótipos IgG foram utilizados como controle. Em seguida, as células foram lavadas uma vez com PBS-azida, centrifugadas e então ressuspensas em PBS-azida e transferidas para tubos tubo em *FACScalibur* (*Becton Dickinson*, EUA). A análise dos marcadores de superfície foi realizada utilizando o programa *Cell Quest* (*Becton Dickinson*, EUA). Os dados foram coletados e expressos em uma escala log de intensidade de fluorescência e apresentados como *dot plots* ou histogramas. O percentual da população de linfócitos CD3⁺ (e seus subtipos) e neutrófilos Ly6G⁺CD11b⁺ foi em uma região física de acordo com tamanho e granulosidade das células. Os números de linfócitos e neutrófilos foram representados como número de células por cavidade após a multiplicação do percentual da população estudada pelo número total de leucócitos.

4.12 Cultura de células de linhagem

Macrófagos murinos da linhagem J774A.1 e células murinas de endotélio tímico (tEnd.1) foram descongelados em banho maria a 37° C, e posteriormente adicionados em meio RPMI-1640 suplementado (10 % de SFB e 0,05 mg/ml de

gentamicina). Os macrófagos foram cultivados por 7 dias em garrafas de 25 cm³, mantidos em estufa com 5 % de CO₂ à 37° C. A troca do meio foi realizada a cada 48 h.

4.13 Ensaio de citotoxicidade

O efeito do GP1a na viabilidade de macrófagos foi determinado pelo ensaio de atividade metabólica mitocondrial utilizando o (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (MTT). Este método avalia a atividade mitocondrial das células viáveis em metabolizar sais de tetrazólio em cristais de formazan.

Macrófagos viáveis foram plaqueados em placas de 96 poços com fundo chato (1 × 10⁵ células/poço, em quadruplicata) e acondicionadas em estufa com 5 % de CO₂ a 37 °C. Após 24 h, as células foram incubadas com diferentes concentrações de GP1a (0,1 – 10 µM) ou apenas com meio e DMSO 0,01 % por 20 h. Após a incubação foram adicionados 22,5 µl de MTT (5 mg/ml) em cada poço. Após 4 h de incubação, as placas foram centrifugadas a 2000 rpm por 2 min e os sobrenadantes foram descartados. Em seguida, foi adicionado 150 µl de DMSO em cada poço para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi mensurada a 540 nm por um espectrofotômetro (*Spectramax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA*). O *Tween 20* (3 %) foi utilizado como controle positivo de indução de morte celular. As concentrações de BCP e GP1a que induziram ≥ 10 % de morte celular foram consideradas citotóxicas e não foram utilizadas nos ensaios biológicos.

4.14 Tratamento e estimulação de macrófagos com BCG

Macrófagos murinos J774A.1 (10⁵ células/poço) foram plaqueados em placas de cultura de 24 poços em meio RPMI-1640 suplementado (0,5 ml/poço) e acondicionados em estufa com 5 % de CO₂ à 37° C. Após 24 h, as células foram submetidas ao estímulo e ao tratamento com os compostos de interesse, como apresentado abaixo.

4.14.1 Pré-tratamento

As células foram incubadas com diferentes concentrações do GP1a (0,1, 1, 10 e 100 μM), rosiglitazona (10 μM) ou dexametasona (0,05 μM) durante 30 min. Logo após, foi adicionado 3×10^5 UFC de BCG em cada poço (MOI 3:1) por 1 h, seguido por 3 lavagens com PBS para retirada das bactérias não fagocitadas. Após as lavagens, um novo meio suplementado (0,5 ml/poço) foi adicionado em cada poço. Após 24 h, os sobrenadantes foram recolhidos e centrifugados (400 x g por 10 min a 4° C) para dosagem de citocinas.

4.14.2 Pós-tratamento

As células foram estimuladas com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 3:1, ou seja, 3×10^5 UFC de BCG em cada poço por 6 h, seguido por 3 lavagens com PBS para retirada das bactérias não fagocitadas. Após as lavagens, as células foram incubadas com GP1a (10 μM), dexametasona (0,05 μM), ou veículo (RPMI com DMSO 0,05 %) em um volume de 0,5 ml/poço. Após 24 h, os sobrenadantes foram recolhidos e centrifugados (1200 rpm por 10 min a 4° C) para dosagem de citocinas e quimiocinas.

4.15 *Corpúsculos lipídicos*

A marcação de corpúsculos lipídicos (CLs) foi realizada em leucócitos obtidos do BAL e macrófagos J774A.1 por coloração de tetróxido de ósmio. As células obtidas do BAL de animais tratados ou não com BCP, foram aderidas em lâminas de vidro após citocentrifugação (ver item 4.6.1). Em seguida, as células foram fixadas com formalina (3,7 %, pH 7,4) e ao redor destas fez-se um círculo com uma caneta hidrofóbica para evitar o extravasamento dos reagentes. Os CLs foram corados com tetróxido de ósmio. Macrófagos murinos J774A.1 foram plaqueados em placa de 24 poços, previamente cobertos com lamínulas de vidro circulares estéreis (3 mm, *Glasscyto*®). Após 24 h, as células foram pré-tratadas e estimuladas, como descrito anteriormente (ver item 4.14.1) e fixadas com formalina ao final do experimento.

Para a coloração dos CLs, as lâminas e lamínulas foram lavadas com água destilada por duas vezes, para remoção da formalina. Logo após, foi adicionado sobre as células fixadas 5 gotas de tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,4) e uma gota de tetróxido de ósmio (1,5 % tampão cacodilato) e as lâminas foram incubadas por 30 min sob proteção de luz. Ao fim deste tempo, as lamínulas foram lavadas duas vezes com água destilada e incubadas por 3 min com tiocarbohidrazida (TCH, 50 mg em água). Em seguida, foram realizadas duas lavagens com água e as células foram incubadas novamente com 5 gotas de tampão cacodilato e 1 gota de tetróxido de ósmio por 5 min. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de microscopia com meio de montagem (*Entellan*[®]). Após a coloração, foi realizada a contagem dos CLs em microscópio óptico, com objetiva de 100 x (*Olympus*, BX41, Japão). Foram contadas 50 células em cada lamínula e cada grupo foi composto por quatro lamínulas (quadruplicata). A contagem de CLs foi expressa como número de CLs por célula.

4.16 Dosagem de citocinas

As concentrações de citocinas e quimiocinas foram avaliadas por ELISA sanduíche (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) usando pares de anticorpos correspondentes de acordo com as instruções do fabricante (*R&D System*, EUA). Placas de 96 poços (Nunc-Maxsorp[™], Thermo Scientific, EUA) foram incubadas a 4°C com a concentração ótima de anticorpos monoclonais purificados contra cada citocina analisada. Após 18 h, os poços foram lavados com 200 µL de uma solução de *tween* 20 a 0,05% diluído em PBS-tween. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com 200 µL de PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA). Posteriormente foi plaqueado 100 µL das amostras e da curva padrão (0,23-15 ng/mL). Decorridos 24 h a placa foi lavada e incubada com anticorpo de detecção. Após lavagens a placa foi incubada com estreptoavidina peroxidase e a revelação foi realizada após a adição de tampão citrato/perborato de sódio contendo OPD (500 µg/mL). A reação foi bloqueada pela adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄), 2 M, a leitura realizada por espectrofotometria (Spectra Max 190/Molecular Device) a 490 nm. O resultado foi expresso em pg/ml.

4.17 Quantificação de mediadores lipídicos

As concentrações de LTB₄ e PGE₂ foram mensuradas por EIA de acordo com as instruções do fabricante (*Cayman Chemical Co.* EUA). O ensaio foi realizado utilizando kits distintos mas que são realizados de maneira similar como segue: foram adicionados 50 µL/poço das amostras ou 50 µL/poço das soluções padrão diluídas em série de PGE₂ (1000-7,8 pg/mL) ou LTB₄ (500-3,9 pg/ml) em placas de 96 poços pré-revestidas com anticorpo IgG murino. Em seguida, foram adicionados o anticorpo contra PGE₂ ou LTB₄ (50 µL/poço) e a PGE₂ ou LTB₄ conjugados com colinesterase (50 µL/poço) e incubados durante cerca de 18 h em temperatura ambiente. Os poços correspondentes ao controle receberam somente o tampão de EIA e a PGE₂ ou LTB₄ conjugada com colinesterase (50 µL/poço). Após esta etapa, a placa foi lavada (5x) com tampão fosfato de potássio 0,01 M contendo “tween” 20 a 0,05%. Em seguida, foram adicionados 200 µL/poço do reagente de Elmmans (contém o substrato para a enzima colinesterase diluído em água deionizada, segundo instruções do fabricante) para revelação. A placa foi incubada sob agitação ao abrigo da luz até ocorrer a reação e lida em leitora de placa a 405 nm. Os dados foram analisados com auxílio de uma planilha disponibilizada pelo fabricante em <https://www.caymanchem.com/analysis/EIA>. O resultado foi expresso em pg/ml.

4.18 Dosagem de nitrito

O sobrenadante recolhido dos macrófagos J774A.1 que foram pré-tratados com diferentes concentrações do GP1a (10 µM) ou dexametasona (0,05 µM) e estimulados com BCG e IFN-γ (conforme descrito anteriormente) também foi utilizado para a dosagem da produção de óxido nítrico, de forma indireta pela produção de nitrito. Foi feita uma curva padrão, utilizando nitrito sódico em diluição seriada com sete pontos (100-1,56 µM) e o último o branco. Na placa de 96 poços foi adicionado 100 µL de cada amostra e então foram adicionados a todos os poços 100 µL de solução de Griess (solução 1:1 de sulfonilamida 1% em H₃PO₄ 5% e α-Naftiletilenodiamina 0,1% em água) para desenvolvimento de reação colorimétrica. A absorbância foi determinada a 540 nm em espectrofotômetro

4.19 Detecção das proteínas por western blotting

As proteínas foram obtidas a partir extratos celulares totais ou nucleares de macrófagos J774A.1 plaqueados em placas de 6 poços com uma densidade de 1×10^6 células/poço. Os macrófagos foram previamente incubados com GP1a (10 μ M) ou meio como descrito anteriormente (ver item 2.6.3.2) seguido pelo estímulo com BCG (MOI 3:1). O período de estímulo diferiu conforme a proteína investigada, como indicado nas figuras apresentadas na seção “Resultados”.

4.19.1 Obtenção de extrato total e nuclear

O extrato total foi obtido pela adição de 70 μ l de tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, 0,5 % de NP-40, PMSF 1 mM e inibidores de proteases e fosfatases 1 x) sob 10^6 células por poço (placa de 6 poços) mantidas no gelo por 15 min com agitação periódica. As células foram recolhidas com auxílio de *cell scraper*, sonicadas a 4 °C por 1 min seguido de centrifugação a 14000 rpm, 4° C por 10 min e em seguida foram recolhidos os sobrenadantes contendo as proteínas.

Para obtenção do extrato nuclear foi adicionado 1000 μ l de PBS gelado EDTA 1 mM (pH 7,4) em cada poço e as células foram recolhidas com auxílio de *cell scraper*. As amostras foram centrifugadas (400 x g, 4° C por 15 min). Os sobrenadantes foram desprezados e as células sedimentadas foram ressuspensas cuidadosamente em 100 μ l de *harvest buffer* gelado (HEPES 10 mM; NaCl 50 mM; EDTA 0,1 mM; *Triton X-100* 0,5 %, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, sacarose 0,5 M e coquetel de inibidores de protease e fosfatase 1 x; pH 7,9) e incubadas por 5 min no gelo. Nessa etapa foi verificada a integridade dos núcleos através da observação em microscópio óptico. Em sequência, as amostras foram centrifugadas (400 x g, 4° C por 15 min) e os sobrenadantes contendo as proteínas citoplasmáticas foram recolhidos. O *pellet* de núcleos foi ressuspensado em 50 μ l de tampão de lise nuclear (HEPES 10 mM, NaCl 500 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, NP-40 0,1 %, DTT 1 mM, PMSF 1 mM e inibidores de protease e fosfatase 1 x, pH 7,9) e sonicados a 4° C por 1 min. As amostras foram centrifugadas (14000 rpm, 4° C, 10 min) para eliminação de *debris* e os sobrenadantes recolhidos. As amostras contendo as

proteínas totais, citoplasmáticas e nucleares foram armazenadas a -80 °C e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de *Lowry*.

4.19.2 Eletroforese e imunomarcação

Os lisados celulares foram desnaturados em tampão de amostra *Laemmli* (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; SDS 1 %; 2-mercaptoetanol 5 %, glicerol 10 % e azul de bromofenol 0,001 %) e aquecidos a 90 °C por 5 min. As amostras de proteínas obtidas dos lisados totais ou nucleares (20 µg de proteína) foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE (em gel de poliacrilamida-SDS 10 %) e transferidos para membranas de PVDF, utilizando tampão de transferência (Tris 48 mM e Glicina 39 mM). A transferência foi realizada a uma amperagem constante de 328 mA, 15 V por 1 h em sistema semi-seco (*Trans-Blot Semi Dry*). Após a transferência, as membranas foram incubadas com solução bloqueadora de BSA 5 % em TBST (Tris-HCl a 50 mM, pH 7,4; NaCl a 150 mM; *Tween* 20 a 0,1 %) por 2 h à temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas (*overnight*, a 4 °C) com anticorpos primários murinos, produzidos em coelho para proteínas fosforiladas e não fosforiladas: p38, ERK1/2, JNK e CREB, todos foram utilizados em uma diluição de 1:1000. Outras membranas, também foram incubadas com anticorpos murinos anti-COX-2 e anti-histona (H3) produzidos em cabra (1:5000), anti-NFκB/p65 produzido em coelho (1:1000), anti-α-tubulina produzida em camundongo (1:5000). Em seguida, as membranas foram lavadas por 3 vezes com TBST e incubadas por 1 h à temperatura ambiente com os anticorpos secundários anti-IgG de cabra (1:5000) ou anti- IgG de coelho (1:10000) e anti- IgG de camundongo (1:10000), todos conjugados a HRP e diluídos em TBST/BSA 5 %. Após a incubação as membranas foram lavadas três vezes com TBST e duas vezes com TBS. A detecção foi feita usando o Sistema ECL e as membranas expostas a filme de autorradiografia. As bandas foram quantificadas por densitometria usando o *software Image J* (domínio público).

4.20 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente através do teste de análise da variância (ANOVA), seguido pelo teste de *Newman-Keuls-Student*. Valores de *P* inferiores ou iguais (\leq) a 0,05 foram considerados significativos (*;+).

5 RESULTADOS

PARTE I - Efeito do BCP na resposta inflamatória induzida pelo BCG

Na primeira parte deste trabalho, foi investigado o efeito do BCP na migração celular e na produção de mediadores inflamatórios, utilizando dois modelos de inflamação induzida pelo BCG, a pleurisia e a inflamação pulmonar. Em adição, foi evidenciado um dos mecanismos celulares pelo qual o BCP modula a migração de neutrófilos.

5.1 Efeito do BCP na migração de leucócitos durante a pleurisia induzida pelo BCG

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a migração de leucócitos na pleurisia induzida por BCG inicia-se nas primeiras horas após a infecção, atingindo o máximo em 24 h (66, 78). Para avaliar o efeito do BCP, camundongos C57BL/6 foram pré-tratados por via oral com diferentes doses de BCP (0,5-500 mg/kg) 1 h antes da indução da pleurisia pelo BCG. Conforme observado na Figura 5.1, a injeção i.t de BCG aumentou o número total de leucócitos na cavidade pleural devido ao influxo de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares. O pré-tratamento com BCP nas doses de 0,5 à 500 mg/kg inibiu o acúmulo dos leucócitos (Figura 5.1 A), principalmente de neutrófilos (Figura 5.1 B). A Figura 5.1 C mostra que o pré-tratamento com o BCP inibiu a migração de eosinófilos apenas na dose de 50 mg/kg. No entanto, nenhuma das doses testadas reduziu o número de células mononucleares (Figura 5.1 D). Baseado nesses resultados, juntamente com dados prévios da literatura relacionadas aos efeitos do BCP *in vivo* (198, 200), a dose de escolha utilizada nos demais experimentos foi de 50 mg/kg.

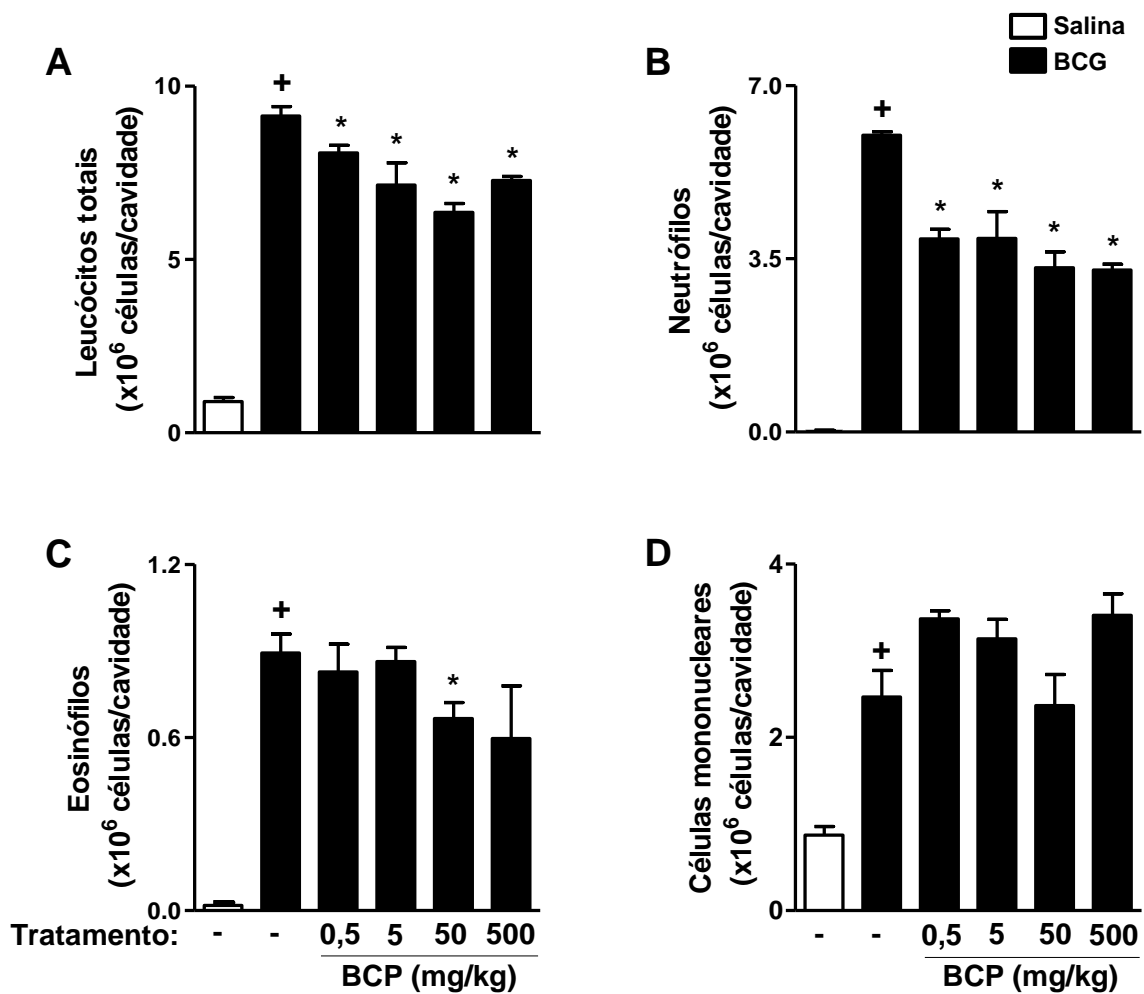


Figura 5.1. Avaliação dose-reposta do BCP na migração de leucócitos durante a pleurisia induzida pelo BCG. Camundongos foram pré-tratados com BCP (0,5-500 mg/kg, v.o..) 1 h antes da injeção i.t com BCG (4×10^5 UFC). Após 24 h, o lavado pleural foi coletado para análise do (A) número total de leucócitos, (B) neutrófilos, (C) eosinófilos e (D) células mononucleares. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 7 animais por grupo de um experimento. As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*). Os grupos controles tratados (v.o..) apenas com o veículo (água filtrada contendo 2% de DMSO) foram representados por (-).

Após a determinação da dose do BCP a ser utilizada, avaliamos o seu efeito em dois períodos de tempo distintos. Na Figura 5.2 observa-se que nos períodos de 6 e 24 horas após a injeção i.t. com BCG, ocorreu um acúmulo de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares. Em 6 h, o pré-tratamento com o BCP não interferiu no acúmulo de leucócitos na cavidade pleural induzido pelo BCG (Figura 5.2 A-D). Como esperado, a dexametasona, utilizada como anti-inflamatório de referência, inibiu a migração de leucócitos. Considerando que a atividade anti-inflamatória do BCP na pleurisia induzida por BCG esteja ocorrendo devido a sua ação agonista no receptor CB2, foi comparado o efeito deste fitocanabinoide com o GP1a (agonista sintético altamente seletivo para o receptor CB2). O GP1a, assim como o BCP não inibiu a migração de leucócitos em 6 h após na pleurisia induzida pelo BCG.

No entanto, em 24 horas após a injeção i.t. de BCG, o pré-tratamento com BCP reduziu o acúmulo de leucócitos na cavidade pleural (Figura 5.2 E). Esta redução de leucócitos foi referente apenas a migração de polimorfonucleares (Figura F e G), principalmente de neutrófilos. O GP1a apresentou efeitos similares ao BCP sobre a migração de neutrófilos (Figura F), mas não interferiu no acúmulo de eosinófilos (Figura G). Ambos os agonistas canabinoides não alteraram o acúmulo de células mononucleares na cavidade pleural (Figura H). A dexametasona inibiu o acúmulo de leucócitos na cavidade pleural 24 horas após o estímulo com BCG. Visto que o BCP apresentou potencial inibitório no período de 24 h, o seu efeito foi avaliado neste período de tempo, como será observado nos resultados seguintes.

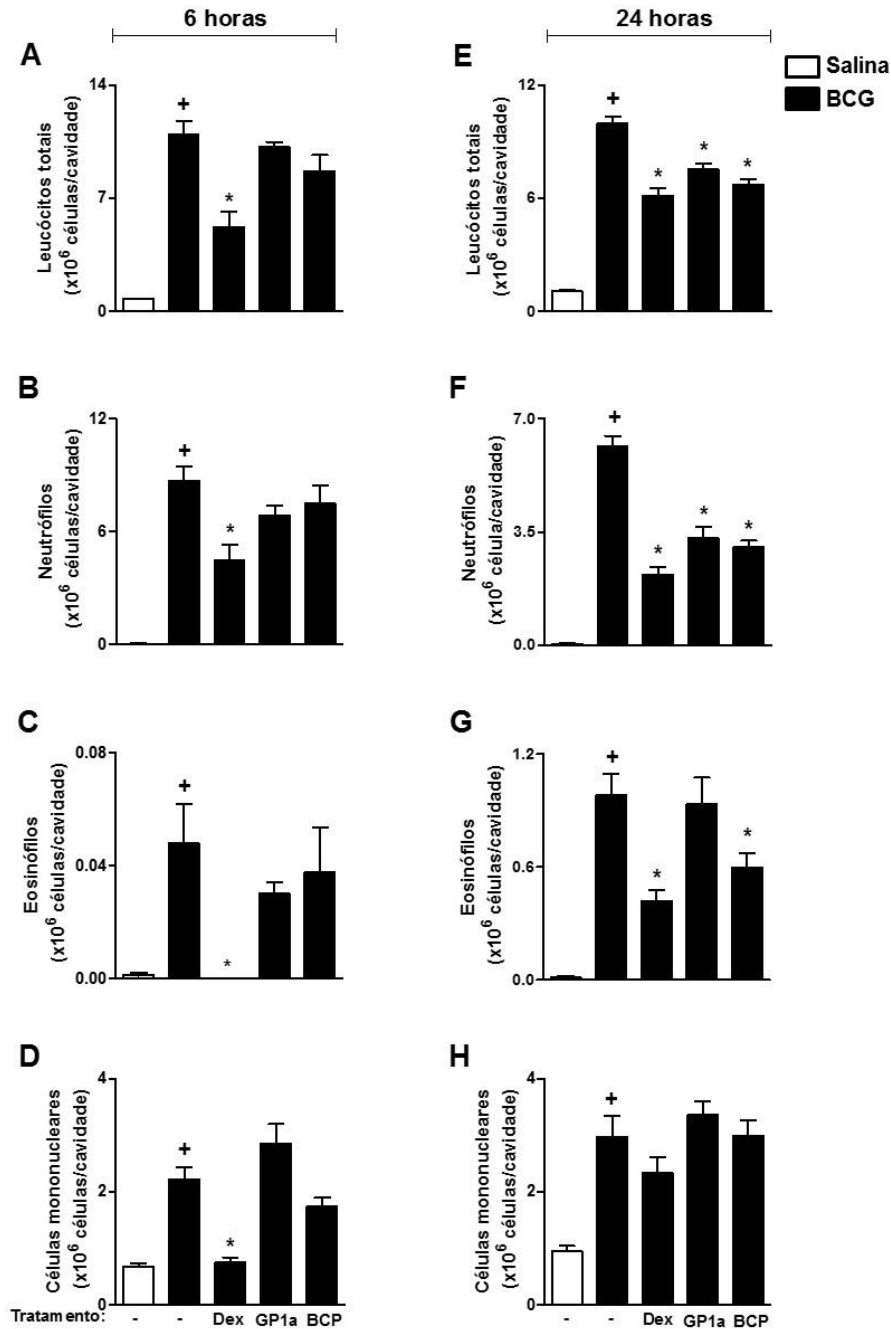


Figura 5.2. Efeito do pré-tratamento com BCP na migração celular em diferentes períodos de tempo na pleurisia induzida pelo BCG. Camundongos foram pré-tratados com BCP (50 mg/kg, v.o.), GP1a (10 mg/kg, i.p) ou dexametasona (Dex, 2 mg/kg, i.p) 1 h antes da injeção i.t. de BCG (4×10^5 UFC). Após 6 e 24 h, o lavado pleural foi coletado para análise do (A, E) número total de leucócitos, (B, F) neutrófilos, (C, G) eosinófilos e (D, H) células mononucleares. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 7 animais por grupo de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*). Os grupos controles tratados (v.o.) apenas com o veículo (água filtrada contendo 2% de DMSO) foram representados por (-).

Neutr3filos murinos expressam seletivamente a mol3cula Ly6G⁺ (208), e tem sido demonstrado que neutr3filos ativados aumentam a express3o da integrina CD11b (209, 210), que podem ser detectados por t3cnicas de imunofluoresc3ncia, incluindo o FACS. De acordo com os resultados apresentados anteriormente, nas Figuras 5.1 e 5.2, que demonstraram o aumento do n3mero de neutr3filos induzido pelo BCG e uma inibi3o da migra3o destas c3lulas pelo BCP, as Figuras 5.3 A e B demonstram que 24 h ap3s a inje3o i.t. de BCG ocorreu um aumento no n3mero de c3lulas expressando Ly6G e CD11b na cavidade pleural. O pr3-tratamento com BCP e GP1a reduziu a porcentagem de c3lulas Ly6G⁺/CD11b⁺. Em adi3o, foi analisado a m3dia de intensidade de fluoresc3ncia (MIF) do CD11b na superf3cie dos neutr3filos. Conforme observado nas Figuras 5.3 C e D, o tratamento com BCP, mas n3o com GP1a, reduziu o MIF de CD11b⁺ nas c3lulas Ly6G⁺. Em conjunto, estes resultados demonstram o potencial do BCP em inibir a migra3o de neutr3filos na inflama3o pleural induzida pelo BCG em camundongos.

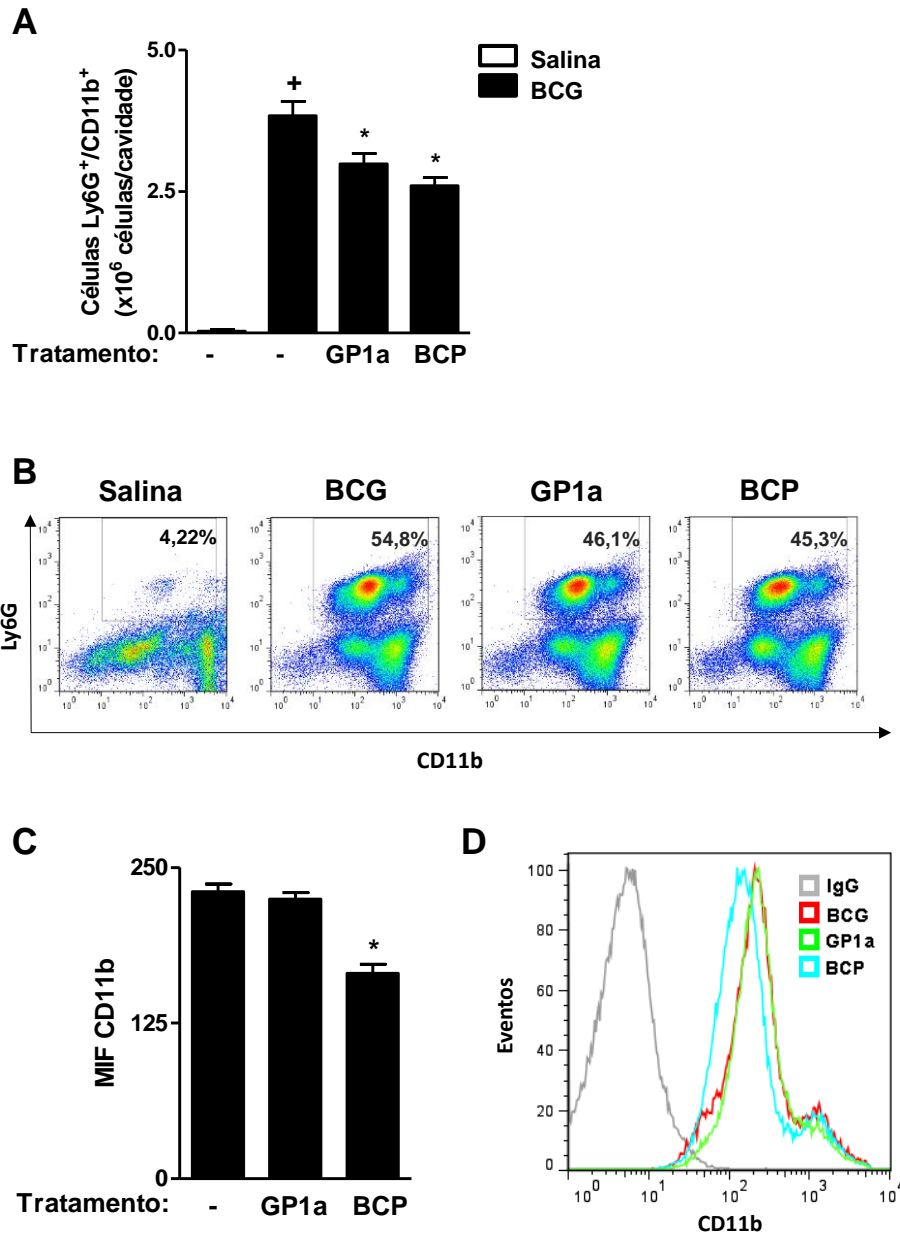


Figura 5.3 Efeito do BCP na migração de neutrófilos e na expressão de CD11b em células Ly6G⁺CD11b⁺. Camundongos foram pré-tratados com BCP (50 mg/kg, v.o.) ou GP1a (10 mg/kg, i.p) 1 h antes da injeção i.t. de BCG (4 x 10⁵ UFC). Após 24 horas as células da cavidade torácica foram recolhidas, marcadas com os anticorpos anti-Ly6G e anti-CD11b e analisadas por citometria de fluxo. (A) Os neutrófilos (Ly6G⁺CD11b⁺) foram representados como número de células por cavidade após a multiplicação do percentual da população estudada pelo número total de leucócitos. (B) *Dot plots* representativos da porcentagem de células Ly6G⁺/CD11b⁺ na cavidade pleural. (C) Média de intensidade de fluorescência (MIF) da expressão de CD11b em neutrófilos Ly6G⁺/CD11b⁺. (D) Histograma representativo da expressão de CD11b. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de 7 animais por grupo de um experimento. As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*). Os grupos controles tratados (v.o.) apenas com o veículo (água filtrada contendo 2% de DMSO) foram representados por (-).

Já foi demonstrado que em adição as células mielóides, a pleurisia por BCG também induz o acúmulo pleural de linfócitos T (66). Desta forma, foi avaliado o efeito do BCP no acúmulo de linfócitos T CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e $\gamma\delta$ ⁺. Na Figura 5.4, observa-se que a injeção i.t de BCG induziu um acúmulo de linfócitos T CD3⁺ na cavidade pleural 24 h após o estímulo com BCG. O pré-tratamento com BCP (50 mg/kg) ou GP1a (10 mg/kg) não foi capaz de interferir no acúmulo de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ ou TCR $\gamma\delta$ ⁺ na cavidade pleural (Figura 5.4 A-C). Ao lado de gráfico é mostrado o seus respectivos *dot plots* representativos obtidos da análise. A porcentagem demonstrada nos quadrantes é em relação ao número total de células adquiridas. Esses dados confirma os resultados observados anteriormente que demonstraram que BCP não altera a migração de células mononucleares.

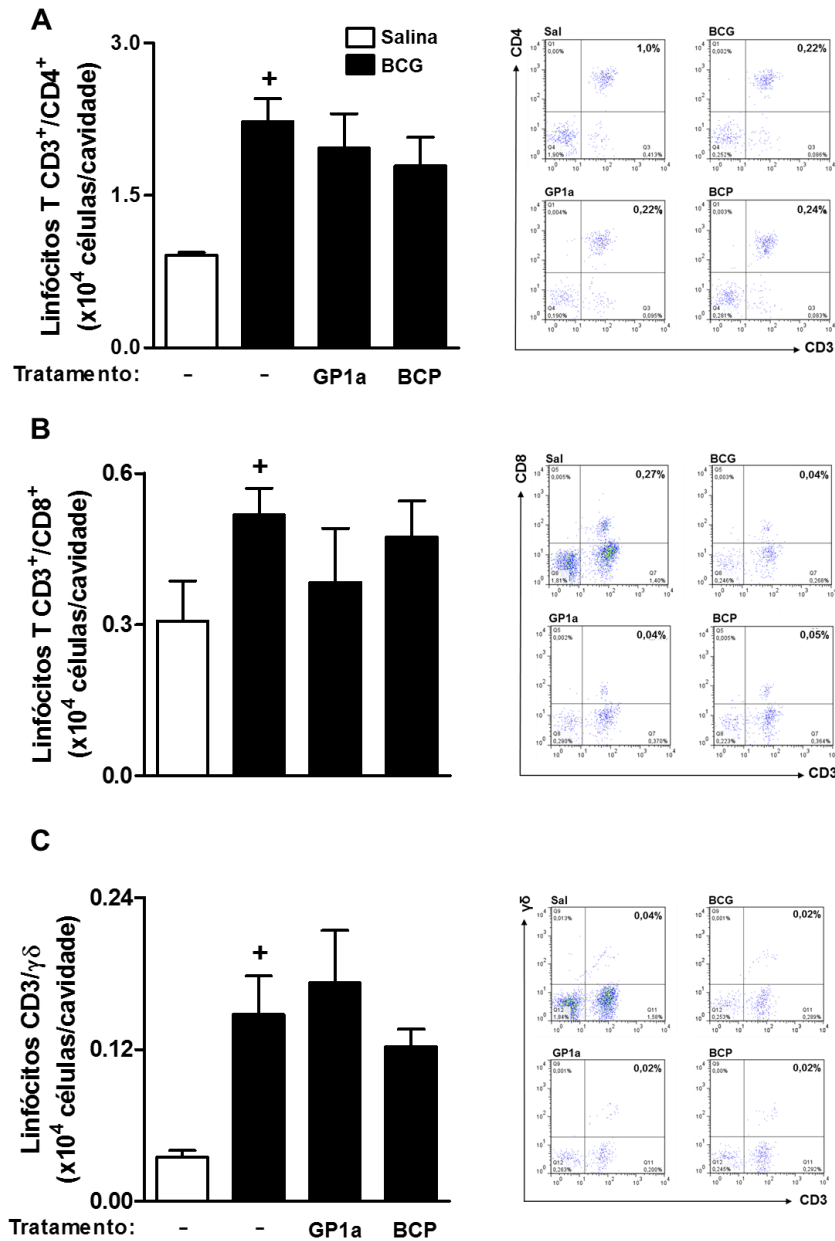


Figura 5.4. Efeito do pré-tratamento com BCP na migração de linfócitos durante a pleurisia induzida pelo BCG. Camundongos foram pré-tratados com BCP (50 mg/kg, v.o.) ou GP1a (10 mg/kg, i.p) 1 h antes da injeção i.t. de BCG (4×10^5 UFC). Após 24 horas as células da cavidade torácica foram recolhidas, marcadas com anticorpos específicos para linfócitos e analisados por citometria de fluxo. (A) Células CD3⁺/CD4⁺, (B) CD3⁺/CD8⁺ e (C) CD3⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁺ foram representados como número de células por cavidade após a multiplicação da porcentual das populações estudadas pelo número total de leucócitos. Ao lado de cada gráfico estão os *dot plots* representativos da análise de cada subtipo de linfócitos com a porcentagem das populações em relação ao total de células adquiridas. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 7 animais por grupo de um experimento. As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*). Os grupos controles tratados (v.o.) apenas com o veículo (água filtrada contendo 2% de DMSO) foram representados por (-).

5.2 Efeito do BCP na produção de mediadores inflamatórios na pleurisia induzida por BCG

Visto que os mediadores pró-inflamatórios são importantes parâmetros na inflamação, sendo responsáveis pela ativação celular e também por induzir direta ou indiretamente a migração de leucócitos para o sítio inflamatório, foi investigado o efeito do BCP na produção de diferentes mediadores presentes na inflamação induzida por micobactérias. Conforme observado Figura 5.5, o estímulo com BCG induziu um aumento na produção de CXCL1/KC, LTB₄, NO, TNF- α . O pré-tratamento com BCP, inibiu significativamente a produção de CXCL1/KC, LTB₄ e NO, mas não de TNF- α (Figura 5.5 A-D). O GP1a apresentou efeitos similares ao BCP sobre a produção de todos mediadores analisados. Como esperado a dexametasona inibiu significativamente a produção de CXCL1/KC, LTB₄, NO e TNF- α . O CXCL1/KC e LTB₄ são quimioatraentes diretos de neutrófilos e esses resultados podem contribuir na compreensão do efeito do BCP na migração desta população celular. Em adição a esses resultados, foi verificado também um aumento na produção de IL-12 e CCL2 neste processo (ANEXO I). Os resultados demonstraram que BCP inibiu discretamente a produção de IL-12, mas não interferiu na produção de CCL2.

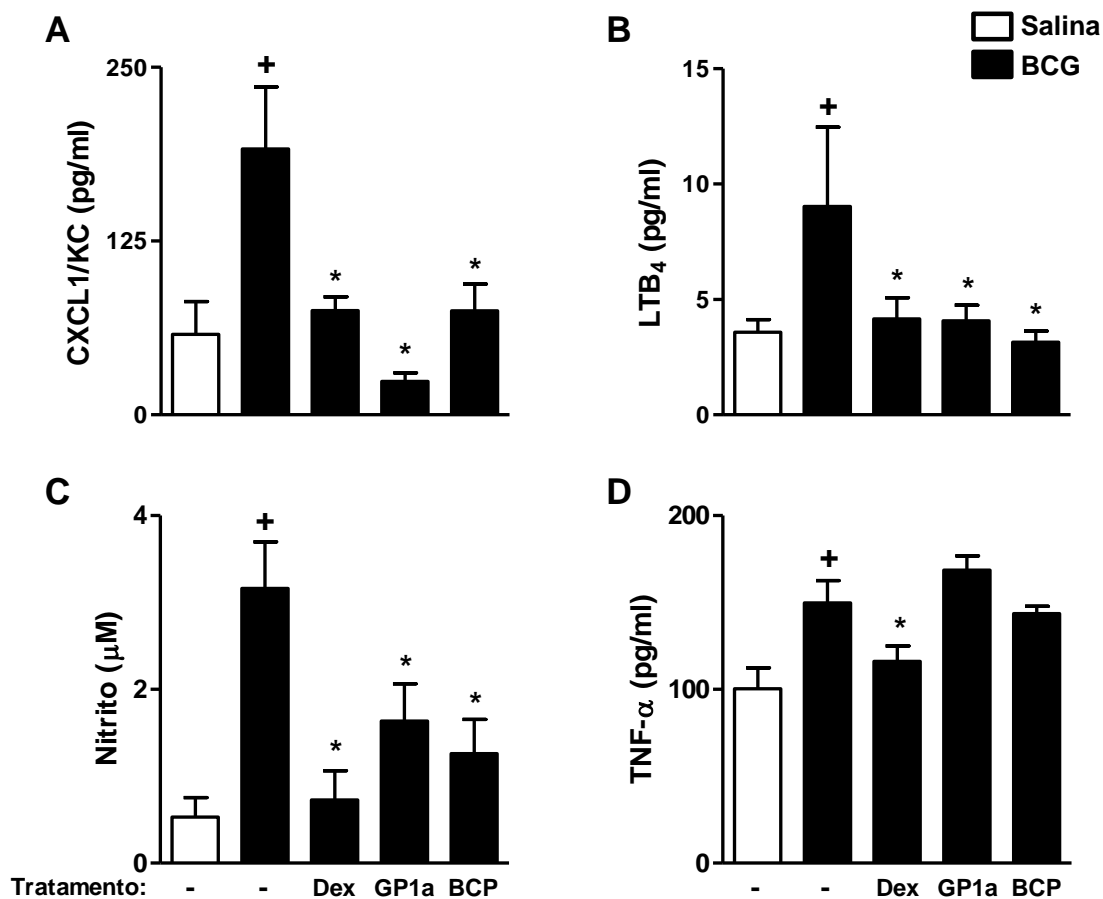


Figura 5.5. Efeito do BCP na produção de mediadores pró-inflamatórios durante a pleurisia induzida pelo BCG. Camundongos foram pré-tratados com BCP (50 mg/kg, v.o.), GP1a (10 mg/kg, i.p) ou dexametasona (Dex, 2 mg/kg, i.p) 1 h antes da injeção i.t. de BCG (4×10^5 UFC). Após 24 h, o lavado pleural foi coletado para a análise da produção de (A) CXCL1/KC, (B) LTB₄, (C) nitrito, (D) TNF- α . Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 7 animais por grupo de um experimento. As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*). Os grupos controles foram tratados (v.o.) apenas com veículo (água filtrada contendo 2% de DMSO) representados por (-).

5.3 Efeito do BCP na ativação de neutrófilos *in vitro*

Além de investigar a produção de mediadores que estão relacionados com a migração de neutrófilos, também foi analisado o efeito do BCP em importantes eventos celulares envolvidos no recrutamento destas células para o sítio inflamatório. Para isso, foi realizado ensaios *in vitro* de quimiotaxia, adesão e ainda foi verificado a ação do BCP na polimerização do citoesqueleto de actina. Inicialmente, o efeito do BCP foi verificado na quimiotaxia de neutrófilos induzido pelo LTB₄ em câmara de Boyden. Como demonstrado na Figura 5.6 A, o LTB₄ (10⁻⁷ M) induziu a quimiotaxia de neutrófilos isolados da medula. Os neutrófilos que foram previamente tratados com diferentes concentrações do BCP, 1 e 10 µM, tiveram uma redução significativa da quimiotaxia induzida pelo LTB₄. Como observado ainda na Figura 5.6 A, a concentração de 10 µM, induziu uma maior redução da quimiotaxia quando comparado ao efeito da concentração de 1 µM. Desta forma, foi utilizado a concentração de 10 µM para avaliar o efeito do BCP nos experimentos seguintes. É importante, ressaltar que nenhuma das doses foram citotóxicas, uma vez que a viabilidade dos neutrófilos tratados ou não com BCP foi conferida antes de cada experimento usando o azul de tripan, a viabilidade foi ≥ 95%.

O efeito do BCP na adesão de celular foi analisado pela aderência dos neutrófilos à células endoteliais (CEs) murinas previamente ativadas por TNF-α (10 ng/ml). De acordo com a Figura 5.6 B, o ativação de CEs aumentou a adesão de neutrófilos (Figura 5.6 B-II) em relação as CEs não estimuladas (Figura 5.6 B-I). O pré-tratamento com BCP (10 µM) impediu adesão de neutrófilos à CEs ativadas (Figura 5.6-III).

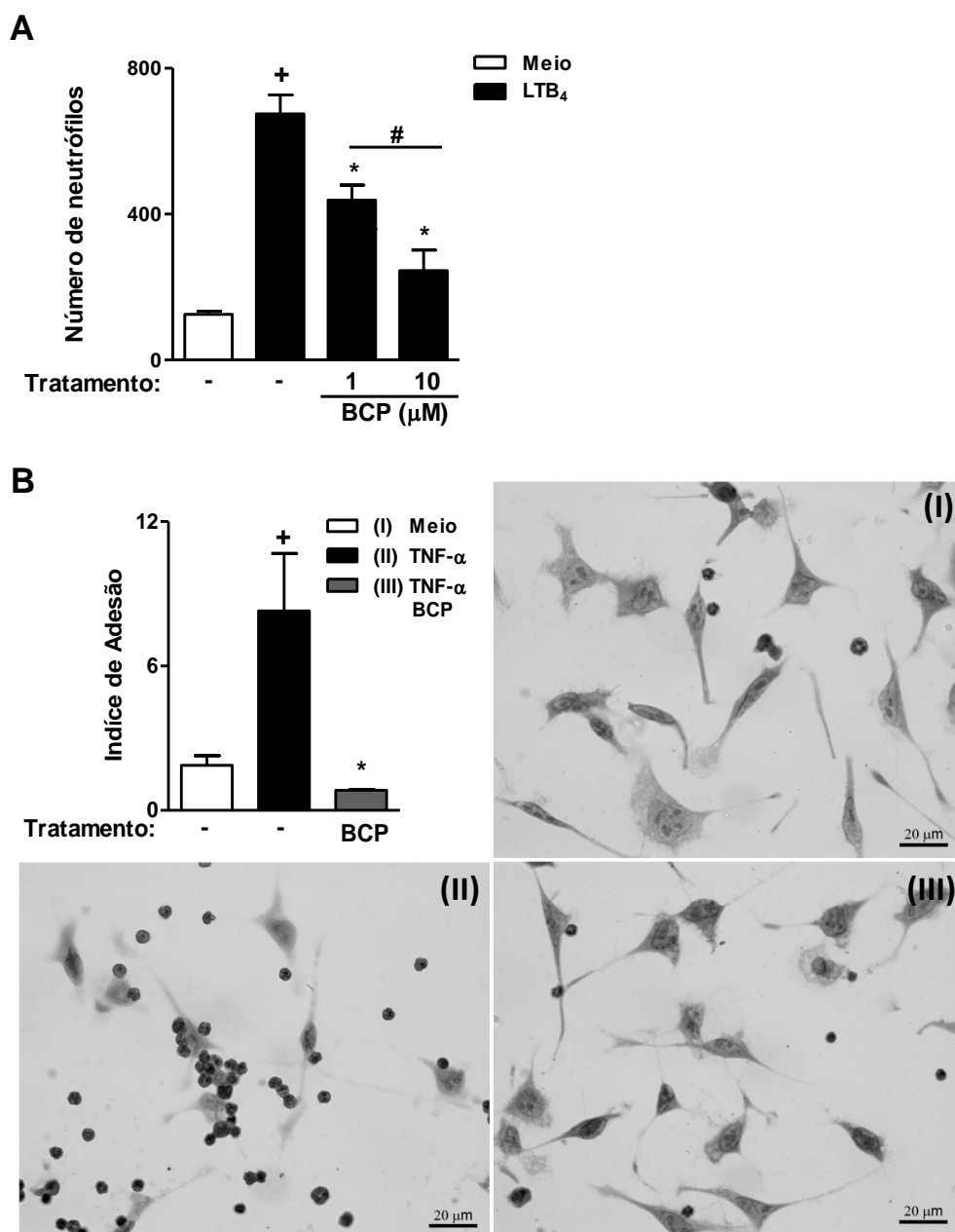
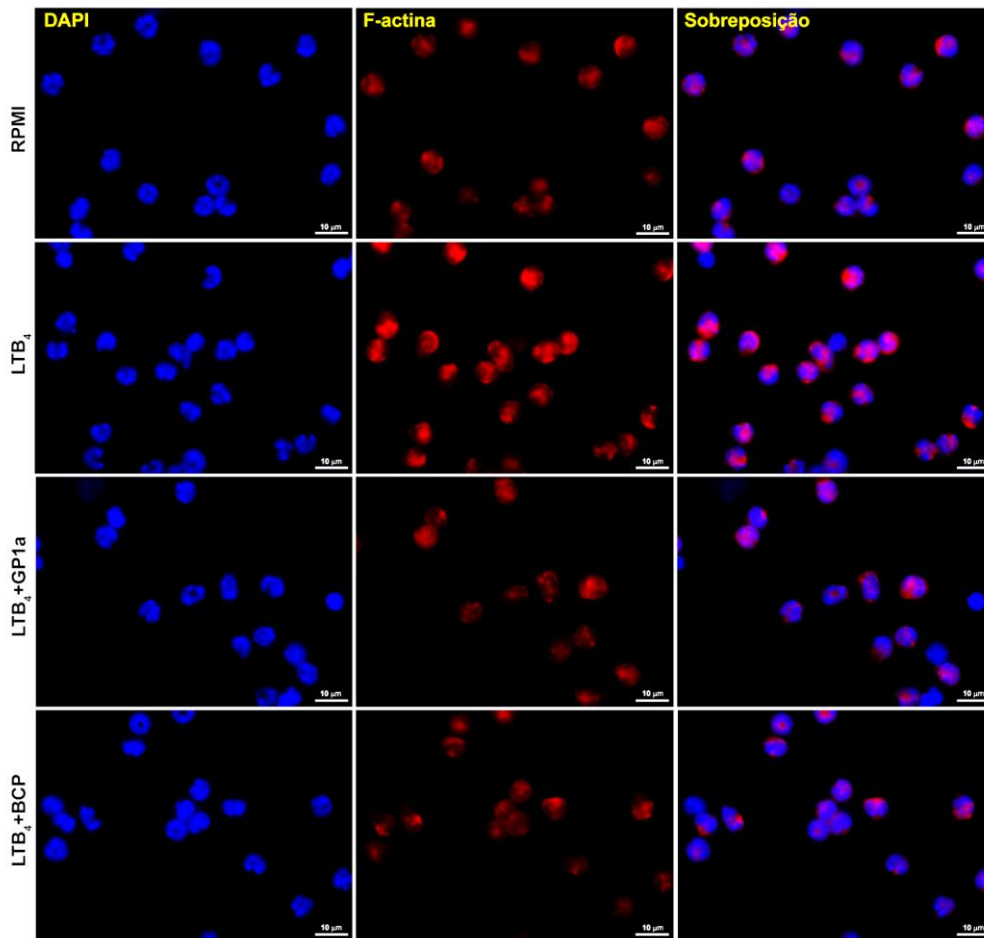


Figura 5.6. Efeito do BCP na quimiotaxia e adesão de neutrófilos as células endoteliais. Neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos foram pré-incubados com meio (RPMI) ou BCP (1 e/ou 10 µM) por 1 h antes de cada ensaio. (A) A quimiotaxia foi induzida por LTB₄ (10⁻⁷M) durante 1 h em Câmara de Boyden à 37° C. (B) Neutrófilos pré-incubados com BCP ou não foram colocados sobre células endoteliais tEnd.1 (50 neutrófilos/tEnd.1) previamente estimuladas com TNF-α (10 ng/ml) durante 1 h. A adesão de neutrófilos foi quantificada por um índice de adesão como descrito nos Materiais e Métodos. Imagens representativas de (I) neutrófilos incubadas com RPMI colocados sobre tEnd.1 não estimuladas e (II) tEnd.1 estimuladas e (III) neutrófilos incubados com BCP (10 µM) foram colocados sobre tEnd.1 estimuladas. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de 4 replicatas por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*).

Ainda, a ação do BCP foi investigada na polimerização do citoesqueleto actina, o qual é um evento fundamental para o direcionamento da célula durante a migração celular. Para investigar o possível efeito do BCP neste processo, neutrófilos isolados da medula de camundongos foram pré-tratados ou não com BCP (10 μ M) e estimulados com LTB₄ (10⁻⁷ M). Em seguida, foram submetidos a marcação com faloidina, uma micotoxina que se liga especificamente na interface entre as subunidades da F-actina. Como observado na Figura 5.7, o LTB₄ induziu a polimerização do citoesqueleto de actina. Os neutrófilos pré-tratados com BCP impediu a polimerização do citoesqueleto que foi evidenciada pela fluorescência emitida pelo fluoróforo TRITC (vermelho) ligado a faloidina, como demonstrado nas imagens da Figura 5.7 A. A fluorescência emitida foi quantificada e o MIF foi demonstrado na Figura 5.7 B.

A



B

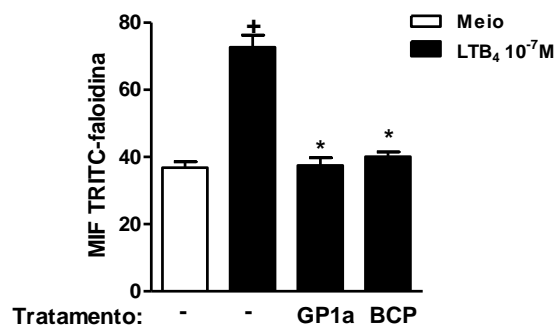


Figura 5.7. Efeito do BCP na polimerização dos filamentos de actina em neutrófilos estimulados com LTB₄. Neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos foram pré-incubados com meio (RPMI), BCP (10 µM) ou GP1a (10 µM) por 1 h antes de cada ensaio. Em seguida, foram estimulados com LTB₄ (10⁻⁷ M) durante 5 minutos. Os neutrófilos foram marcados com faloidina-TRITC (vermelho) para marcação dos filamentos de actina. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). (A) Imagens representativas da marcação dos filamentos de actina. (B) Quantificação da média de intensidade fluorescência (MIF). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de 3 lâminas por grupo, e de cada foram fotografados 5 campos escolhidos aleatoriamente (2 experimentos independentes). As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*).

5.4 Cinética da migração de leucócitos para o pulmão após instilação intranasal do BCG

Considerando que o BCP foi capaz de modular o processo inflamatório na pleurisia induzida pelo BCG, a próxima etapa foi avaliar seu efeito na inflamação pulmonar induzida pela instilação intranasal (i.n.) de BCG, que é um modelo que mimetiza a via natural de infecção pela micobactéria.

Inicialmente, foi identificado os tempos mais relevantes no processo inflamatório agudo iniciado após a instilação do BCG, analisando a cinética da migração leucocitária para o pulmão ao longo de 15 dias. A Figura 5.8, mostra que 1 dia (24 h) após a instilação do BCG (1×10^6 UFC/pulmão) ocorreu uma migração significativa de leucócitos para os pulmões (Figura 5.8 A), principalmente de neutrófilos (Figura 5.8 B), que foi máxima em 2 dias (48 h). Além disso, observa-se um aumento significativo no acúmulo de eosinófilos em 48 h (Figura 5.8 C) e de células mononucleares de 2 a 7 dias (Figura 5.8 D). Em 7 dias, a migração de granulócitos diminuiu, retornando ao nível basal em 15 dias pós-estímulo. De forma diferente dos neutrófilos, o pico do acúmulo de células mononucleares ocorreu em 7 dias. Com base nos resultados obtidos o estudo do efeito do BCP na inflamação pulmonar foi realizado no tempo de 48 h, após a infecção.

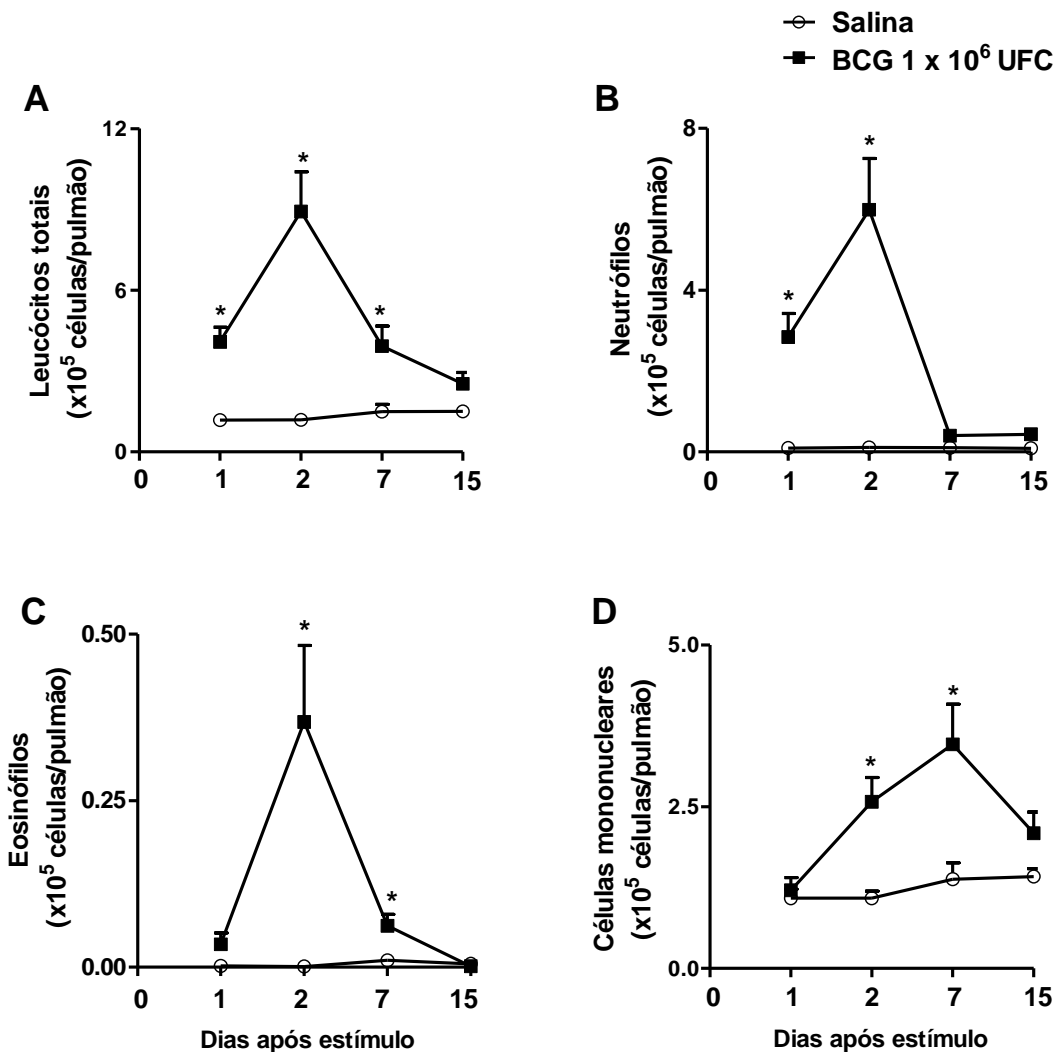


Figura 5.8. Cinética da migração de leucócitos para o pulmão após instilação intranasal de BCG. Camundongos receberam 1×10^6 UFC de BCG via intranasal (i.n.). Após 1, 2, 7 e 15 dias o lavado broncoalveolar (BAL) foi recolhido para avaliação da migração do (A) número total de leucócitos, (B) neutrófilos, (C) eosinófilos e (D) células mononucleares. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 8 animais por grupo. As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre grupos estimulado e não estimulado foram representadas por (*).

5.5 Efeito do BCP na inflamação pulmonar induzida pelo BCG

Conforme observado na Figura 5.9, a instilação i.n. de BCG induziu um aumento no número de leucócitos, incluindo neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares 48 h após o estímulo em comparação ao grupo controle (salina). A Figura 5.9 (A-D) mostra que a administração oral do BCP reduziu o acúmulo de todas as populações celulares analisadas. O fato do BCP desempenhar efeito inibitório nesse modelo, mostra que este fitocanabinoide pode desempenhar efeito imunomodulador em diferentes modelos de infecção por BCG.

Além disso, o efeito do BCP foi verificado na formação de corpúsculos lipídicos (CLs) nesses leucócitos. A Figura 5.9 E mostra que ocorreu um aumento na formação de CLs em leucócitos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos instilados com BCG e que o tratamento prévio destes animais com o BCP (50 mg/kg) inibiu a formação destas organelas. A dexametasona também inibiu o acúmulo celular, como também a formação dos CLs.

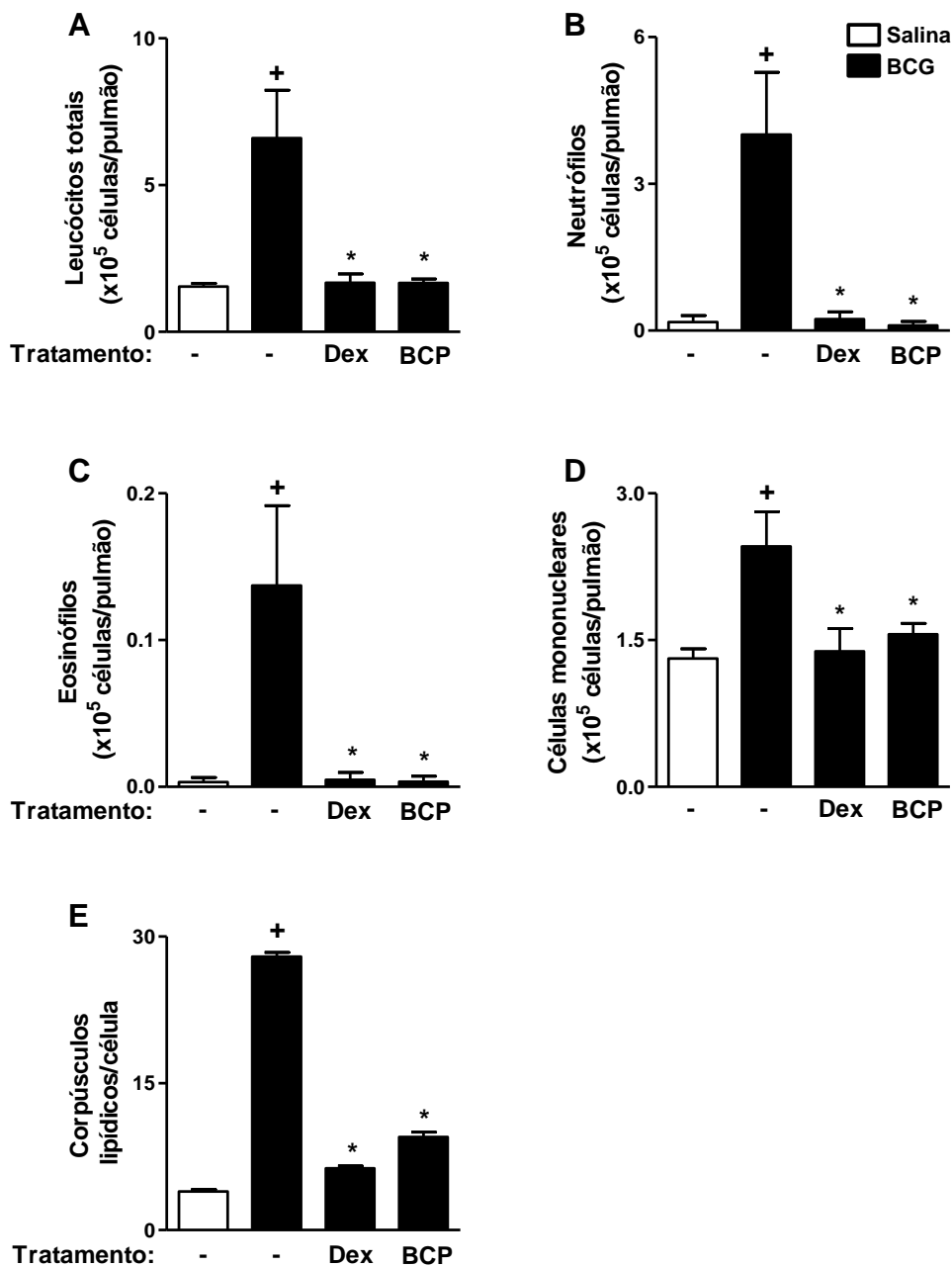


Figura 5.9. Efeito do BCP na migração de leucócitos e formação de corpúsculos lipídicos durante inflamação pulmonar induzida pelo BCG. Camundongos foram pré-tratados com BCP (50 mg/kg, v.o.) ou com a dexametasona (Dex, 2 mg/kg, i.p) 1 h antes e 24 horas após a instilação i.n. com BCG (1×10^6 UFC). Após 48 horas o BAL foi recolhido para análise do (A) número total de leucócitos, (B) neutrófilos, (C) eosinófilos, (D) células mononucleares e (E) corpúsculos lipídicos nos leucócitos totais. A coloração de corpúsculo lipídicos foi realizado por tetróxido de ósmio como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 8 animais por grupo, de um experimento. As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*). Os grupos controles tratados (v.o.) apenas com o veículo (água filtrada contendo 2% de DMSO) foram representados por (-).

5.6 Efeito do BCP na produção de mediadores na inflamação pulmonar induzida pelo BCG

Visto que o BCP demonstrou efeito inibitório na produção de mediadores pró-inflamatórios na pleurisia, investigamos também se na inflamação pulmonar o BCP poderia modular a produção de mediadores classicamente presentes na reação inflamatória induzida por micobactérias. Conforme observado na Figura 5.10, a instilação i.n. do BCG induziu a produção de IL-10, MCP-1, INF- γ , IL-12 e NO. O pré-tratamento com o BCP ou com a dexametasona foi capaz de inibir a níveis de todos os mediadores analisados (Figura 5.10 A-E), demonstrando que o BCP é capaz de inibir a produção de mediadores proinflamatórios em diferentes modelos de infecção por BCG, incluindo um modelo que assemelha-se com a infecção na natural em humanos.

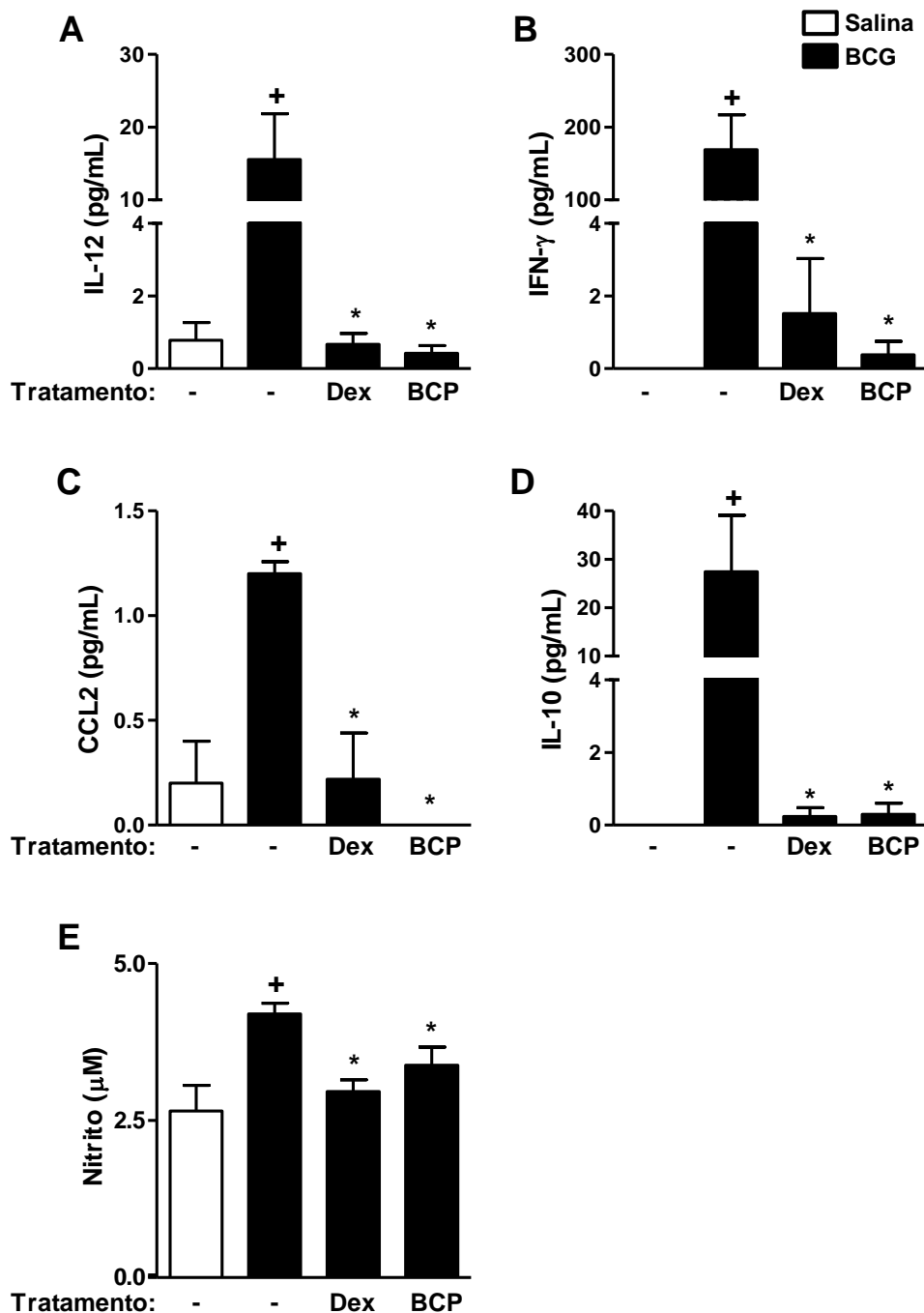


Figura 5.10. Efeito do BCP na produção de mediadores inflamatórios durante inflamação pulmonar induzida pelo BCG. Camundongos foram pré-tratados com BCP (50 mg/kg, v.o.) ou com a dexametasona (Dex, 2 mg/kg, i.p) 1 h antes e 24 horas após a instilação i.n. com BCG (1×10^6 UFC). Após 48 horas o BAL foi recolhido para a análise da produção de (A) IL-12, (B) IFN- γ , (C) CCL2 e (D) IL-10 por CBA. Os níveis de nitrito foram determinados pelo método de Griess. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 8 animais por grupo, de um experimento. As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*). Os grupos controles tratados (v.o.) apenas com o veículo (água filtrada contendo 2% de DMSO) foram representados por (-).

PARTE II – Avaliação da ativação do receptor canabinoide CB2 em macrófagos estimulados pelo BCG

Visto que o BCP modulou o processo inflamatório induzido pelo BCG na pleurisia e também na inflamação pulmonar, no qual os macrófagos são as primeiras células a reconhecer a bactéria e ativar a resposta inflamatória, foi investigado o efeito da ativação dos receptores CB2 em macrófagos estimulados pelo BCG. Para isso, foi utilizado o canabinoide sintético, GP1a, que de forma similar ao BCP também inibiu a resposta inflamatória *in vivo*.

5.7 Expressão dos receptores CB2 em macrófagos estimulados pelo BCG

É descrito que as células de origem hematopoiéticas expressam os receptores CB2, incluindo macrófagos. A fim de estudar o efeito da ativação dos receptores CB2 em macrófagos estimulados pelo BCG, primeiramente realizamos um *western blotting* para confirmar a expressão desses receptores em macrófagos da linhagem J774A.1 e também analisar se poderia existir alguma relação entre a ativação de macrófagos pelo BCG e a expressão de CB2 por estas células. Como observado na Figura 5.11, os macrófagos J774A.1 expressam o receptor CB2, e a ativação induzido pelo BCG aumentou em torno de 10 vezes a expressão de CB2 nos períodos de tempo analisados (1 e 6 horas). Esse resultado demonstrada pela primeira uma relação entre os receptores canabinóides CB2 e a ativação celular por uma micobactéria.

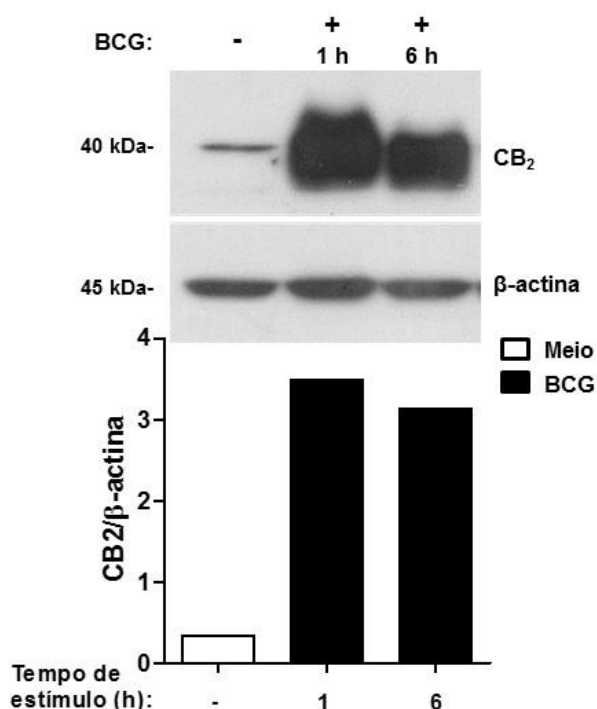


Figura 5.11. Macrófagos murinos estimulados por BCG aumenta a expressão do receptor CB2. Os macrófagos murinos J774A.1 foram estimulados *in vitro* com BCG (MOI 3:1) por 1 e 6 h. O proteínas obtidas do extrato total de macrófagos foram separadas por SDS-PAGE (10%) e submetidos ao *western blotting* (WB) para detecção do CB2. A proteína estrutural, β-actina, foi utilizada como um controle de carga protéica. A imagem representativa é demonstrada na parte superior, enquanto que as análises densitométricas (unidades arbitrárias (U.A.)) são mostradas no gráfico.

5.8 Efeito do GP1a na produção de mediadores pró-inflamatórios e na expressão da COX-2 por macrófagos estimulados com BCG

Em seguida, objetivamos avaliar efeito da ativação dos receptores CB2 por GP1a em macrófagos estimulados pelo BCG. Para isso, inicialmente foi determinada a faixa de concentração não citotóxica do GP1a, através da ensaio de MTT. De acordo com a Tabela 5.1, a incubação de macrófagos murinos J774A.1 com GP1a nas concentrações entre 0,1-10 μM por 24 h, não induziu mais do que 3 % de morte celular. Em contrapartida, o GP1a na concentração de 100 μM matou mais que 60 % dos macrófagos. Desta forma, somente as concentrações entre 0,1 à 10 μM foram analisadas. O *tween* 20 (3 %) foi utilizado como agente citotóxico, e induziu mais que 95 % de morte celular.

Tabela 5.1. Efeito do GP1a na viabilidade de macrófagos murinos J774A.1

Meio (DMSO 0,05%)	Tween 20 (3%)	GP1a (μM)			
		0,1	1	10	100
100%	2,2%	100%	100%	97%	33%

Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (%) em quadruplicata (1×10^5 células/poço), após incubação dos macrófagos com GP1a por 24 h (37°C , 5% CO_2). A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT, como descrito nos Materiais e Métodos. DMSO, dimetilsulfóxido.

Após a determinação das concentrações não citotóxicas, o efeito do GP1a foi avaliado nas concentrações de 0,1-10 μM sobre a produção de TNF- α por macrófagos estimulados com BCG. De acordo com a Figura 5.12, o BCG induziu a produção de TNF- α , que foi significativamente inibida apenas na concentração de 10 μM , assim estabelecemos esta concentração para estudar os efeitos do GP1a.

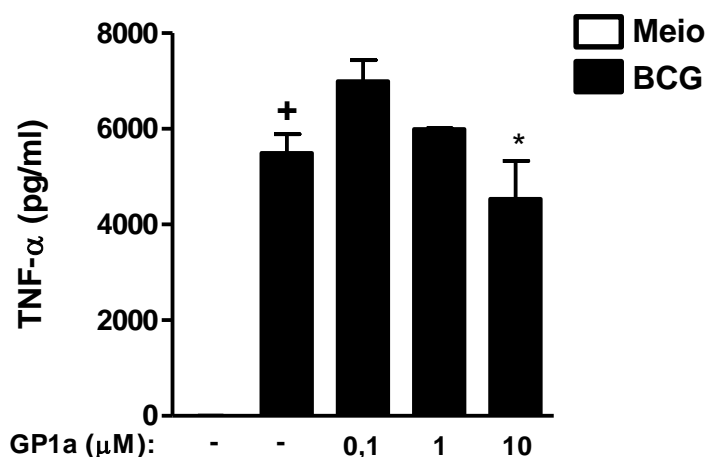


Figura 5.12. Efeito de diferentes concentrações do GP1a na produção de TNF- α . Macrófagos murinos J774A.1 foram pré-tratados com GP1a (10 μ M) por 30 min seguida do estímulo com BCG (MOI 3:1) por 1 h. Após 24 h, o sobrenadante foi recolhido para a dosagem TNF- α por ELISA. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*). Os grupos controles incubados apenas com o veículo (RPMI contendo 0,05% de DMSO) foram representados por (-).

Com a definição da concentração do GP1a, a ação do pré- e do pós-tratamento com este agonista em macrófagos estimulados com BCG foi estudada. Para isto, o efeito de GP1a foi investigado na produção de mediadores pró-inflamatórios classicamente produzidos por macrófagos ativados por micobactérias. A Figura 5.13, demonstra o efeito do pós-tratamento do GP1a (10 μ M) em macrófagos ativados por 6 h com BCG. Os resultados demonstraram que o estímulo induziu a produção de TNF- α , IL-6, IL-10, NO e PGE₂ 24 h após o estímulo (Figura 5.13 A-E). O **pós-tratamento** dos macrófagos com GP1a reduziu a produção de todos os mediadores (Figura 5.13 A-E).

A Figura 5.14 demonstra que o **pré-tratamento** dos macrófagos com GP1a também reduziu a produção de TNF- α , IL-6, IL-10, PGE₂ e do NO induzido por BCG (Figuras 5.14 A-E). Visto que GP1a inibiu a produção de PGE₂ nos dois esquemas de tratamento, foi investigado se este efeito poderia estar relacionado com a inibição da expressão da enzima COX-2. De acordo com a Figura 5.14 F, o estímulo com BCG aumentou a expressão da COX-2, que foi inibida pelo pré-tratamento com GP1a, corroborando com a inibição da produção de PGE₂.

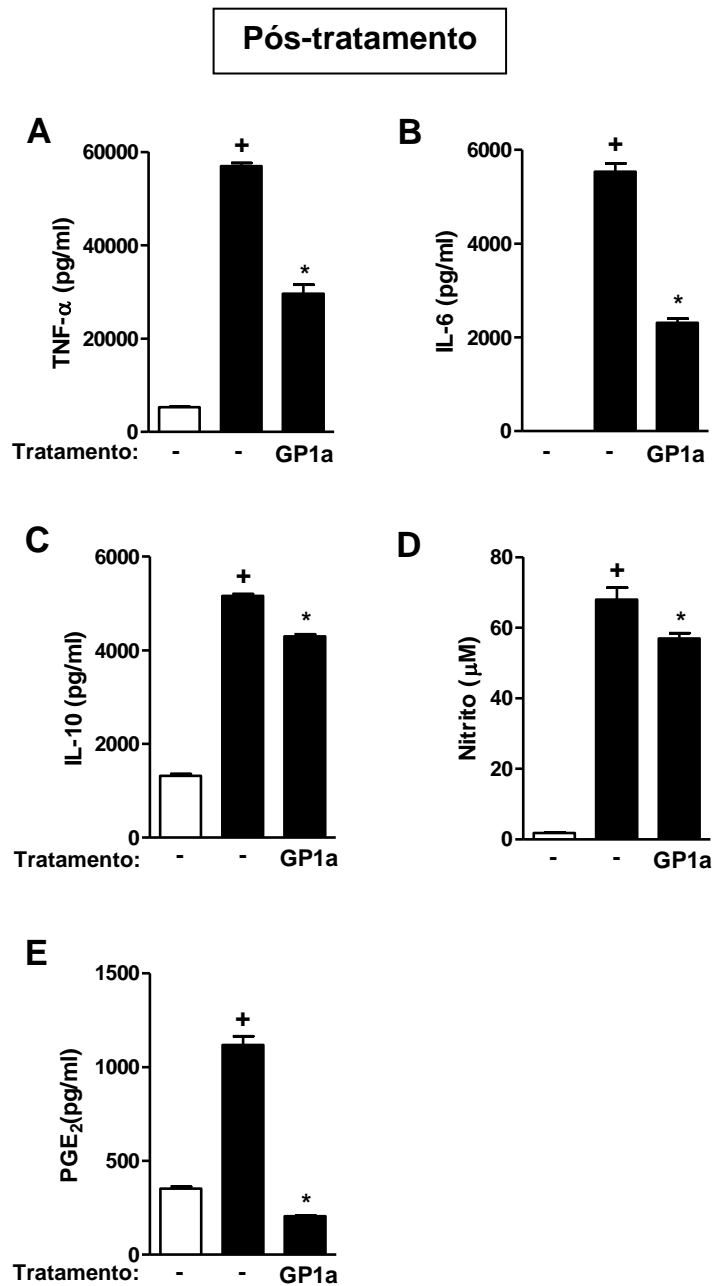


Figura 5.13. Pós-tratamento de macrófagos com GP1a inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios induzidos por BCG. Macrófagos murinos J774A.1 foram estimulados com BCG (MOI 3:1) por 6 h seguida pela a incubação com GP1a (10 μ M) ou meio (RPMI). Após 24 h, o sobrenadante foi recolhido para a dosagem de (A-E) citocinas e quimiocinas por ELISA. A quantificação de (F) PGE₂ e (G) NO foi realizado por EIA e pelo método de Greiss, respectivamente. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*). Os grupos controles incubados apenas com veiculo (RPMI contendo 0,05% de DMSO) foram representados por (-).

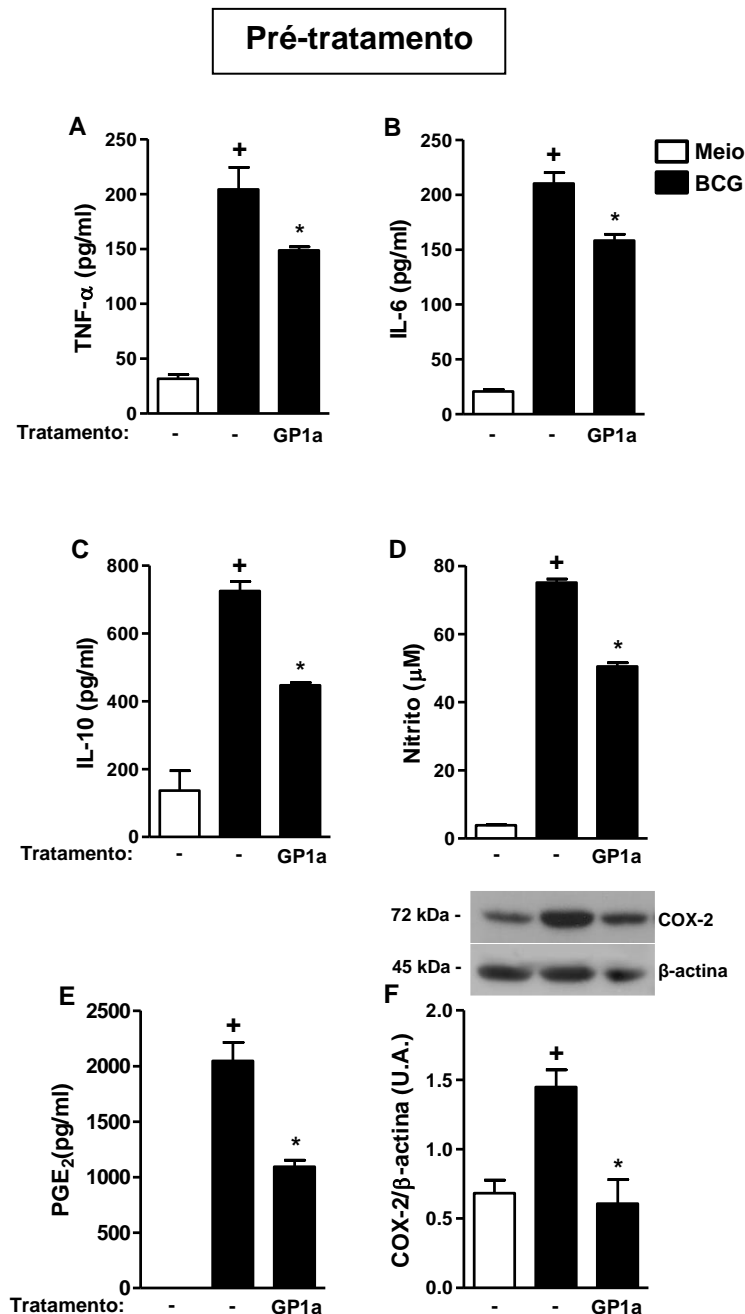


Figura 5.14. Pré-tratamento de macrófagos com GP1a inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios e a expressão COX-2 induzidas por BCG. Macrófagos murinos J774A.1 foram pré-tratados com GP1a (10 μ M) por 30 min seguida do estímulo com BCG (MOI 3:1) por 1 h. Após 24 h, o sobrenadante foi recolhido para a dosagem de (A-C) citocinas por ELISA. A quantificação de (D) NO e (E) PGE₂ foi realizada pelo método de Greiss e por EIA, respectivamente. (F) A expressão de COX-2 no extrato total em 24 h foi determinado por *western blotting* (WB). A imagem é representativa de três experimentos independentes, é demonstrada na parte superior, enquanto que as análises densitométricas são apresentadas no gráfico. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*). Os grupos controles incubados apenas com o veículo (RPMI contendo 0,05% de DMSO) foram representados por (-).

5.9 Efeito do GP1a na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados com BCG

O BCG é capaz de induzir a formação de CLs em macrófagos (81). De acordo com a Figura 5.15 A, o pré-tratamento de macrófagos com GP1a (10 μ M) inibiu a formação de CLs induzida pelo BCG. Visto que a formação de CLs, é dependente da ativação de PPAR γ em macrófagos estimulados pelo BCG, foi utilizado a rosiglitazona (10 μ M) (um agonista do PPAR γ (211)) como um controle da indução de CLs nessa reação. Como esperado, a rosiglitazona potencializou o efeito do BCG, dobrando o número de CLs nas células estimuladas. Claramente, observa-se que o GP1a apresentou um efeito inverso ao da rosiglitazona, sugerindo uma possível interferência do GP1a na ativação do PPAR γ . Para ajudar na compreensão do mecanismo desempenhado pelo GP1a na formação de CLs, nós pré-tratamos macrófagos com GP1a (10 μ M) e em seguida incubamos estas células com a rosiglitazona (10 μ M). Como demonstrado a ação da rosiglitazona em induzir o aumento da formação de CLs foi impedida nos macrófagos previamente tratados com GP1a. Em adição, analisamos o efeito do GP1a na expressão de PPAR γ . Como demonstrado na Figura 5.15 B, no modelo experimental utilizado, não foi observado um aumento na expressão do PPAR γ nos macrófagos estimulados com BCG, quando comparado ao grupo não estimulado. O pré-tratamento com GP1a também não alterou a expressão do PPAR γ .

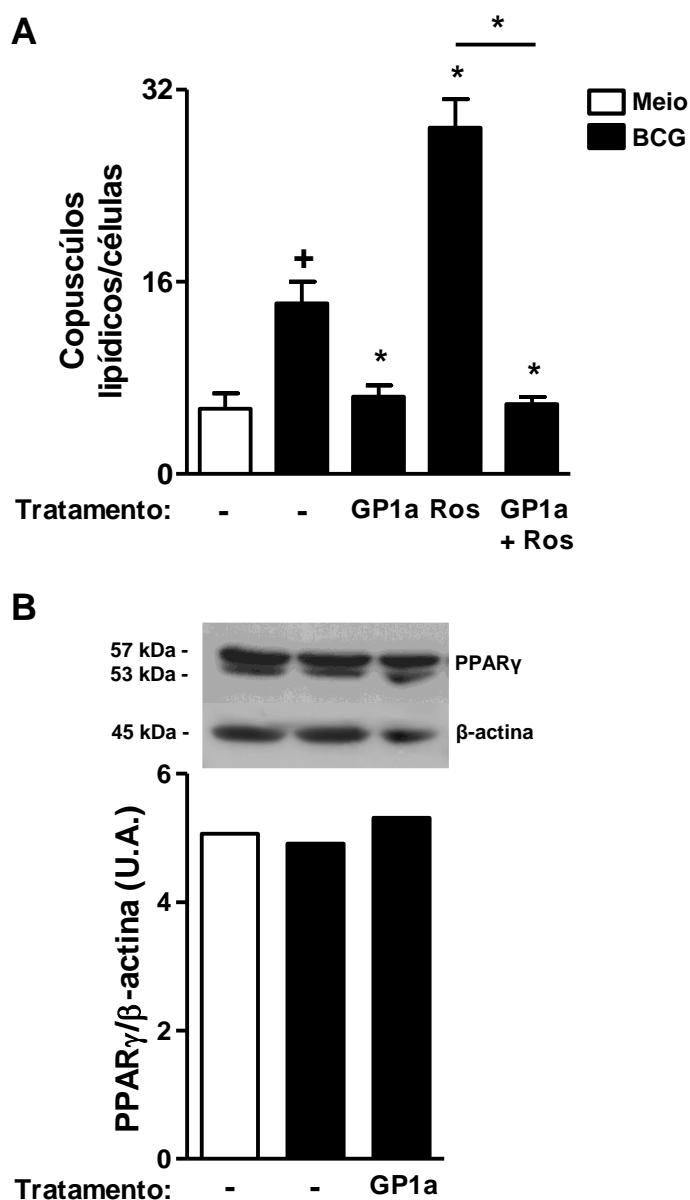


Figura 5.15 Efeito do GP1a na formação de corpúsculos lipídicos e na expressão do PPAR γ por macrófagos estimulados por BCG. Macrófagos murinos J774A.1 foram pré-tratados com GP1a (10 μ M) por 30 min seguido do estímulo com BCG (MOI 3:1) por 1 h. (A) Após 24 h, as células foram fixadas e submetidas à coloração por tetróxido de ósmio para análise da formação dos corpúsculos lipídicos. Cinquenta células foram contadas consecutivamente por replicada (4 replicatas por grupo, 3 experimentos independentes). (B) A expressão de PPAR γ no extrato total em 24 h foi determinado por *western blotting*. A imagem é representativa de dois experimentos independentes, é demonstrada na parte superior, enquanto que a análise densitométrica é mostrada no gráfico. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*). Os grupos controles incubados apenas com veículo (RPMI contendo 0,05% de DMSO) foram representados por (-).

5.10 Efeito do GP1a na sinalização intracelular induzida pelo BCG em macrófagos

Para estudar o efeito do GP1a na sinalização intracelular relacionada com a ativação dos TLRs em macrófagos ativados pelo BCG, nós investigamos o efeito desse canabinóide na fosforilação das MAPKs e na ativação dos fatores de transcrição, NF- κ B e CREB que estão relacionados com a produção de mediadores pro-inflamatórios.

Inicialmente, foi realizado uma cinética (0-60 min), para verificar o período de maior expressão das proteínas fosforiladas, ERK1/2, p38 e JNK1/2 nos macrófagos estimulados com BCG. Como demonstrado na Figura 5.16 A, 10 min após o estímulo ocorreu uma maior expressão destas proteínas, evidenciado pela análise densitométrica (Figura 5.16 B). Assim, a análise da ação do GP1a na fosforilação das MAPKs foi realizada no período de tempo de 10 min após o estímulo. De acordo com a Figura 5.17 A-C o pré-tratamento com GP1a inibiu a fosforilação de ERK1/2 e p38, mas não interferiu com a fosforilação da JNK1/2

Além disto, a ativação dos TLRs também induz a ativação dos fatores de transcrição, NF- κ B e CREB. A Figura 5.17 D demonstra que o BCG aumentou a fosforilação do CREB que não foi alterado com o pré-tratamento com o GP1a. No entanto, o pré-tratamento com GP1a reduziu a translocação nuclear do NF- κ B após 6 horas de estímulo. Com esses resultados, demonstramos um dos mecanismos responsáveis pelo efeito do GP1a na ativação de macrófagos estimulados pelo BCG.

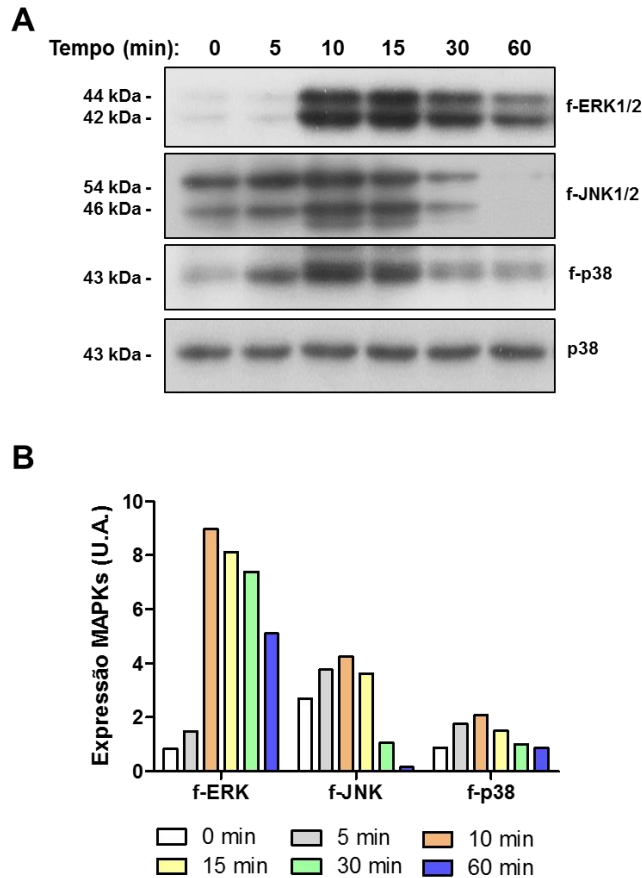


Figura 5.16. Cinética da fosforilação das MAPKs em macrófagos estimulados com BCG. Macrófagos murinos J774A.1 foram estimulados com BCG (MOI 3:1) nos tempos indicados e a fosforilação de ERK1/2, JNK1/2 e p38 foi detectada no extrato celular total por *western blotting* (WB). (A) A imagem representativa de cada proteína está representada na parte superior, (B) enquanto que as análises densitométricas são mostradas no gráfico. f, fosforilada.

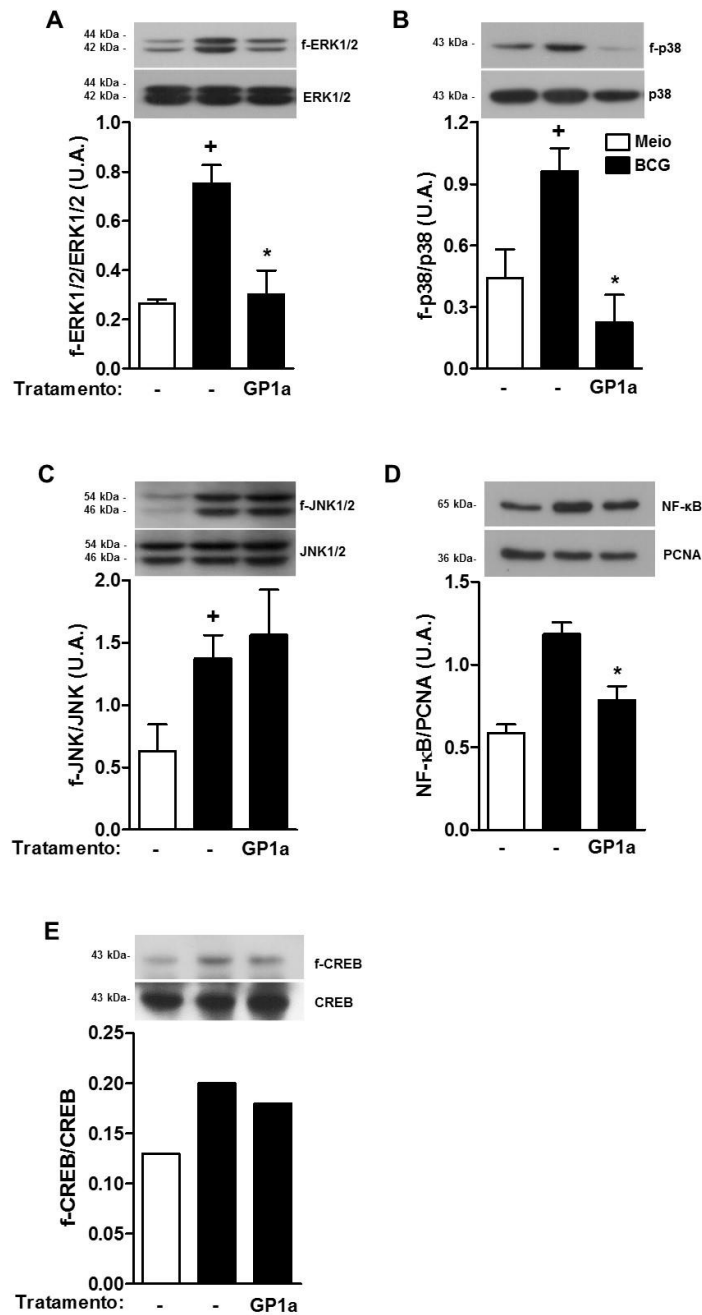


Figura 5.17. Efeito do GP1a na fosforilação das MAPKs e na translocação nuclear do NF-κB em macrófagos estimulados com BCG. Macrófagos murinos J774A.1 foram pré-tratados com GP1a (10 μM) por 30 min seguido do estímulo com BCG (MOI 3:1) por 10 min ou 1 h. A expressão das MAPKs fosforiladas, (A) ERK1/2, (B) p38 e (C) JNK1/2 foram detectadas no extrato total em 10 min de estímulo. (D) A expressão do NF-κB foi analisada no extrato nuclear obtido 1 h após o estímulo. As proteínas foram detectadas por *western blotting*. As imagens são representativas de três experimentos independentes (A, B e C) são demonstrados na parte superior, enquanto que as análises densitométricas são mostradas no gráfico. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*). Os grupos controles incubados apenas com o veículo (RPMI contendo 0,05% de DMSO) foram representados por (-). f, fosforilada.

6 DISCUSSÃO

A ativação dos receptores canabinoides CB2 modula a resposta inflamatória em diferentes modelos de inflamação como na colite, inflamação renal, artrite, edema de pata (125, 139, 172, 202) e em respostas inflamatórias de origem infecciosas, como na sepse experimental e na neuroinflamação induzida pelo vírus HIV (177, 212). Entretanto, não existem estudos que demonstrem o efeito da ativação deste receptor na reação inflamatória induzida pela micobactéria. No presente trabalho, foi demonstrado a ação de dois agonistas do receptor CB2, o BCP e o GP1a, utilizando dois modelos de inflamação induzida pelo BCG. Além disso, foi avaliado o efeito desses compostos *in vitro*, a fim de compreender o mecanismo de ação pelo qual o BCP e/ou GP1a inibem a migração de neutrófilos e a ativação de macrófagos induzida pelo BCG.

A injeção i.t. de BCG induz uma reação inflamatória caracterizada pelo intenso acúmulo de leucócitos na cavidade pleural, como neutrófilos, eosinófilos, e linfócitos T 24 h após o estímulo (66, 78). Neste trabalho, foi demonstrado que o pré-tratamento com o BCP ou GP1a inibiu a migração de leucócitos, principalmente de neutrófilos, e a produção de CXCL1/KC, LTB₄ e NO 24 h após estímulo. Entretanto, o BCP e o GP1a não foram capazes de inibir o acúmulo de células mononucleares ou a produção de TNF- α e CCL2. O efeito inibitório do BCP na migração de neutrófilos já foi demonstrado indiretamente através da atividade da mieloperoxidase (MPO) nos modelos de colite, edema de pata e inflamação renal (198, 200, 202, 213). No nosso trabalho, o número de neutrófilos na inflamação induzida pelo BCG foi quantificado por microscopia ótica e através da análise de células Ly6G⁺ por citometria de fluxo, pois Ly6G é seletivamente expresso em neutrófilos (208). Corroborando com nossos resultados, estudos prévios demonstraram que a ativação de CB2 é capaz de inibir a migração de neutrófilos para o pulmão na sepse experimental (177), no infarto do miocárdio (214) e na isquemia cerebral (173). Além disso, de maneira similar aos nossos achados, o trabalho de Murikinatti e colaboradores (173) descreveu que ativação de CB2 na isquemia cerebral não interferiu na migração de células mononucleares e nem na produção de TNF- α , demonstrando que o efeito da ativação de CB2 foi específico em inibir neutrófilos

durante a isquemia. Em um outro estudo, também foi observado que o agonista CB2, JWH-133, reduziu o influxo de células Ly6G⁺ na colite experimental (172).

Os neutrófilos contribuem para o controle inicial das infecções micobacterianas. No sítio infeccioso, os neutrófilos participam da ativação de outras células, liberam agentes bactericidas e aumentam a efetividade das células dendríticas na ativação de linfócitos T CD4 no linfonodo (106, 108, 215). No entanto, o acúmulo excessivo de neutrófilos tem sido associado ao dano pulmonar de pacientes com TB ativa ou em modelos experimentais de infecção por micobactérias (110-112). Além disso, os neutrófilos infectados pelo BCG são fagocitados por macrófagos, induzindo um aumento na formação de CLs, na produção de PGE₂, TGF- β (116) e IL-10 (115) que podem inibir a resposta imune e reduzir a ação micobactericida dos macrófagos (83, 84, 216). Assim, o acúmulo de neutrófilos pode também contribuir na redução da resposta imune antimicobacteriana, e assim favorecer a replicação do bacilo. Neste contexto, torna-se importante o estudo dos mecanismos envolvidos no acúmulo de neutrófilos durante a infecção por micobactérias, bem como de estratégias que possam modular esses eventos.

No modelo de pleurisia induzida por BCG é descrito que a migração de neutrófilos depende da produção de TNF- α e NO, enquanto que o acúmulo de linfócitos é mediado por IFN- γ , IL-12, LTB₄ e CCL2 (66, 72, 78, 79). O pré-tratamento com BCP inibiu a produção de CXCL1/KC, LTB₄ e NO que são produzidos por monócitos, macrófagos e também por neutrófilos (115, 217). No entanto, a produção de mediadores inflamatórios produzidos principalmente por monócitos e macrófagos, tais como CCL2 e TNF- α , não foi alterada após tratamento com BCP. O CCL2 é um potente agente quimiotático para células mononucleares, como monócitos e linfócitos T (70, 72), o fato do BCP não reduzir a produção de CCL2 durante a pleurisia, corrobora com o a ausência de ação deste canabinóide na migração de células mononucleares neste estudo.

Os efeitos do BCP na inflamação induzida pelo BCG poderiam ser explicados também pela inibição da chegada de neutrófilos no tecido infectado, visto que os neutrófilos quando ativados também são produzem mediadores quimiotáticos, como KC e LTB₄, (115, 218-220). Assim, a redução na migração dos neutrófilos para o sítio inflamado, poderia explicar, pelo menos em parte, a inibição das concentrações de mediadores inflamatórios observados no lavado pleural dos animais tratados com

BCP. Além disso, a liberação de mediadores inflamatórios por neutrófilos contribui para a ativação de macrófagos amplificando a reação inflamatória local (215, 220). Em adição, os neutrófilos ativados pela micobactéria aumentam a expressão da molécula CD11b/CD18 e tem sido um dos parâmetros utilizados para avaliar a ativação de neutrófilos (209, 210). Além disso, o CD11b/CD18 é uma importante integrina envolvida na adesão firme do neutrófilo ao endotélio. Este trabalho demonstra que o BCP reduziu a expressão dessa integrina evidenciado pela média de intensidade de fluorescência, que é um indicativo que o BCP pode atuar tanto na ativação de neutrófilos no sítio infeccioso como também regular diretamente a migração desta célula. A análise do efeito do BCP em eventos envolvidos na migração de neutrófilos, como a adesão e quimiotaxia, mostrou que o BCP impediu adesão de neutrófilos às células endoteliais ativadas por TNF- α e a quimiotaxia de neutrófilos em direção ao agente quimiotático, LTB₄. Estudos prévios evidenciaram que agonistas CB2 podem atenuar a interação leucócitos-células endoteliais estimuladas por TNF- α e reduzir a expressão de moléculas envolvidas na adesão, tais como ICAM-1 e VCAM-1 nas células endoteliais (174, 187). No Anexo II, é demonstrado que o pré-tratamento de células endoteliais murinas com BCP estimuladas com TNF- α não reduziu a adesão de neutrófilos, dessa forma sugerimos que o efeito de BCP interfere diretamente com a migração de neutrófilos. Durante o recrutamento celular, a polimerização da actina é necessária para direcionar a migração das células. Este evento ocorre através da sinalização de receptores de quimiocinas ou de mediadores lipídicos acoplados a proteína G, como exemplo, os receptores CXCR2 e BLT1. A sinalização desses receptores leva a ativação da PI3K e seus produtos (como PIP₃), envolvendo a ativação da proteína quinase B (Akt/PKB) e induzindo a polimerização da actina (221, 222). No presente estudo, observou-se que o BCP e o GP1a inibiram o recrutamento de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* e reduziram a polimerização da actina de neutrófilos induzida pelo LTB₄. Este resultado sugere que a inibição da polimerização da actina é um dos mecanismos pelos quais o BCP e GP1a inibem o influxo de neutrófilos. Murikinatti e colaboradores (173) demonstraram que a ativação de CB2 com o agonista sintético inibiu o recrutamento de neutrófilos na quimiotaxia induzida por CXCL2, um ligante do receptor CXCR2. No referido trabalho, os autores demonstraram que o efeito inibitório do agonista CB2 foi devido à ativação de p38, que uma vez ativado inibe a

atividade da PI3K (223), que é fundamental na sinalização induzida pelo CXCL2 para a migração do neutrófilo. Neste estudo, o LTB₄ foi utilizado para induzir a polimerização da actina e a quimiotaxia, este mediador lipídico ativa o receptor BLT1, que também induz a migração de neutrófilos via ativação da PI3K (221, 224). Desta maneira pode-se levantar a hipótese de que BCP, assim como GP1a, podem apresentar um mecanismo similar ao observado por Murikinatti e colaboradores (173). Em um outro estudo foi demonstrado que a ativação de CB2 inibiu a atividade da proteína RhoA (envolvida na reorganização do citoesqueleto de actina) em neutrófilos estimulados com fMLP e conseqüentemente a quimiotaxia (176). Embora existam algumas evidências dos mecanismos moleculares pelos quais a ativação do CB2 inibe a migração de neutrófilos, outros estudos são necessários para esclarecer o papel do BCP e do GP1a na sinalização envolvida na quimiotaxia e polimerização da actina de neutrófilos.

O efeito do BCP também foi confirmado na inflamação pulmonar induzida pela instilação i.n. de BCG e demonstramos que além de inibir a migração de neutrófilos o BCP também impediu o acúmulo de células mononucleares no pulmão e a produção de mediadores produzidos principalmente por macrófagos. Isso demonstra que a ativação de CB2 por um mesmo agonista pode apresentar efeitos distintos dependendo do estímulo ou do tecido onde o processo inflamatório foi estabelecido. Esse fato, pode ser influenciado pelas células que compõe cada ambiente inflamatório. A pleura é constituída por uma monocamada de células mesoteliais, as quais são uma das primeiras células a responder ao estímulo infeccioso na cavidade pleural (71, 225). Já no pulmão, a primeira linha de defesa contra o patógeno é constituída pelos macrófagos alveolares. Visto que o modelo de inflamação pulmonar mimetiza a infecção natural em humanos causada pela micobactéria, é interessante que novos estudos sejam realizados a fim de esclarecer a ação do BCP ou por outros agonistas CB2 neste modelo, assim como na ativação de macrófagos pela micobactéria.

Na segunda parte deste trabalho, foi investigado o efeito da ativação dos receptores CB2 em macrófagos estimulados com BCG, visto que a expressão dos receptores CB2 teve um grande aumento em macrófagos estimulados pelo BCG. Os resultados mostraram que a ativação de CB2 através do pós-tratamento dos macrófagos com GP1a inibiu a produção de TNF- α , IL-6, IL-10, PGE₂ e NO

induzidas pelo BCG. No entanto, para estudar o mecanismo de ação do GP1a, foi utilizado o esquema de pré-tratamento de macrófagos com o GP1a, uma vez que do ponto de vista farmacológico, o esquema de pós-tratamento tornaria a investigação do mecanismo de ação mais complexa, já que várias vias intracelulares já se encontrariam ativadas.

O pré-tratamento com GP1a, assim como no pós-tratamento, foi capaz de inibir a produção de todos os mediadores investigados. Ainda, foi observado que o GP1a reduziu a expressão de COX-2, que foi acompanhada pela redução nos níveis de PGE₂. A produção de PGE₂ em altas concentrações induz efeitos imunossupressores, pois inibe a produção de citocinas como IFN- γ , assim como a produção de TNF- α (82-84), que são essenciais no combate a micobactéria. Sabe-se que na infecção por micobactérias, a produção de PGE₂ está associado com a formação de CLs (81, 85), os quais servem como fonte de nutrientes para a micobactéria, através dos ácidos graxos, e contribuem para a persistência da micobactéria no hospedeiro (95, 96). Um dos mecanismos descritos para a formação de CLs em macrófagos infectado com a BCG ou Mtb é dependente da ativação de TLR2 e/ou do receptor nuclear PPAR γ (85, 86). Neste estudo demonstramos que a ativação de CB2 por GP1a inibiu a formação de CLs pelos macrófagos estimulados com BCG. Além disto, quando as células foram previamente tratadas com GP1a e em seguida com a rosiglitazona (agonista do PPAR γ), observou-se que o GP1a impediu a indução de CLs induzidos pela rosiglitazona, sugerindo que o GP1a poderia interferir com a ativação do PPAR γ . No estudo de Almeida e colaboradores (85) observou-se que a formação de CLs em macrófagos murinos peritoneais estimulados com BCG foi acompanhada pelo aumento da expressão de PPAR γ , que teve o pico de expressão em 24 h. Dessa forma, para investigar por qual mecanismo o GP1a poderia inibir o acúmulo de CLs no macrófago, foi realizado um ensaio de *western blotting* para analisar a expressão do PPAR γ . Os resultados mostraram que o BCG não induziu um aumento na expressão do PPAR γ e que as células tratadas com GP1a não tiveram alteração na expressão desse receptor. Embora não tenhamos observado mudanças na expressão do PPAR γ entre os grupos estudados, esse fato não impossibilita que o BCG apenas induza a ativação do PPAR γ no modelo experimental utilizado neste estudo. É importante ressaltar que utilizamos macrófagos da linhagem J774A.1 e micobactéria irradiada, duas variáveis

que diferem do estudo de Almeida e colaboradores (85), que utilizou macrófagos murinos peritoneais de cultura primária e BCG não irradiado.

Foi demonstrado que alguns agonistas canabinoides podem desempenhar seus efeitos via PPARs, incluindo o PPAR γ (162). Liu e colaboradores (159) demonstraram, através de um ensaio de digestão parcial da proteína, que o ácido ajulêmico (AJA), um agonista canabinoide, interage diretamente com o PPAR γ . Essa interação AJA-PPAR γ ativou este receptor e produziu efeitos anti-inflamatórios, como a redução da transcrição gênica da quimiocina inflamatória, IL-8. Em adição, Ambrosio e colaboradores (160) mostraram *in silico* a ligação direta do PPAR γ e o AJA, evidenciando interação direta do agonista canabinoide ao receptor (160). Além disso, células de hepatocarcinoma humano tratadas com THC ou JWH-015 aumentaram a expressão gênica de PPAR γ (226). Esses estudos indicam um potencial de interação, seja direta ou indiretamente, de agonistas canabinoides e o PPAR γ . Visto que GP1a inibiu a formação de CLs induzido pelo BCG, um evento dependente da ativação PPAR γ e também impediu ação da rosiglitazona, uma hipótese seria que o GP1a poderia interagir com o PPAR γ . Para esclarecer esta hipótese, foi realizado um estudo *in silico* para analisar o potencial de interação do PPAR γ com o GP1a, e também com a rosiglitazona e o GW9662, agonista e antagonista do PPAR γ , como demonstrado no ANEXO III deste trabalho. O GP1a ligou-se ao PPAR γ com uma energia de ligação de -11,2 kcal/mol, que significa que GP1a interage fortemente com o PPAR γ (Figura Anexo III A). A energia de ligação é a soma das ligações de hidrogênio e das demais interações com os aminoácidos polares e não polares do ligante com a proteína, e quando a energia de ligação é menor que zero essa interação é favorável. O GP1a teve uma energia de ligação ao PPAR γ menor que a rosiglitazona (-9,4 kcal/mol) e que o GW9662 (-8,6 kcal/mol) (Figura Anexo III B). Nossos resultados *in silico* ainda mostraram que o GP1a se liga ao PPAR γ no mesmo sítio de ligação que a rosiglitazona e o GW9662 (Figura Anexo III C), porém sem a realização de um teste biológico para prever a ação do GP1a sobre o PPAR γ , não saberíamos se esse agonista do canabinoide desempenharia uma ação agonista ou antagonista no PPAR γ . Estudos prévios demonstraram que o bloqueio do PPAR γ por GW9662 ou o silenciamento deste receptor por RNA de interferência foi capaz de inibir a formação de CLs por macrófagos infectados com BCG (85) ou Mtb (86). Em nossos resultados, observamos que o GP1a reduziu a

formação de CLs, e também impediu a ação da rosiglitazona em macrófagos previamente tratados com GP1a, assim pode-se sugerir que o GP1a se liga ao PPAR γ desempenhando uma ação antagonista.

A ativação das MAPKs tem sido uma das principais vias estudadas em células da resposta imune inata que são ativadas por agonistas dos TLRs, incluindo as micobactérias ou componentes da parede micobacteriana (46). Assim, foi investigado se o efeito inibitório do GP1a na produção de mediadores pró e anti-inflamatórios por macrófagos ativados por BCG, estaria associada com a inibição da ativação destas proteínas. Os resultados demonstraram que o GP1a inibiu a fosforilação de p38 e ERK1/2, mas não de JNK1/2. Estes resultados corroboram com relatos da literatura que demonstram o potencial de agonistas CB2 em reduzir a fosforilação das MAPKs induzidas em diferentes tipos celulares ativadas por agentes inflamatórios diversos, incluindo agonista de TLR. No estudo de Romero-Sandoval e colaboradores (183), a fosforilação de ERK1/2 em micróglia ativada por LPS foi inibida pela ativação de CB2, devido ao aumento na expressão de MKP-1 e MKP-3, que são fosfatases que regulam negativamente a ativação de MAPK. Em um outro estudo a ativação de CB2 foi capaz de reduzir a fosforilação de p38, ERK1/2 e JNK1/2 em células musculares lisas ativadas por TNF- α (154). Em adição, ativação de CB2 inibiu a expressão de TLR4, e ainda reduziu a níveis basais a expressão de MyD88 em células dendríticas ativadas com LPS (227). O MyD88 é uma molécula comum na sinalização intracelular do TLR2, TLR4 e TLR9, que são ativados pela micobactéria. Embora o início da ativação das MAPKs ocorra através do MyD88, a sequência de eventos que sucedem essa sinalização requer diferentes proteínas quinases responsáveis pela fosforilação de p38, ERK1/2 e JNK1/2. A ERK1/2 é ativada por MKK 1 e MKK 2, a p38 por MKK3 e MKK6 e por fim a JNK1/2 é ativada por MKK 4 e MKK 7 (45). Neste trabalho, o GP1a não reduziu a fosforilação da JNK1/2, o que sugere que este agonista CB2 pode interferir nas vias de ativação que fosforilam ERK1/2 e p38, mas não na via da JNK 1/2. Como reportado anteriormente ativação das MAPKs leva a ativação de fatores transcricionais, como CREB e AP-1. Neste estudo, nós observamos que GP1a não interferiu com a fosforilação do CREB. Um outro fator nuclear importante na transcrição de diversas citocinas inflamatórias é o NF- κ B (44). Normalmente, é encontrado no citoplasma como um heterodímero das subunidades p50 e p65. A ativação dos TLRs promove a

translocação do NF- κ B para o núcleo, onde se liga a regiões específicas de DNA e inicia a transcrição gênica de diversos mediadores inflamatórios (44). Nosso estudo demonstrou que GP1a inibiu a translocação do NF- κ B para o núcleo 6 h após o estímulo. Assim os nossos resultados mostram de forma consistente que o GP1a inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios por reduzir a ativação da ERK1/2, p38 e a translocação nuclear do NF- κ B.

7 CONCLUSÃO

Os nossos resultados fornecem evidência, pela primeira vez, que os agonistas CB2 modulam os eventos inflamatórios iniciais induzidos por micobactérias, através da inibição da migração leucócitos, principalmente de neutrófilos por impedir a polimerização do citoesqueleto de actina. Além disto, a ativação do receptor canabinoide CB2 por GP1a inibe a formação de CLs, e também reduz a produção de mediadores pró-inflamatórios, através da inibição de vias intracelulares, como as das MAPKs e o NF- κ B em macrófagos estimulados com BCG. Estes resultados sugerem que a ativação do receptor CB2 pode oferecer um novo alvo para a modulação da resposta inflamatória induzida pela micobactéria.

8 REFERÊNCIAS

1. Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet*. 2011;378(9785):57-72.
2. WHO, World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2015.
3. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Detectar, tratar e curar: desafios e estratégias brasileiras frente à tuberculose 2015.
4. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 1997;159(2):635-43.
5. van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):294-309.
6. Sia JK, Georgieva M, Rengarajan J. Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and Innate Immune Cells. *J Immunol Res*. 2015;2015:747543.
7. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:93-129.
8. Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunol*. 2011;4(3):271-8.
9. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:475-527.
10. Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba TJ, Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(5):343-54.
11. Zuñiga J, Torres-García D, Santos-Mendoza T, Rodriguez-Reyna TS, Granados J, Yunis EJ. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:193923.
12. Alisjahbana B, van Crevel R, Sahiratmadja E, den Heijer M, Maya A, Istriana E, et al. Diabetes mellitus is strongly associated with tuberculosis in Indonesia. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;10(6):696-700.
13. Kim SJ, Hong YP, Lew WJ, Yang SC, Lee EG. Incidence of pulmonary tuberculosis among diabetics. *Tuberc Lung Dis*. 1995;76(6):529-33.
14. Cegielski JP, McMurray DN. The relationship between malnutrition and tuberculosis: evidence from studies in humans and experimental animals. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004;8(3):286-98.
15. Rajagopalan S. Tuberculosis and aging: a global health problem. *Clin Infect Dis*. 2001;33(7):1034-9.
16. Stenger S, Modlin RL. T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Microbiol*. 1999;2(1):89-93.
17. Caruso AM, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JL. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J Immunol*. 1999;162(9):5407-16.
18. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med*. 1993;178(6):2249-54.
19. Green AM, Difazio R, Flynn JL. IFN- γ from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2013;190(1):270-7.
20. Serbina NV, Lazarevic V, Flynn JL. CD4(+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8(+) T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2001;167(12):6991-7000.

21. Khan N, Vidyarthi A, Javed S, Agrewala JN. Innate Immunity Holding the Flanks until Reinforced by Adaptive Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Front Microbiol.* 2016;7:328.
22. Lerner TR, Borel S, Gutierrez MG. The innate immune response in human tuberculosis. *Cell Microbiol.* 2015;17(9):1277-85.
23. Hossain MM, Norazmi MN. Pattern recognition receptors and cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection--the double-edged sword? *Biomed Res Int.* 2013;2013:179174.
24. Schlesinger LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol.* 1993;150(7):2920-30.
25. Schlesinger LS, Hull SR, Kaufman TM. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J Immunol.* 1994;152(8):4070-9.
26. Ferguson JS, Weis JJ, Martin JL, Schlesinger LS. Complement protein C3 binding to *Mycobacterium tuberculosis* is initiated by the classical pathway in human bronchoalveolar lavage fluid. *Infect Immun.* 2004;72(5):2564-73.
27. Cywes C, Godenir NL, Hoppe HC, Scholle RR, Steyn LM, Kirsch RE, et al. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to human complement receptor type 3 expressed in Chinese hamster ovary cells. *Infect Immun.* 1996;64(12):5373-83.
28. Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol.* 1990;144(7):2771-80.
29. Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nuñez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:365-98.
30. Martinon F, Agostini L, Meylan E, Tschopp J. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol.* 2004;14(21):1929-34.
31. Brooks MN, Rajaram MV, Azad AK, Amer AO, Valdivia-Arenas MA, Park JH, et al. NOD2 controls the nature of the inflammatory response and subsequent fate of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* BCG in human macrophages. *Cell Microbiol.* 2011;13(3):402-18.
32. Landes MB, Rajaram MV, Nguyen H, Schlesinger LS. Role for NOD2 in *Mycobacterium tuberculosis*-induced iNOS expression and NO production in human macrophages. *J Leukoc Biol.* 2015;97(6):1111-9.
33. Mishra BB, Moura-Alves P, Sonawane A, Hacoen N, Griffiths G, Moita LF, et al. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell Microbiol.* 2010;12(8):1046-63.
34. Saraav I, Singh S, Sharma S. Outcome of *Mycobacterium tuberculosis* and Toll-like receptor interaction: immune response or immune evasion? *Immunol Cell Biol.* 2014;92(9):741-6.
35. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 2011;34(5):637-50.
36. Bukhari M, Aslam MA, Khan A, Iram Q, Akbar A, Naz AG, et al. TLR8 gene polymorphism and association in bacterial load in southern Punjab of Pakistan: an association study with pulmonary tuberculosis. *Int J Immunogenet.* 2015;42(1):46-51.

37. Salie M, Daya M, Lucas LA, Warren RM, van der Spuy GD, van Helden PD, et al. Association of toll-like receptors with susceptibility to tuberculosis suggests sex-specific effects of TLR8 polymorphisms. *Infect Genet Evol.* 2015;34:221-9.
38. Tang J, Zhan L, Qin C. Inhibition of TLR8 mediated signaling promotes BCG induced apoptosis in THP-1 cells. *Microb Pathog.* 2016;93:78-82.
39. O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(6):453-60.
40. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499-511.
41. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):353-64.
42. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003;4(11):1144-50.
43. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol.* 2008;9(4):361-8.
44. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.* 2007;13(11):460-9.
45. Arthur JS, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(9):679-92.
46. Schorey JS, Cooper AM. Macrophage signalling upon mycobacterial infection: the MAP kinases lead the way. *Cell Microbiol.* 2003;5(3):133-42.
47. Roach SK, Lee SB, Schorey JS. Differential activation of the transcription factor cyclic AMP response element binding protein (CREB) in macrophages following infection with pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and role for CREB in tumor necrosis factor alpha production. *Infect Immun.* 2005;73(1):514-22.
48. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-84.
49. Jo EK, Yang CS, Choi CH, Harding CV. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cell Microbiol.* 2007;9(5):1087-98.
50. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science.* 1999;285(5428):732-6.
51. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(25):14459-63.
52. Xing Z, Zganiacz A, Santosuosso M. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. *J Leukoc Biol.* 2000;68(6):897-902.
53. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 1995;2(6):561-72.
54. Algood HM, Lin PL, Flynn JL. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2005;41 Suppl 3:S189-93.

55. Bean AG, Roach DR, Briscoe H, France MP, Korner H, Sedgwick JD, et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol.* 1999;162(6):3504-11.
56. Smart SJ, Casale TB. Pulmonary epithelial cells facilitate TNF-alpha-induced neutrophil chemotaxis. A role for cytokine networking. *J Immunol.* 1994;152(8):4087-94.
57. Zhang Y, Broser M, Cohen H, Bodkin M, Law K, Reibman J, et al. Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to *Mycobacterium tuberculosis* and its components. *J Clin Invest.* 1995;95(2):586-92.
58. Harris J, Keane J. How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. *Clin Exp Immunol.* 2010;161(1):1-9.
59. Clay H, Volkman HE, Ramakrishnan L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity.* 2008;29(2):283-94.
60. Kaneko H, Yamada H, Mizuno S, Udagawa T, Kazumi Y, Sekikawa K, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha in *Mycobacterium*-induced granuloma formation in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. *Lab Invest.* 1999;79(4):379-86.
61. Khader SA, Partida-Sanchez S, Bell G, Jelley-Gibbs DM, Swain S, Pearl JE, et al. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.* 2006;203(7):1805-15.
62. Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med.* 1997;186(1):39-45.
63. Cooper AM, Adams LB, Dalton DK, Appelberg R, Ehlers S. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol.* 2002;10(5):221-6.
64. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med.* 1992;175(4):1111-22.
65. Flesch IE, Kaufmann SH. Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect Immun.* 1990;58(8):2675-7.
66. Souza MC, Penido C, Costa MF, Henriques MG. Mechanisms of T-lymphocyte accumulation during experimental pleural infection induced by *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 2008;76(12):5686-93.
67. Kurashima K, Mukaida N, Fujimura M, Yasui M, Nakazumi Y, Matsuda T, et al. Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155(4):1474-7.
68. Park JS, Kim YS, Jee YK, Myong NH, Lee KY. Interleukin-8 production in tuberculous pleurisy: role of mesothelial cells stimulated by cytokine network involving tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Scand J Immunol.* 2003;57(5):463-9.
69. Chen T, Li Z, Yu L, Li H, Lin J, Guo H, et al. Profiling the human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* by human cytokine array. *Tuberculosis (Edinb).* 2016;97:108-17.
70. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(6):313-26.

71. Mohammed KA, Nasreen N, Ward MJ, Mubarak KK, Rodriguez-Panadero F, Antony VB. Mycobacterium-mediated chemokine expression in pleural mesothelial cells: role of C-C chemokines in tuberculous pleurisy. *J Infect Dis.* 1998;178(5):1450-6.
72. Penido C, Vieira-de-Abreu A, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Role of monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine ligand 2 on gamma delta T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *J Immunol.* 2003;171(12):6788-94.
73. Canetti CA, Leung BP, Culshaw S, McInnes IB, Cunha FQ, Liew FY, et al. IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4. *J Immunol.* 2003;171(2):1009-15.
74. Afonso PV, Janka-Junttila M, Lee YJ, McCann CP, Oliver CM, Aamer KA, et al. LTB4 is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis. *Dev Cell.* 2012;22(5):1079-91.
75. Peters-Golden M, Henderson WR. Leukotrienes. *N Engl J Med.* 2007;357(18):1841-54.
76. el-Ahmady O, Mansour M, Zoeir H, Mansour O. Elevated concentrations of interleukins and leukotriene in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Ann Clin Biochem.* 1997;34 (Pt 2):160-4.
77. Pace E, Profita M, Melis M, Bonanno A, Paternò A, Mody CH, et al. LTB4 is present in exudative pleural effusions and contributes actively to neutrophil recruitment in the inflamed pleural space. *Clin Exp Immunol.* 2004;135(3):519-27.
78. Menezes-de-Lima-Júnior O, Werneck-Barroso E, Cordeiro RS, Henriques MG. Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin in mouse pleurisy. *J Leukoc Biol.* 1997;62(6):778-85.
79. Costa MF, de Souza-Martins R, de Souza MC, Benjamim CF, Piva B, Diaz BL, et al. Leukotriene B4 mediates gammadelta T lymphocyte migration in response to diverse stimuli. *J Leukoc Biol.* 2010;87(2):323-32.
80. Venkataprasad N, Shiratsuchi H, Johnson JL, Ellner JJ. Induction of prostaglandin E2 by human monocytes infected with *Mycobacterium avium* complex--modulation of cytokine expression. *J Infect Dis.* 1996;174(4):806-11.
81. D'Avila H, Melo RC, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol.* 2006;176(5):3087-97.
82. Edwards CK, Hedegaard HB, Zlotnik A, Gangadharam PR, Johnston RB, Pabst MJ. Chronic infection due to *Mycobacterium intracellulare* in mice: association with macrophage release of prostaglandin E2 and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide, or interferon-gamma. *J Immunol.* 1986;136(5):1820-7.
83. Renz H, Gong JH, Schmidt A, Nain M, Gemsa D. Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. *J Immunol.* 1988;141(7):2388-93.
84. Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol.* 1991;146(1):108-13.
85. Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Töröcsik D, D'Avila H, Dezsö B, et al. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent

peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol.* 2009;183(2):1337-45.

86. Mahajan S, Dkhar HK, Chandra V, Dave S, Nanduri R, Janmeja AK, et al. Mycobacterium tuberculosis modulates macrophage lipid-sensing nuclear receptors PPAR γ and TR4 for survival. *J Immunol.* 2012;188(11):5593-603.

87. Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(6):540-51.

88. Melo RC, D'Avila H, Wan HC, Bozza PT, Dvorak AM, Weller PF. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *J Histochem Cytochem.* 2011;59(5):540-56.

89. Dvorak AM, Weller PF, Harvey VS, Morgan ES, Dvorak HF. Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. *Int Arch Allergy Immunol.* 1993;101(2):136-42.

90. Bozza PT, Yu W, Cassara J, Weller PF. Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. *J Leukoc Biol.* 1998;64(4):563-9.

91. Bozza PT, Yu W, Weller PF. Mechanisms of formation and function of eosinophil lipid bodies: inducible intracellular sites involved in arachidonic acid metabolism. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;92 Suppl 2:135-40.

92. Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, et al. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol.* 2002;169(11):6498-506.

93. Pacheco P, Vieira-de-Abreu A, Gomes RN, Barbosa-Lima G, Wermelinger LB, Maya-Monteiro CM, et al. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B₄-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. *J Immunol.* 2007;179(12):8500-8.

94. D'Avila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(10):1308-15.

95. Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y, Levillain F, Botanch C, Bardou F, et al. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog.* 2008;4(11):e1000204.

96. Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol.* 2009;10(9):943-8.

97. Daniel J, Maamar H, Deb C, Sirakova TD, Kolattukudy PE. Mycobacterium tuberculosis uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PLoS Pathog.* 2011;7(6):e1002093.

98. Hammond RJ, Baron VO, Oravcova K, Lipworth S, Gillespie SH. Phenotypic resistance in mycobacteria: is it because I am old or fat that I resist you? *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(10):2823-7.

99. Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VG, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in

eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol.* 2010;87(3):371-84.

100. Almeida PE, Roque NR, Magalhães KG, Mattos KA, Teixeira L, Maya-Monteiro C, et al. Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by *Mycobacterium bovis* BCG infection. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841(1):97-107.

101. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(8):519-31.

102. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:459-89.

103. Eum SY, Kong JH, Hong MS, Lee YJ, Kim JH, Hwang SH, et al. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest.* 2010;137(1):122-8.

104. Martineau AR, Newton SM, Wilkinson KA, Kampmann B, Hall BM, Nawroly N, et al. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *J Clin Invest.* 2007;117(7):1988-94.

105. Persson YA, Blomgran-Julinder R, Rahman S, Zheng L, Stendahl O. *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptotic neutrophils trigger a pro-inflammatory response in macrophages through release of heat shock protein 72, acting in synergy with the bacteria. *Microbes Infect.* 2008;10(3):233-40.

106. Tan BH, Meinken C, Bastian M, Bruns H, Legaspi A, Ochoa MT, et al. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol.* 2006;177(3):1864-71.

107. Morel C, Badell E, Abadie V, Robledo M, Setterblad N, Gluckman JC, et al. *Mycobacterium bovis* BCG-infected neutrophils and dendritic cells cooperate to induce specific T cell responses in humans and mice. *Eur J Immunol.* 2008;38(2):437-47.

108. Blomgran R, Ernst JD. Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4⁺ T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 2011;186(12):7110-9.

109. Berry MP, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SA, Oni T, et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature.* 2010;466(7309):973-7.

110. Gopal R, Monin L, Torres D, Slight S, Mehra S, McKenna KC, et al. S100A8/A9 proteins mediate neutrophilic inflammation and lung pathology during tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(9):1137-46.

111. Yeremeev V, Linge I, Kondratieva T, Apt A. Neutrophils exacerbate tuberculosis infection in genetically susceptible mice. *Tuberculosis (Edinb).* 2015.

112. Marzo E, Vilaplana C, Tapia G, Diaz J, Garcia V, Cardona PJ. Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2014;94(1):55-64.

113. McNab FW, Berry MP, Graham CM, Bloch SA, Oni T, Wilkinson KA, et al. Programmed death ligand 1 is over-expressed by neutrophils in the blood of patients with active tuberculosis. *Eur J Immunol.* 2011;41(7):1941-7.

114. Jurado JO, Alvarez IB, Pasquinelli V, Martínez GJ, Quiroga MF, Abbate E, et al. Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J Immunol.* 2008;181(1):116-25.

115. Zhang X, Majlessi L, Deriaud E, Leclerc C, Lo-Man R. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity*. 2009;31(5):761-71.
116. D'Avila H, Roque NR, Cardoso RM, Castro-Faria-Neto HC, Melo RC, Bozza PT. Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. *Cell Microbiol*. 2008;10(12):2589-604.
117. Keller C, Hoffmann R, Lang R, Brandau S, Hermann C, Ehlers S. Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes. *Infect Immun*. 2006;74(7):4295-309.
118. Dorhoi A, Desel C, Yeremeev V, Pradl L, Brinkmann V, Mollenkopf HJ, et al. The adaptor molecule CARD9 is essential for tuberculosis control. *J Exp Med*. 2010;207(4):777-92.
119. Pertwee RG. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*. 2005(168):1-51.
120. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*. 2002;54(2):161-202.
121. Fine PG, Rosenfeld MJ. The endocannabinoid system, cannabinoids, and pain. *Rambam Maimonides Med J*. 2013;4(4):e0022.
122. Chakravarti B, Ravi J, Ganju RK. Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications. *Oncotarget*. 2014;5(15):5852-72.
123. Rossi S, Bernardi G, Centonze D. The endocannabinoid system in the inflammatory and neurodegenerative processes of multiple sclerosis and of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 2010;224(1):92-102.
124. Immenschuh S. Endocannabinoid signalling as an anti-inflammatory therapeutic target in atherosclerosis: does it work? *Cardiovasc Res*. 2009;84(3):341-2.
125. Fukuda S, Kohsaka H, Takayasu A, Yokoyama W, Miyabe C, Miyabe Y, et al. Cannabinoid receptor 2 as a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014;15:275.
126. Lehmann C, Kianian M, Zhou J, Küster I, Kuschner R, Whynot S, et al. Cannabinoid receptor 2 activation reduces intestinal leukocyte recruitment and systemic inflammatory mediator release in acute experimental sepsis. *Crit Care*. 2012;16(2):R47.
127. Schwartz RH, Beveridge RA. Marijuana as an antiemetic drug: how useful is it today? Opinions from clinical oncologists. *J Addict Dis*. 1994;13(1):53-65.
128. Mimura T, Oka S, Koshimoto H, Ueda Y, Watanabe Y, Sugiura T. Involvement of the endogenous cannabinoid 2 ligand 2-arachidonyl glycerol in allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;159(2):149-56.
129. Lambert DM, Fowler CJ. The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J Med Chem*. 2005;48(16):5059-87.
130. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992;258(5090):1946-9.
131. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995;50(1):83-90.

132. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;215(1):89-97.
133. Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005;81(2):224-38.
134. Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30(10):515-27.
135. Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol*. 2008;153(2):199-215.
136. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*. 1964;86(8):1646-7.
137. Gertsch J, Pertwee RG, Di Marzo V. Phytocannabinoids beyond the Cannabis plant - do they exist? *Br J Pharmacol*. 2010;160(3):523-9.
138. Sharma C, Sadek B, Goyal SN, Sinha S, Kamal MA, Ojha S. Small Molecules from Nature Targeting G-Protein Coupled Cannabinoid Receptors: Potential Leads for Drug Discovery and Development. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:238482.
139. Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen JZ, Xie XQ, et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(26):9099-104.
140. Gertsch J. Immunomodulatory lipids in plants: plant fatty acid amides and the human endocannabinoid system. *Planta Med*. 2008;74(6):638-50.
141. Han S, Thatte J, Buzard DJ, Jones RM. Therapeutic utility of cannabinoid receptor type 2 (CB2) selective agonists. *J Med Chem*. 2013;56(21):8224-56.
142. Compton DR, Gold LH, Ward SJ, Balster RL, Martin BR. Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;263(3):1118-26.
143. Murineddu G, Lazzari P, Ruiu S, Sanna A, Loriga G, Manca I, et al. Tricyclic pyrazoles. 4. Synthesis and biological evaluation of analogues of the robust and selective CB2 cannabinoid ligand 1-(2',4'-dichlorophenyl)-6-methyl-N-piperidin-1-yl-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazole-3-carboxamide. *J Med Chem*. 2006;49(25):7502-12.
144. Deiana V, Gómez-Cañas M, Pazos MR, Fernández-Ruiz J, Asproni B, Cichero E, et al. Tricyclic pyrazoles. Part 8. Synthesis, biological evaluation and modelling of tricyclic pyrazole carboxamides as potential CB2 receptor ligands with antagonist/inverse agonist properties. *Eur J Med Chem*. 2016;112:66-80.
145. Basu S, Dittel BN. Unraveling the complexities of cannabinoid receptor 2 (CB2) immune regulation in health and disease. *Immunol Res*. 2011;51(1):26-38.
146. Howlett AC. Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol*. 2005(168):53-79.
147. Bosier B, Muccioli GG, Hermans E, Lambert DM. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(1):1-12.
148. Dhopeswarkar A, Mackie K. CB2 Cannabinoid receptors as a therapeutic target-what does the future hold? *Mol Pharmacol*. 2014;86(4):430-7.
149. Jeon YJ, Yang KH, Pulaski JT, Kaminski NE. Attenuation of inducible nitric oxide synthase gene expression by delta 9-tetrahydrocannabinol is mediated through

- the inhibition of nuclear factor- kappa B/Rel activation. *Mol Pharmacol.* 1996;50(2):334-41.
150. Herring AC, Koh WS, Kaminski NE. Inhibition of the cyclic AMP signaling cascade and nuclear factor binding to CRE and kappaB elements by cannabiniol, a minimally CNS-active cannabinoid. *Biochem Pharmacol.* 1998;55(7):1013-23.
151. Correa F, Mestre L, Docagne F, Guaza C. Activation of cannabinoid CB2 receptor negatively regulates IL-12p40 production in murine macrophages: role of IL-10 and ERK1/2 kinase signaling. *Br J Pharmacol.* 2005;145(4):441-8.
152. Correa F, Docagne F, Mestre L, Clemente D, Hernangómez M, Loría F, et al. A role for CB2 receptors in anandamide signalling pathways involved in the regulation of IL-12 and IL-23 in microglial cells. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(1):86-100.
153. Correa F, Hernangómez M, Mestre L, Loría F, Spagnolo A, Docagne F, et al. Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB(2) receptors: roles of ERK1/2, JNK, and NF-kappaB. *Glia.* 2010;58(2):135-47.
154. Rajesh M, Mukhopadhyay P, Haskó G, Huffman JW, Mackie K, Pacher P. CB2 cannabinoid receptor agonists attenuate TNF-alpha-induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol.* 2008;153(2):347-57.
155. Börner C, Smida M, Höllt V, Schraven B, Kraus J. Cannabinoid receptor type 1- and 2-mediated increase in cyclic AMP inhibits T cell receptor-triggered signaling. *J Biol Chem.* 2009;284(51):35450-60.
156. Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol.* 2007;152(7):1092-101.
157. Kohno M, Hasegawa H, Inoue A, Muraoka M, Miyazaki T, Oka K, et al. Identification of N-arachidonylglycine as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptor GPR18. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347(3):827-32.
158. Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, et al. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab.* 2006;3(3):167-75.
159. Liu J, Li H, Burstein SH, Zurier RB, Chen JD. Activation and binding of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by synthetic cannabinoid ajulemic acid. *Mol Pharmacol.* 2003;63(5):983-92.
160. Ambrosio AL, Dias SM, Polikarpov I, Zurier RB, Burstein SH, Garratt RC. Ajulemic acid, a synthetic nonpsychoactive cannabinoid acid, bound to the ligand binding domain of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 2007;282(25):18625-33.
161. Rockwell CE, Snider NT, Thompson JT, Vanden Heuvel JP, Kaminski NE. Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol Pharmacol.* 2006;70(1):101-11.
162. O'Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol.* 2007;152(5):576-82.
163. Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988;34(5):605-13.
164. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990;346(6284):561-4.

165. Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D, et al. Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur J Biochem.* 1993;214(1):173-80.
166. Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem.* 1995;232(1):54-61.
167. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993;365(6441):61-5.
168. Mukhopadhyay S, Das S, Williams EA, Moore D, Jones JD, Zahm DS, et al. Lipopolysaccharide and cyclic AMP regulation of CB(2) cannabinoid receptor levels in rat brain and mouse RAW 264.7 macrophages. *J Neuroimmunol.* 2006;181(1-2):82-92.
169. Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol.* 2002;2(1):69-82.
170. Nagarkatti P, Pandey R, Rieder SA, Hegde VL, Nagarkatti M. Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future Med Chem.* 2009;1(7):1333-49.
171. Klein TW. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(5):400-11.
172. Singh UP, Singh NP, Singh B, Price RL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Cannabinoid receptor-2 (CB2) agonist ameliorates colitis in IL-10(-/-) mice by attenuating the activation of T cells and promoting their apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;258(2):256-67.
173. Murikinati S, Jüttler E, Keinert T, Ridder DA, Muhammad S, Waibler Z, et al. Activation of cannabinoid 2 receptors protects against cerebral ischemia by inhibiting neutrophil recruitment. *FASEB J.* 2010;24(3):788-98.
174. Ramirez SH, Haskó J, Skuba A, Fan S, Dykstra H, McCormick R, et al. Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. *J Neurosci.* 2012;32(12):4004-16.
175. Montecucco F, Burger F, Mach F, Steffens S. CB2 cannabinoid receptor agonist JWH-015 modulates human monocyte migration through defined intracellular signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(3):H1145-55.
176. Kurihara R, Tohyama Y, Matsusaka S, Naruse H, Kinoshita E, Tsujioka T, et al. Effects of peripheral cannabinoid receptor ligands on motility and polarization in neutrophil-like HL60 cells and human neutrophils. *J Biol Chem.* 2006;281(18):12908-18.
177. Tschöp J, Kasten KR, Nogueiras R, Goetzman HS, Cave CM, England LG, et al. The cannabinoid receptor 2 is critical for the host response to sepsis. *J Immunol.* 2009;183(1):499-505.
178. Toguri JT, Lehmann C, Laprairie RB, Szczesniak AM, Zhou J, Denovan-Wright EM, et al. Anti-inflammatory effects of cannabinoid CB(2) receptor activation in endotoxin-induced uveitis. *Br J Pharmacol.* 2014;171(6):1448-61.
179. Smith SR, Denhardt G, Terminelli C. The anti-inflammatory activities of cannabinoid receptor ligands in mouse peritonitis models. *Eur J Pharmacol.* 2001;432(1):107-19.

180. Kong W, Li H, Tuma RF, Ganea D. Selective CB2 receptor activation ameliorates EAE by reducing Th17 differentiation and immune cell accumulation in the CNS. *Cell Immunol.* 2014;287(1):1-17.
181. Adhikary S, Kocieda VP, Yen JH, Tuma RF, Ganea D. Signaling through cannabinoid receptor 2 suppresses murine dendritic cell migration by inhibiting matrix metalloproteinase 9 expression. *Blood.* 2012;120(18):3741-9.
182. Raborn ES, Marciano-Cabral F, Buckley NE, Martin BR, Cabral GA. The cannabinoid delta-9-tetrahydrocannabinol mediates inhibition of macrophage chemotaxis to RANTES/CCL5: linkage to the CB2 receptor. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2008;3(2):117-29.
183. Romero-Sandoval EA, Horvath R, Landry RP, DeLeo JA. Cannabinoid receptor type 2 activation induces a microglial anti-inflammatory phenotype and reduces migration via MKP induction and ERK dephosphorylation. *Mol Pain.* 2009;5:25.
184. Ghosh S, Preet A, Groopman JE, Ganju RK. Cannabinoid receptor CB2 modulates the CXCL12/CXCR4-mediated chemotaxis of T lymphocytes. *Mol Immunol.* 2006;43(14):2169-79.
185. Rom S, Zuluaga-Ramirez V, Dykstra H, Reichenbach NL, Pacher P, Persidsky Y. Selective activation of cannabinoid receptor 2 in leukocytes suppresses their engagement of the brain endothelium and protects the blood-brain barrier. *Am J Pathol.* 2013;183(5):1548-58.
186. Golech SA, McCarron RM, Chen Y, Bembry J, Lenz F, Mechoulam R, et al. Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* 2004;132(1):87-92.
187. Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Haskó G, Liaudet L, Huffman JW, et al. CB2-receptor stimulation attenuates TNF-alpha-induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(4):H2210-8.
188. Mockute D, Bernotiene G, Judzentiene A. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in vilnius district (Lithuania). *Phytochemistry.* 2001;57(1):65-9.
189. Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK. Volatile constituents from *Cinnamomum zeylanicum* fruit stalks and their antioxidant activities. *J Agric Food Chem.* 2003;51(15):4344-8.
190. Orav A, Stulova I, Kailas T, Müürisepp M. Effect of storage on the essential oil composition of *Piper nigrum* L. fruits of different ripening states. *J Agric Food Chem.* 2004;52(9):2582-6.
191. Basha RH, Sankaranarayanan C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. *Chem Biol Interact.* 2016;245:50-8.
192. Klauke AL, Racz I, Pradier B, Markert A, Zimmer AM, Gertsch J, et al. The cannabinoid CB₂ receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014;24(4):608-20.
193. Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:253643.
194. Galdino PM, Nascimento MV, Florentino IF, Lino RC, Fajemiroye JO, Chaibub BA, et al. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera*

- odoratissima A. St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012;38(2):276-84.
195. Ghelardini C, Galeotti N, Di Cesare Mannelli L, Mazzanti G, Bartolini A. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. *Farmaco*. 2001;56(5-7):387-9.
196. Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Saab AM, Statti GA. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. *Cell Prolif*. 2008;41(6):1002-12.
197. Legault J, Pichette A. Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *J Pharm Pharmacol*. 2007;59(12):1643-7.
198. Bento AF, Marcon R, Dutra RC, Claudino RF, Cola M, Pereira Leite DF, et al. β -Caryophyllene Inhibits Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice through CB2 Receptor Activation and PPAR γ Pathway. *The American Journal of Pathology*. 2011;178(3):1153-66.
199. Cho JY, Chang HJ, Lee SK, Kim HJ, Hwang JK, Chun HS. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of beta-caryophyllene, a sesquiterpene. *Life Sci*. 2007;80(10):932-9.
200. Fernandes ES, Passos GF, Medeiros R, da Cunha FM, Ferreira J, Campos MM, et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur J Pharmacol*. 2007;569(3):228-36.
201. Passos GF, Fernandes ES, da Cunha FM, Ferreira J, Pianowski LF, Campos MM, et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *J Ethnopharmacol*. 2007;110(2):323-33.
202. Horváth B, Mukhopadhyay P, Kechrid M, Patel V, Tanchian G, Wink DA, et al. β -Caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in a cannabinoid 2 receptor-dependent manner. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(8):1325-33.
203. Vijayalaxmi A, Bakshi V, Begum N. Anti-arthritic and antiinflammatory activity of beta caryophyllene against Freund's Complete Adjuvant induced arthritis in wistar rats. *Journal of Bone Reports and Recommendations*. 2015;1(29):1-10.
204. Cheng Y, Dong Z, Liu S. β -Caryophyllene ameliorates the Alzheimer-like phenotype in APP/PS1 Mice through CB2 receptor activation and the PPAR γ pathway. *Pharmacology*. 2014;94(1-2):1-12.
205. Wallis RS, Hafner R. Advancing host-directed therapy for tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(4):255-63.
206. Zumla A, Rao M, Parida SK, Keshavjee S, Cassell G, Wallis R, et al. Inflammation and tuberculosis: host-directed therapies. *J Intern Med*. 2014.
207. Zimmerman M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. 1983; 16:[109-10 pp.].
208. Wang JX, Bair AM, King SL, Shnyder R, Huang YF, Shieh CC, et al. Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a β 2-integrin-dependent mechanism. *Blood*. 2012;120(7):1489-98.
209. Aleman M, de la Barrera SS, Schierloh PL, Alves L, Yokobori N, Baldini M, et al. In tuberculous pleural effusions, activated neutrophils undergo apoptosis and acquire a dendritic cell-like phenotype. *J Infect Dis*. 2005;192(3):399-409.
210. Neufert C, Pai RK, Noss EH, Berger M, Boom WH, Harding CV. Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation. *J Immunol*. 2001;167(3):1542-9.

211. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995;270(22):12953-6.
212. Gorantla S, Makarov E, Roy D, Finke-Dwyer J, Murrin LC, Gendelman HE, et al. Immunoregulation of a CB2 receptor agonist in a murine model of neuroAIDS. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010;5(3):456-68.
213. Medeiros R, Passos GF, Vitor CE, Koepp J, Mazzuco TL, Pianowski LF, et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *Br J Pharmacol.* 2007;151(5):618-27.
214. Montecucco F, Lenglet S, Braunersreuther V, Burger F, Pelli G, Bertolotto M, et al. CB(2) cannabinoid receptor activation is cardioprotective in a mouse model of ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46(5):612-20.
215. Silva MT. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol.* 2010;87(1):93-106.
216. Wu M, Aung H, Hirsch CS, Toossi Z. Inhibition of Mycobacterium tuberculosis-induced signalling by transforming growth factor- β in human mononuclear phagocytes. *Scand J Immunol.* 2012;75(3):301-4.
217. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 2014;5:491.
218. Hilda JN, Narasimhan M, Das SD. Neutrophils from pulmonary tuberculosis patients show augmented levels of chemokines MIP-1 α , IL-8 and MCP-1 which further increase upon in vitro infection with mycobacterial strains. *Hum Immunol.* 2014;75(8):914-22.
219. Petrofsky M, Bermudez LE. Neutrophils from Mycobacterium avium-infected mice produce TNF-alpha, IL-12, and IL-1 beta and have a putative role in early host response. *Clin Immunol.* 1999;91(3):354-8.
220. Sawant KV, McMurray DN. Guinea pig neutrophils infected with Mycobacterium tuberculosis produce cytokines which activate alveolar macrophages in noncontact cultures. *Infect Immun.* 2007;75(4):1870-7.
221. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol.* 2013;17(3):638-50.
222. Gambardella L, Vermeren S. Molecular players in neutrophil chemotaxis--focus on PI3K and small GTPases. *J Leukoc Biol.* 2013;94(4):603-12.
223. Heit B, Robbins SM, Downey CM, Guan Z, Colarusso P, Miller BJ, et al. PTEN functions to 'prioritize' chemotactic cues and prevent 'distraction' in migrating neutrophils. *Nat Immunol.* 2008;9(7):743-52.
224. Randis TM, Puri KD, Zhou H, Diacovo TG. Role of PI3Kdelta and PI3Kgamma in inflammatory arthritis and tissue localization of neutrophils. *Eur J Immunol.* 2008;38(5):1215-24.
225. Hage CA, Abdul-Mohammed K, Antony VB. Pathogenesis of pleural infection. *Respirology.* 2004;9(1):12-5.
226. Vara D, Morell C, Rodríguez-Henche N, Diaz-Laviada I. Involvement of PPAR γ in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis.* 2013;4:e618.

227. Xu H, Cheng CL, Chen M, Manivannan A, Cabay L, Pertwee RG, et al. Anti-inflammatory property of the cannabinoid receptor-2-selective agonist JWH-133 in a rodent model of autoimmune uveoretinitis. *J Leukoc Biol.* 2007;82(3):532-41.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I - Efeito do BCP na produção de IL-12 e CCL2 na pleurisia induzida pelo BCG

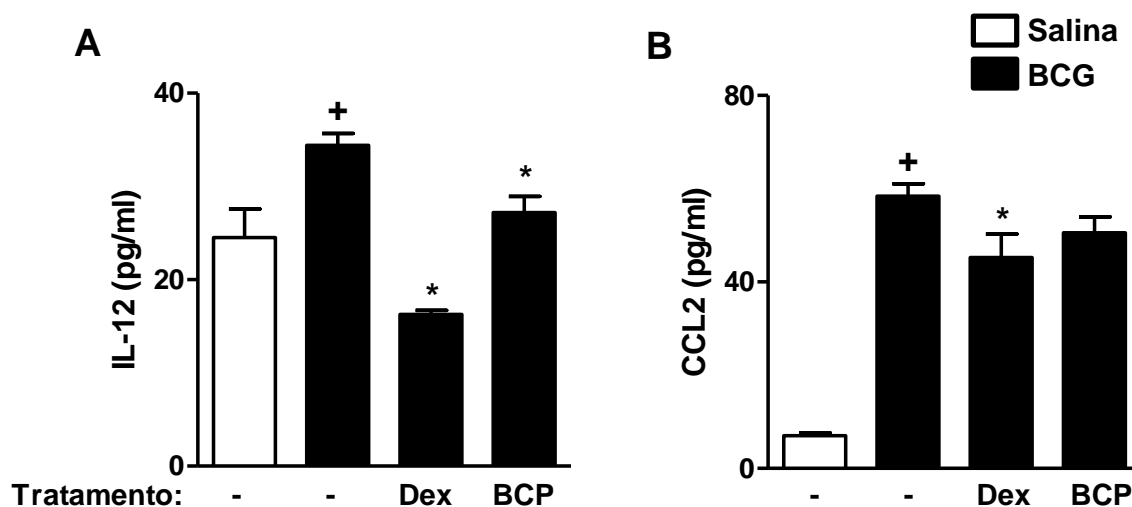


Figura ANEXO I. Efeito do BCP na produção de IL-12 e CCL2 durante a pleurisia induzida pelo BCG. Camundongos foram pré-tratados com BCP (50 mg/kg, v.o.), GP1a (10 mg/kg, i.p) ou dexametasona (Dex, 2 mg/kg, i.p) 1 h antes da injeção i.t. de BCG (4×10^5 UFC). Após 24 h, o lavado pleural foi coletado para a análise da produção de (A) IL-12 e (B) CCL2. As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*). Os grupos controles foram tratados (v.o.) apenas com veículo (água filtrada contendo 2% de DMSO) representados por (-).

9.2 ANEXO II - Avaliação da adesão de neutrófilos à células endoteliais tratadas ou não com BCP

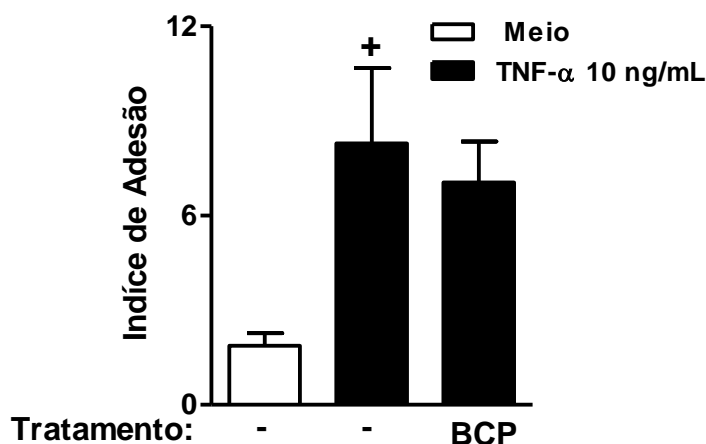


Figura ANEXO II. Avaliação da adesão de neutrófilos à células endoteliais tratadas ou não com BCP. CEs tEnd.1 foram previamente incubados com meio (RPMI) ou BCP (10 μ M) por 1 h. Em seguida as células foram estimuladas com TNF- α (10 ng/ml). Após 4 h, o estímulo foi retirado e CEs foram lavadas e incubadas com neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos por 1 h sob agitação (50 neutrófilos/tEnd.1). A adesão de neutrófilos foi quantificada por um índice de adesão como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 4 replicatas por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pela ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*. Diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre o grupo estimulado e não estimulado foram representadas por (+), já entre os grupos estimulado e tratados foram indicados por (*).

9.3 ANEXO III – Avaliação in silico da interação entre o GP1a e o PPAR γ

O ensaio in silico foi realizado pelo **Dr. Raghavendra Nulgulmnalli Manjunathiah**, especialista em química medicinal e pesquisador visitante do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Negligenciadas (INCT/IDN), Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

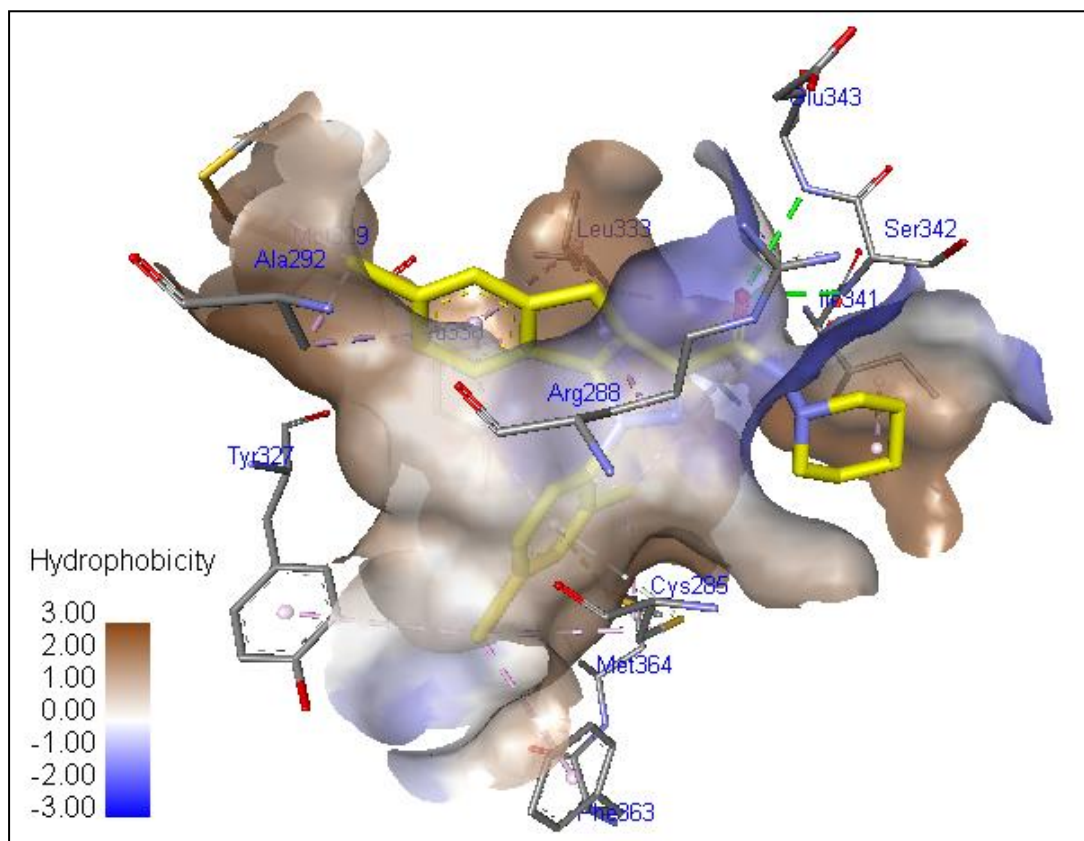


Figura ANEXO III A - Interações do GP1a com os aminoácidos no sítio de ligação do PPAR γ . O ensaio demonstrou que o **Gp1a** (em amarelo) se liga de forma eficiente ao PPAR γ com uma energia de interação de -11,2 kcal / mol. Esta energia é resultado da soma das interações das ligações de hidrogênio e de interações com aminoácidos polares e não-polares entre o PPAR γ e o GP1a . O grupo cetona do GP1a se liga aos grupamentos NH dos aminoácidos Ser342 e Glu343 por ligações de hidrogênio com uma distância de 2.8 e 3.2 Å, respectivamente. Os grupos aromáticos de GP1a foram encontrados interagir com átomos de enxofre dos aminoácidos Cis285 e Met364 do PPAR γ . Existe muitas interações hidrofóbicas entre GP1a com os aminoácidos de PPAR γ , como Tyr327, Phe363, Ala292, Leu330 e Leu333.

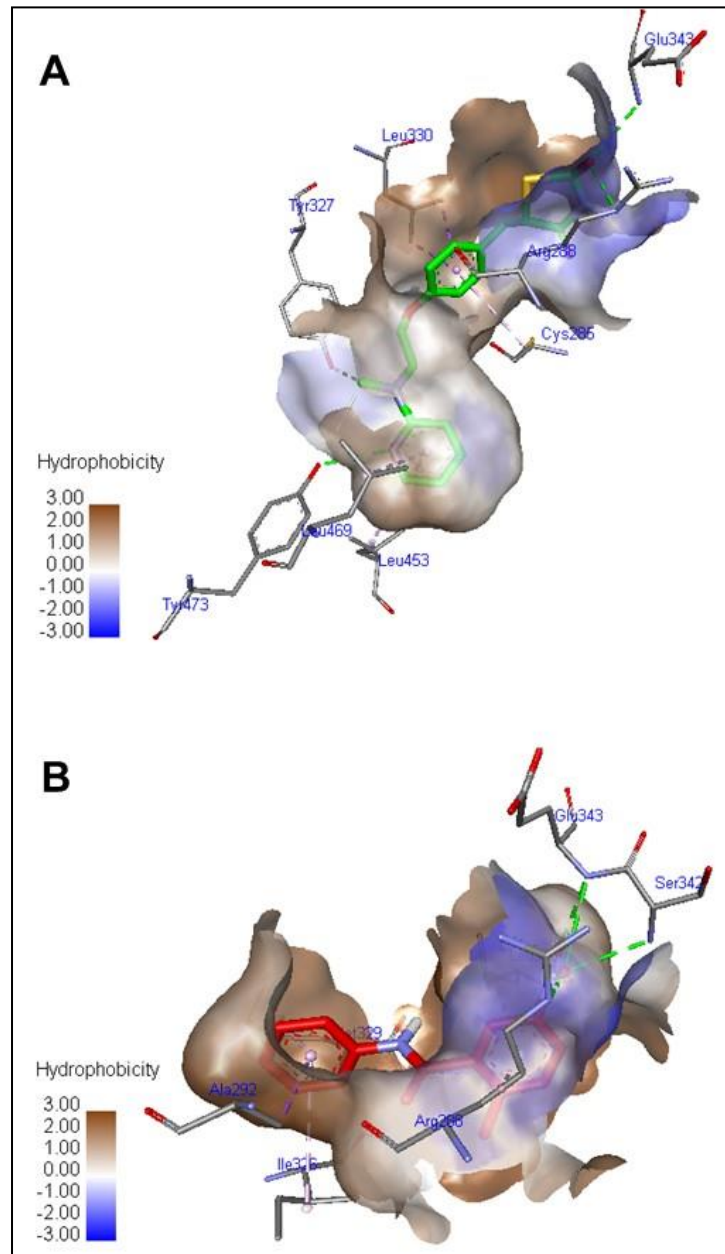


Figura ANEXO III B. Interação da rosiglitazona (A) e GW9662 (B) -com os aminoácidos no sítio de ligação do PPAR γ . (A) O grupo cetona da rosiglitazona realizou duas ligações de hidrogênio com Arg288 e Glu343 com uma distância de 3,1 e 3,0 Å, respectivamente. A terceira interação de hidrogênio foi entre o grupamento NH de pirimidina de GP1a com Tyr473 a uma distância de 3,0 Å. Os grupos aromáticos da rosiglitazona realizou interações com grupamentos alquil dos aminoácidos Leu330, Leu453, Leu469 e Cys285. A energia de ligação da rosiglitazona com PPAR γ foi de -9,4 kcal/mol. (B) O oxigênio do grupamento nitro de GW9662 fez quatro ligações de hidrogênio, sendo duas destas com o aminoácido Glu343 a uma distância de 2,97 e 3,14 Å, respectivamente. As outras duas interagiram com Arg288 e com a Ser343 a uma distância de 3,13 e 3,01 Å, respectivamente. Ainda, apresentaram interações entre os grupos aromáticos de GW9662 e grupos alquil de Ala292, Ile326, Met329, Arg288 e leu333. A energia de ligação do GW9662 com PPAR γ foi de -8,6 kcal/mol.

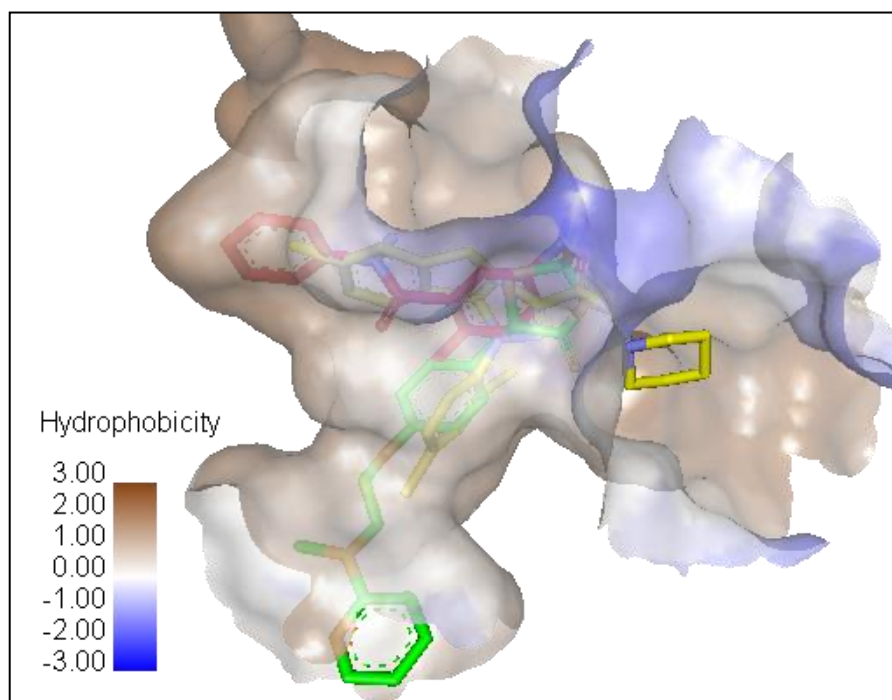



Figura ANEXO III C. GP1a, rosiglitazona e GW9662 interagem com o PPAR γ no mesmo sítio de ligação. A figura demonstra a sobreposição de GP1a (amarelo), GW9662 (vermelho) e a rosiglitazona (verde) no sítio de ligação do PPAR γ .

9.4 ANEXO IV – Artigo



The cannabinoid 2 receptor agonist β -caryophyllene modulates the inflammatory reaction induced by *Mycobacterium bovis* BCG by inhibiting neutrophil migration

Magaiver Andrade-Silva^{1,3} · Luana Barbosa Correa^{1,3} · André Luis Peixoto Candéa^{1,3} · Simone C. Cavalher-Machado¹ · Helene Santos Barbosa² · Elaine Cruz Rosas^{1,3} · Maria G Henriques^{1,3,4} 

Received: 18 April 2016/Revised: 17 June 2016/Accepted: 21 June 2016
© Springer International Publishing 2016

Abstract

Objective and design β -Caryophyllene (BCP) is a sesquiterpene that binds to the cannabinoid 2 (CB₂) receptor and exerts anti-inflammatory effects. In this study, we investigated the anti-inflammatory effect of BCP and another CB₂ agonist, GP1a in inflammatory experimental model induced by *Mycobacterium bovis* (BCG).

Methods C57Bl/6 mice were pretreated orally with BCP (0.5–50 mg/kg) or intraperitoneally with GP1a (10 mg/kg) 1 h before the induction of pleurisy or pulmonary inflammation by BCG. The direct action of CB₂ agonists on neutrophils function was evaluated in vitro.

Results β -Caryophyllene (50 mg/kg) impaired BCG-induced neutrophil accumulation in pleurisy without affecting mononuclear cells or the production of TNF- α

and CCL2/MCP-1. However, BCP inhibited CXCL1/KC, leukotriene B₄ (LTB₄), IL-12, and nitric oxide production. GP1a had a similar effect to BCP. Preincubation of neutrophils with BCP (10 μ M) impaired chemotaxis toward LTB₄ and adhesion to endothelial cells stimulated with TNF- α , and both, BCP and GP1a, impaired LTB₄-induced actin polymerization.

Conclusion These results suggest that the CB₂ receptor may represent a new target for modulating the inflammatory reaction induced by mycobacteria.

Keywords CB₂ receptor · GP1a · Neutrophil · Mycobacteria · Chemotaxis

Introduction

β -Caryophyllene (BCP) is a natural sesquiterpene found in essential oils from a variety of plant species, including medicinal plants (e.g., cinnamon, origanum, black pepper, and marijuana) [1]. BCP presents biological effects, such as antioxidant, antiviral [2–4], antifungal [5], and analgesic properties [6], in addition to an anti-inflammatory effect. BCP inhibits carrageen-induced paw edema and diminishes lipopolysaccharide-stimulated TNF- α and IL-1 β expression in peripheral blood [1, 7]. It has been shown that BCP selectively binds to the cannabinoid 2 (CB₂) receptor and acts as a full agonist [1]. CB₂ receptors are present in hematopoietic cells and predominantly mediate anti-inflammatory effects in various inflammatory conditions, such as colitis, sepsis, arthritis, peritonitis, uveitis, and cerebral ischemia [8–14]. Furthermore, it has been demonstrated that through CB₂ receptor activation, BCP ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis and cisplatin-induced nephrotoxicity, inhibiting chemokines,

Responsible Editor: John Di Battista.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00011-016-0969-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Maria G Henriques
gracahenriques@fiocruz.br

- ¹ Laboratório de Farmacologia Aplicada, Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Sizenando Nabuco 100, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21041-250, Brasil
- ² Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21040-361, Brasil
- ³ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças de Populações Negligenciadas (INCT-IDPN), Rio de Janeiro, RJ, Brasil
- ⁴ Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS), Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ 21040-361, Brasil

cytokines production, and infiltration of neutrophil and macrophage [15, 16]. However, there have been no studies addressing the effect of BCP on the inflammatory process under conditions of mycobacterium infection.

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and other members of the *M. tuberculosis* complex [17] in which the immune response plays a central role in the development and progression of pathology [18]. Over the last 20 years, several studies have aimed to elucidate the importance of the innate response during mycobacterium infection [19]. Neutrophils are the first phagocytes to appear in the tuberculous exudate, although accumulation of eosinophil, lymphocyte, and monocyte/macrophage also occurs during infection [20, 21]. It was shown that this cell accumulation is dependent on TNF- α , interferon-(INF-) γ , IL-12, LTB₄, PAF, and CCL2 production [22–25] using experimental models. However, the role of early inflammatory cell recruitment in the course of mycobacterial infection is not completely understood. In the last years, a number of compelling studies have suggested the intense inflammatory response during early mycobacterial infection can be detrimental to the host response [26–30], highlighting the importance of studies addressing the modulation of this inflammatory reaction.

In the present study, we demonstrated that BCP suppress the inflammatory reaction induced by *Mycobacterium bovis* BCG in the experimental model of infection, impairing the neutrophil influx without affecting the cytokines and chemokines produced by macrophages. The same effect was observed with GP1a, another CB₂ receptor agonist. Moreover, we evaluated, *in vitro*, the effect of BCP and GP1a on neutrophil chemotaxis, adhesion, and actin polymerization showing a direct effect on neutrophils.

Materials and methods

Materials

β -Caryophyllene (BCP), Percoll, Hank's balanced salt solution (HBSS), phosphate-buffered saline (PBS) tablets, RPMI 1640, dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium azide, ethylenediaminetetraacetic sodium salt (EDTA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and TRITC-phalloidin were all obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). GP1a was obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK). May-Grünwald and Giemsa stains were purchased from Merck (Darmstadt, Hessen, Germany). Heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) and gentamicin were obtained from

Gibco (Carlsbad, CA, USA). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD11b/CD18 monoclonal antibody (mAb), phycoerythrin (PE)-conjugated anti-Ly6G mAb (1A8), FITC-conjugated anti-CD3 mAb, and FITC, PE-conjugated isotype antibodies were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). Purified anti-murine TNF- α , IL-12, IL-10, and MCP-1/CCL2 mAbs, biotinylated anti-TNF- α , IL-12, IL-10, and MCP-1/CCL2 mAbs, and recombinant TNF- α , IL-12, and MCP-1/CCL2 were all obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). PGE₂ immuno-assay kit was procured from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA). Dexamethasone (Decadron[®] 4 mg/ml—Aché, Guarulhos, Brazil), sodium pentobarbital 3 % (Hypnol[®]—Synthec, Santana da Parnaíba, SP, Brazil), xylazine chloride 2 % (Xilazin[®]—Synthec, Santana da Parnaíba, SP, Brazil), and ketamine chloride 10 % (Cetamin[®]—Synthec, Santana da Parnaíba, SP, Brazil) were obtained from commercial sources.

Mycobacterium bovis BCG

Mycobacterium bovis BCG (Moreau strain) was provided by the Fundação Atauilho de Paiva, (Rio de Janeiro, Brazil). BCG was stored at 4 °C and resuspended in sterile saline just before use.

Animals

Male C57BL/6 mice (20–25 g) from the Oswaldo Cruz Foundation Breeding Unit (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil) were kept caged, with free access to food and fresh water, in a room with temperatures ranging from 22 to 24 °C under a 12-h light/dark cycle. The animals were housed at the Farmanguinhos experimental animal facility unit until use. All animal care and experimental procedures performed were approved by the institution's Committee on Ethics in Animal Care and Use (CEUA) (registered under the number CEUA-L0052/08) and were performed according to the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain [31].

Treatments

Mice were fasted overnight and then received BCP in doses ranging from 0.5 to 50 mg/kg orally (p.o.), diluted in filtered water with 2 % DMSO (vehicle) in a final volume of 200 μ l, either 1 h before intrathoracic injection (i.t.) of BCG or 1 h before and 24 h after intra-nasal (i.n.) stimulation with BCG. Dexamethasone (2 mg/kg) administered intraperitoneally (i.p.) was used as a reference anti-inflammatory drug, and GP1a (10 mg/kg, i.p.) was used as a positive control for CB₂ receptor activation; both were dissolved in sterile saline and administered in a final

volume of 100 μ l per animal. An equivalent volume of vehicle was given orally to the control groups.

BCG-induced pleurisy

One hour after different treatments, pleurisy was induced in C57BL/6 mice via i.t. injection of 4×10^5 CFUs of BCG in a volume of 100 μ l of sterile saline, as described previously [22, 32]. The control groups received an equal volume of sterile saline. The mice were euthanized 24 h after the application of the stimulus using a lethal dose of 3 % pentobarbital sodium (Hypnol[®]), and their thoracic cavities were washed with 0.5 ml of PBS containing EDTA (10 mM, PBS/EDTA) to obtain the pleural wash (PW). The PW was then centrifuged at $400 \times g$ for 10 min, and the supernatant was removed, aliquoted, and stored -80°C for further analysis of inflammatory mediators. The pellet was subsequently resuspended in 0.5 ml of PBS/EDTA, and total leukocyte counts were determined with an automated particle counter (Counter Z2, Beckman-Coulter Inc., Brea, CA, USA). Differential leukocyte counts were performed under light microscopy (100 \times objective lens; Olympus) in cytospin smears (Cytospin, Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA), stained by May-Grünwald Giemsa method. The counts are reported as the number of cells ($\times 10^6$) per cavity.

BCG-induced pulmonary inflammation

One hour after different treatments, mice were anesthetized with xylazine (5 mg/kg) and ketamine (30 mg/kg) intramuscularly (i.m.) and then received 1×10^6 CFUs of BCG via the i.n. route in a volume of 25 μ l of sterile saline. After 48 h, the mice were euthanized with a lethal dose of 3 % pentobarbital sodium, and a catheter was inserted into the exposed trachea. The lungs were washed twice with 800 μ l of PBS/EDTA to obtain the bronchoalveolar lavage (BAL). The control group received an equal volume of sterile saline. The BAL was processed for the analysis of total and differential leukocytes, as described for BCG-induced pleurisy.

Macrophage and neutrophil viability

The mouse cell line J774A.1 was distributed in a flat-bottomed 96-well tissue culture plate at a density of 1×10^5 cells/well in 200 μ l of supplemented RPMI (10 % FBS and 0.05 mg/ml gentamicin) and allowed to adhere. After 24 h of incubation in a controlled atmosphere (5 % CO_2 , 37°C), the cells were cultured in the presence of BCP in different concentrations (1–500 μM), Tween 20 (3 %) or medium (supplemented RPMI-0.05 % DMSO). After 20 h, 20 μ l of MTT solution (5 mg/ml in PBS) was added to each well,

followed by incubation for 4 h at 37°C . The supernatant was then discarded, and 200 μ l of DMSO was added per well for formazan crystal solubilization, followed by reading the absorbance at 540 nm using a microplate reader (SpectraMax M5, molecular devices, Sunnyvale, CA, USA).

Neutrophils isolated from C57BL/6 mouse bone marrow were purified using discontinuous Percoll gradients then washed and resuspended in supplemented RPMI. Neutrophil viability was subsequently estimated via the trypan blue exclusion method before each experiment.

Macrophage culture and in vitro stimulation

Murine macrophages from the J774A.1 cell line were distributed in 24-well tissue culture plates at the density of 1×10^5 cells/well in 500 μ l of supplemented RPMI and were maintained overnight at 37°C under 5 % CO_2 to allow them to adhere prior to the application of the stimulus. BCG was added in each macrophage to obtain a ratio of three mycobacteria per macrophage (MOI 3:1). After 6 h, the cells were washed three times with serum-free RPMI, followed by incubation with BCP (100 μM) or dexamethasone (0.05 μM). After 24 h, the supernatants were recovered and centrifuged at $400 \times g$ for 10 min at 4°C . The cell-free supernatants were stored at -80°C for the analysis of pro-inflammatory mediators.

Measurement of cytokines, chemokines, NO, and PGE_2

The production of CXCL1/KC, TNF- α , IL-12, CCL2/MCP-1, and IL-10 in the cell-free PW or the supernatant from in vitro-stimulated macrophages was measured in a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using matched antibody pairs from R&D systems, according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as picograms per millilitre (pg/ml).

The amount of nitrite, a metabolite of nitric oxide (NO), was determined in the cell-free PW and the supernatant from stimulated macrophages via the Griess method. Absorbance was read at 540 nm using a microplate reader (SpectraMax M5, molecular devices, Sunnyvale, CA, USA). The concentration of nitrite was calculated from a sodium nitrite standard curve (range 1.5–100 μM).

LTB_4 and PGE_2 levels in the supernatants from stimulated macrophages were evaluated in an immunosorbent assay (EIA) according to the manufacturer's protocols (Cayman Chemical Co.). The results were expressed as pg/ml.

Flow cytometry analysis

Cells recovered from the pleural cavity ($10^6/100 \mu\text{l}$) were incubated with the appropriate concentration of a FITC-

conjugated anti-CD11b/CD18 monoclonal antibody (mAb), PE-conjugated anti-Ly6G mAb, FITC-conjugated, anti-CD3 mAb, or FITC- and PE-conjugated isotype antibodies for 30 min at 4 °C after blocking nonspecific binding sites with PBS plus 10 % FBS, 0.1 % sodium azide and anti-CD16/CD32. The cells were analyzed using a FACS Calibur flow cytometer (Becton–Dickinson, San Jose, USA), and surface marker analysis was performed using the FlowJo Software version 7.6.5 (FlowJo, USA). At least, 5×10^4 cells were analyzed per sample. All data were collected and displayed on a log scale of increasing fluorescence intensity and are presented as dotplots or histograms. The percentage of Ly6G⁺/CD11b⁺ cells was determined in a specific Ly6G gate. The analysis of CD3⁺ was realized at a gate set for forward and side scatter, with a low fluorescence intensity. Counts are reported as cell numbers after multiplying the percentage of Ly6G/CD11b⁻ and CD3⁺ cells by the total number of leukocytes.

Neutrophil chemotaxis

Neutrophils isolated from C57BL/6 mouse bone marrow were purified using discontinuous Percoll gradients, then washed and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10 % FBS and assayed in a 48-well microchemotaxis Boyden chamber (Neuroprobe Inc., Gaithersburg, MD, USA). The bottom wells of the chamber were filled with 28 µl of the chemoattractant stimulus LTB₄ (10^{-7} M) or RPMI, whereas the upper wells (separated with a 3 µm polycarbonate filter; Nuclepore, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were filled with neutrophils (10^5 cells in 50 µl) that had been previously incubated with BCP (10 µM), dexamethasone (50 nM) or RPMI for 1 h. The chamber was incubated in humidified air with a 5 % CO₂ atmosphere at 37 °C for 1 h. The filter was fixed and stained via the Wright–Giemsa method. Cells that migrated through the filter were counted under light microscopy (100× lens objective; Olympus) in five random high-power fields (HPFs). Neutrophil chemotaxis was calculated and expressed as the mean number of migrated cells in five random HPFs per well (in quadruplicate).

Neutrophil adhesion assay

The adhesion assay was performed as described by [33], modified for neutrophil adhesion in the present study. The murine thymic endothelioma cell line tEnd.1 was cultured in supplemented RPMI. The cells were plated in culture chambers (10^4 cells/well) (Lab-Tek[®] chambers, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) for 24 h at 37 °C in a humidified incubator containing 5 % CO₂. Then, the cells were stimulated for 4 h with recombinant murine TNF-α (rmTNF-α, 10 ng/ml) and

subsequently washed to remove the TNF-α solution. Neutrophils isolated from the bone marrow of naïve C57BL/6 mice were pretreated with BCP (10 µM) for 1 h. The pretreated neutrophils were washed and allowed to adhere to the tEnd.1 cultures (50 neutrophils per tEnd.1 cell) for 1 h at 37 °C under shaking. Non-adherent cells were gently washed out with PBS, and the remaining cells were subsequently stained using the May–Grünwald Giemsa method. The number of adherent neutrophils per tEnd.1 cell was determined by direct counting under light microscopy (100× objective lens, Olympus). The data are expressed as an association index which was calculated as follows: index of adhesion = (tEnd.1 cells with bound neutrophils) × (total number of tEnd.1 cells)⁻¹ × (neutrophils bound to tEnd.1 cells) × (total number of tEnd.1 cells)⁻¹ × 100.

Actin polymerization

Purified bone marrow neutrophils were incubated with BCP (10 µM) for 1 h, followed by stimulation with LTB₄ (10^{-7} M) at 37 °C for 5 min in RPMI. The reaction was stopped with 2 % paraformaldehyde, and the neutrophils were subjected to cytocentrifugation on glass slides (10^5 neutrophils/glass slide) (Cytospin, Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA). The neutrophil smears were fixed with 4 % paraformaldehyde (20 min), followed by permeabilization with TritonX-100 (0.25 %; 30 min) and staining with TRITC-phalloidin (1:500). The nuclei were stained using DAPI. The analysis of fluorescent images was performed via fluorescence microscopy. The mean intensity of fluorescence (MFI) was determined through measurement of the fluorescence of individual cells using the NIS-Elements software 4.2. (Nikon Inc., USA). The cells in at least five randomly chosen fields on each slide were analyzed, with three slides being examined per group.

Statistical analysis

Results are reported as the mean ± SEM and were statistically analyzed by means of the analysis of variance (ANOVA), followed by the Newman–Keuls–Student test. Values of $p \leq 0.05$ were regarded as significant.

Results

β-Caryophyllene inhibits cell migration and the production of pro-inflammatory mediators in BCG-induced inflammation

To address the involvement of BCP in the mycobacterium-induced inflammatory process, C57BL/6 mice were treated

orally with BCP, 1 h before BCG stimulus. Initially, BCP dose–response curves were constructed (0.5–50 mg/kg; 1 h before BCG), and based on these curves, the threshold dose was defined (Online Resource Fig. S1).

Experimentally mycobacterium infection is characterized by an early influx of neutrophils, followed by monocytes, lymphocytes, and eosinophils recruitment [22, 24, 34, 35]. Accordingly, a significant cell recruitment was triggered at 24 h of BCG injection with neutrophils and mononuclear cells representing the majority of recruited cells (Fig. 1). Treatment with BCP (50 mg/kg) significantly decreased the number of total leukocytes (Fig. 1a) predominantly neutrophils into the pleural cavity (Fig. 1d). However, BCP pretreatment failed to inhibit mononuclear cells accumulation (Fig. 1b). We compared the effect of this sesquiterpene with GP1a, another CB₂ receptor agonist. As observed in Fig. 1a, GP1a inhibited total leukocyte migration (Fig. 1a) (mainly neutrophils; Fig. 1d) and did not alter mononuclear cell numbers (Fig. 1b). Confirming these findings, neither BCP nor GP1a were able to inhibit the CD3⁺ cell accumulation induced by BCG (Fig. 1c). The analysis of subtypes of CD3⁺ cell showed that BCG i.t. injection induced an increase in CD3/CD4 and CD3/CD8 positive cells; however, the pretreatment with GP1a or BCP did not affect the accumulation of these cells (Online Resource Fig. S2a, b). We confirmed the effects of BCP and GP1a in another set of experiments, analyzing the cells positive for Ly6G/CD11b (a marker of neutrophils) recovered from the pleural cavity. As expected, BCP reduced the number of Ly6G/CD11b⁺ cells in the pleural cavity (Fig. 1e, g) as well as CD11b expression on the cell surface, as revealed by the MFI (Fig. 1f, h).

Reinforcing these findings, the effects of BCP on the pulmonary inflammation were also investigated. As shown in Online Resource Fig. S3, oral pretreatment with BCP induced remarkable inhibition of the influx of total leukocytes (Online Resource Fig. S3a) and neutrophils (Online Resource Fig. S3b) into the lungs at 48 h after treatment with BCG.

Herein, we observed that the CB₂ agonists inhibited the neutrophils accumulation in BCG-induced pleurisy and pulmonary inflammation; therefore, we investigated the production of mediators involved in the neutrophils recruitment. As described previously [23, 24, 34], the i.t. injection of BCG increases the production of LTB₄, TNF- α , and NO and also raised CXCL1/KC levels in pleural cavity at 24 h (Fig. 2).

Pretreatment with BCP (50 mg/kg) reduced CXCL1/KC (Fig. 2a), LTB₄ (Fig. 2b), and NO (Fig. 2c) production, nonetheless did not inhibited the production of TNF- α (Fig. 2d), whereas dexamethasone (2 mg/kg) reduced the levels of all cytokines (Fig. 2a–d). Confirming these findings, treatment with GP1a also inhibits CXCL1/KC, LTB₄, and NO production but did not inhibit TNF- α production (Fig. 2a–d).

Macrophages and lymphocytes play a pivotal role in host response against mycobacteria, producing cytokines and chemokines, which are involved in neutrophil activation and induce the recruitment of new inflammatory cells to infected sites. Although we did not observe a difference in mononuclear or T cells, we further investigated the production of mediators involved in the activation of these cells. Online Resource Fig. S2 shows that the levels of IL-12 and CCL2 are increased in BCG pleural wash and that the pretreatment with BCP reduced the levels of IL-12 but not CCL2. On the other hand, the i.p. administration of dexamethasone inhibited the levels of both inflammatory mediators.

The direct effect of BCP on CCL2, IL-12, IL-10, TNF- α , PGE₂, and NO produced by macrophages (J774A.1) stimulated by BCG was investigated; however, no significant differences in the levels of these mediators were observed compared with the untreated group (Online Resource Table S1). It is important to note that the incubation of macrophages with BCP did not cause cellular toxicity at doses ranging from 1 to 100 μ M (Online Resource Table S2).

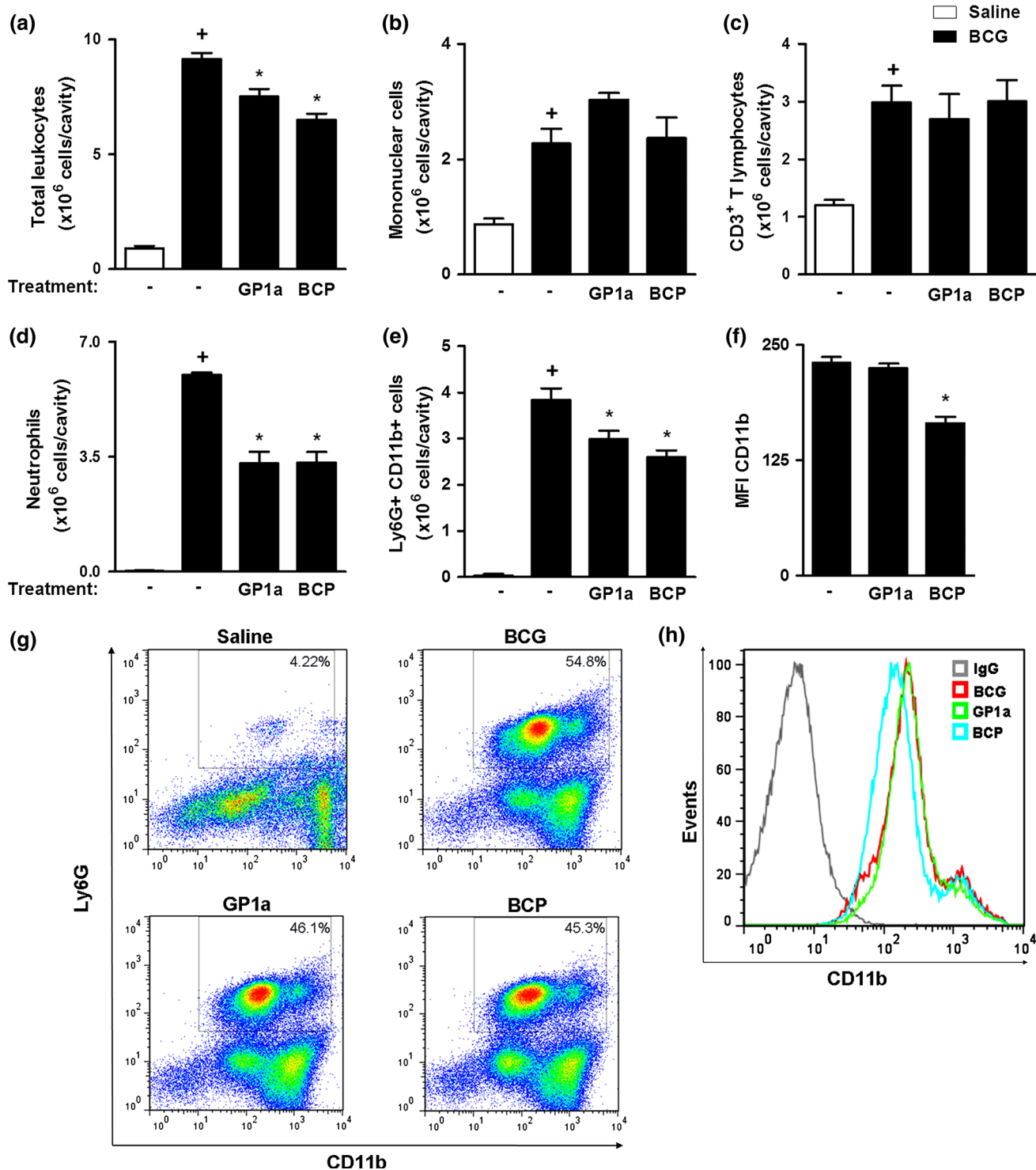
BCP inhibits cellular events involved in neutrophil migration

The direct effects of BCP on neutrophil chemotaxis, adhesion, and cell polarization in vitro were assessed. Neutrophil viability (≥ 95 %) was confirmed in trypan blue assays after neutrophils were incubated for 1 h with BCP. As shown in Fig. 3a, pretreatment of neutrophils with 1 or 10 μ M BCP significantly reduced neutrophil chemotaxis toward LTB₄. In addition, BCP (10 μ M) impaired the adhesion of neutrophils to endothelial cells stimulated by TNF- α , as shown in representative images and by the adhesion index (Fig. 3b, c).

Actin polymerization is required for effective directional neutrophil migration [36, 37]. The effect of BCP on actin polymerization induced by LTB₄ was evaluated, and representative fluorescent images and results are shown in Fig. 4. Nuclei were stained using DAPI. The actin polymerization induced by LTB₄ (10⁻⁷ M) was inhibited by the preincubation of neutrophils with BCP (10 μ M) or GP1a (10 μ M), as reference CB₂ receptor agonist (Fig. 4a fluorescence images and Fig. 4b median fluorescence intensity analysis).

Discussion

Agonists of the cannabinoid CB₂ receptor have been shown to ameliorate inflammatory conditions, such as colitis, renal inflammation, and paw edema [7, 15, 16, 38].



However, there have been no studies addressing CB₂ activation in the inflammatory reaction induced by mycobacteria. In the present work, we demonstrated the effects of two CB₂ agonists, BCP and GP1a, in two different experimental models of inflammation induced by *M. bovis* BCG.

The i.t. injection of BCG induces an inflammatory reaction characterized by an early intense influx of leukocytes, such as neutrophils, monocytes, lymphocytes, and eosinophils, within 24 h [22, 23]. Herein, we demonstrated that pretreatment with BCP or GP1a inhibited the neutrophil influx in this reaction, inhibiting CXCL1/KC, LTB₄,

Fig. 1 Effect of BCP pretreatment on cell accumulation in BCG-induced pleurisy. Pleural stimulation with BCG (4×10^5 CFU/cavity) was administered via i.t. injection 1 h after treatment with BCP (50 mg/kg, p.o.) or GP1a (10 mg/kg, i.p.). After 24 h, the pleural wash (PW) was collected for the analysis of **a** total leukocytes, **b** mononuclear cells, **c** T CD3⁺ lymphocytes, **d** neutrophils, and **e** Ly6G⁺CD11b⁺ cells. **f** Median fluorescence intensity (MFI) of the cells expressing CD11b by Ly6G⁺CD11b⁺ was evaluated. **g** Representative dot plots of the number of Ly6G⁺CD11b⁺ cells in the pleural cavity. **h** Representative histogram of CD11b expression in Ly6G⁺CD11b⁺ cells. The selective CB₂ agonist GP1a was used as a positive control for CB₂ activation in this reaction. The control groups were either orally treated with vehicle alone (filtered water-DMSO 2 %) or injected (i.t.) with the same volume of sterile saline. The results are expressed as the mean \pm SEM from at least six animals per group and are representative of three separate experiments. ⁺ $P \leq 0.05$, significant differences between the stimulated (BCG) and non-stimulated groups; * $P \leq 0.05$, significant differences between the treated and stimulated (BCG) groups

and NO production. However, neither BCP nor GP1a inhibited monocytes, lymphocytes or the production of TNF- α and CCL2. Moreover, we confirmed the effects of BCP on neutrophil accumulation during pulmonary inflammation induced via i.n infection with BCG. Some studies have demonstrated the inhibitory effect of BCP on neutrophil migration through an indirect method, such as the reduction of myeloperoxidase (MPO) [7, 15, 16, 38]. In the current work, the number of neutrophils involved in

BCG-induced inflammation was quantified using light microscopy or through the analysis of CD11b/Ly6G-positive cells by flow cytometry. In accordance with our results, the previous studies have shown that CB₂ activation can decrease neutrophil migration to the lungs in a sepsis model [9], to the infarcted myocardium [39], and to the brain in cerebral ischemia [10]. In addition, a CB₂ agonist reduced the influx of Ly6G-positive cells during chronic colitis in mice [8]. Neutrophils contribute to the early control of mycobacterial infections due to phagocyte recruitment and the release potent inflammatory mediators at the infected site [40]. Nevertheless, excessive neutrophil accumulation is associated with increased damage in lung tissues from patients with active TB or experimental models of mycobacterial infection [28, 41, 42]. In addition, neutrophils infected by BCG are phagocytosed by macrophages, inducing increases in lipid body formation and PGE₂, TGF- β [27], and IL-10 production [43], contributing to mycobacterial survival by promoting an anti-inflammatory environment. In this context, it is important to study the mechanisms involved in neutrophil accumulation during mycobacteria infection and the immunomodulation of this event.

Inflammatory mediators are critically involved in leukocyte recruitment during mycobacterial infection. In *M. bovis* BCG-induced pleurisy, there is an influx of

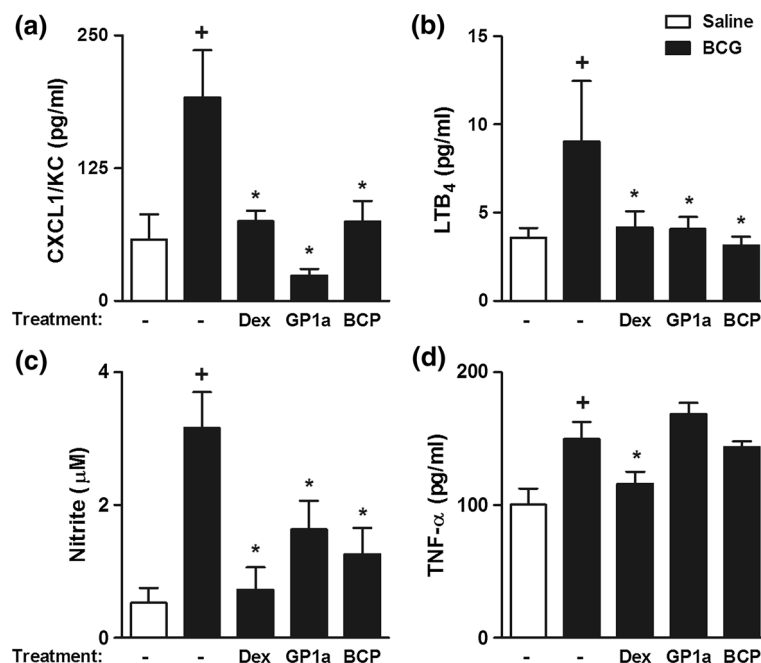


Fig. 2 Effects of BCP on inflammatory mediator production induced by BCG-induced pleurisy. The levels of **a** CXCL1/KC, **b** LTB₄, **c** NO, and **d** TNF- α were determined in pleural washes recovered from mice pretreated with BCP (50 mg/kg, p.o.), dexamethasone (Dex, 2 mg/kg, i.p.) or GP1a (10 mg/kg, i.p.) after 24 h of BCG-induced pleurisy. Levels of cytokines and chemokines were quantified

by ELISA, and NO production was measured using the Griess method. Dex was employed as a reference inhibitor. The results are expressed as the mean \pm SEM from at least six animals (in vivo). ⁺ $P \leq 0.05$, significant differences between the stimulated (BCG) and non-stimulated groups; * $P \leq 0.05$, significant differences between the treated and stimulated (BCG) groups

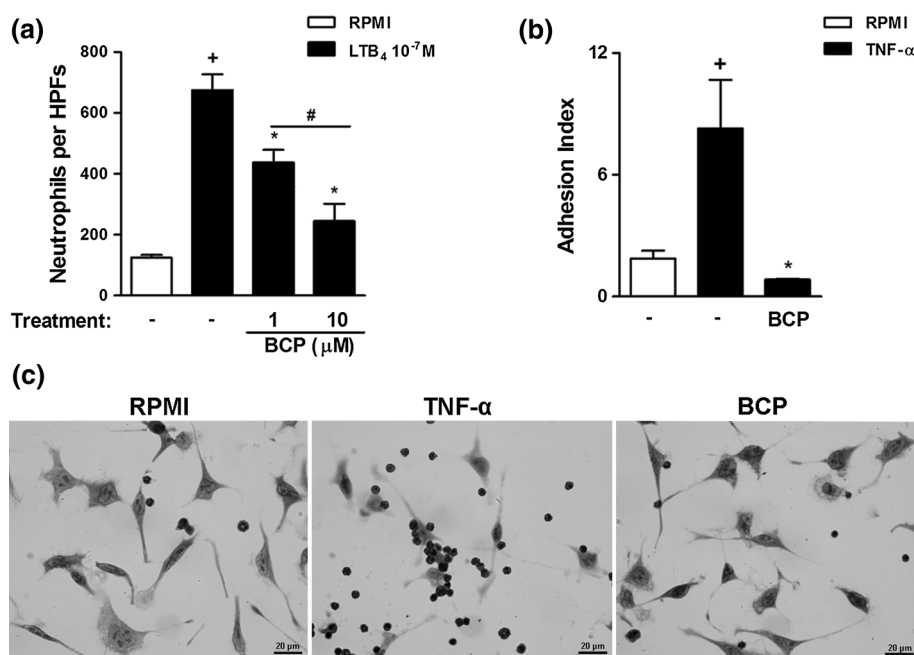


Fig. 3 Effect of BCP on neutrophil chemotaxis and adhesion. **a** Neutrophils recovered from mouse bone marrow were pre-incubated for 1 h with medium (RPMI) or BCP (1 and 10 μM) and allowed to migrate toward LTB₄ (10^{-7} M) for 1 h in a Boyden Chamber at 37 °C. The migrated cells were counted under light microscopy. **b** Neutrophils were pre-incubated with medium or BCP (10 μM) and allowed to adhere to previously stimulated tEnd.1 cells (50 neutrophils/tEnd.1 cell) for 1 h. Quantification of neutrophil adhesion was performed using an association index calculated as

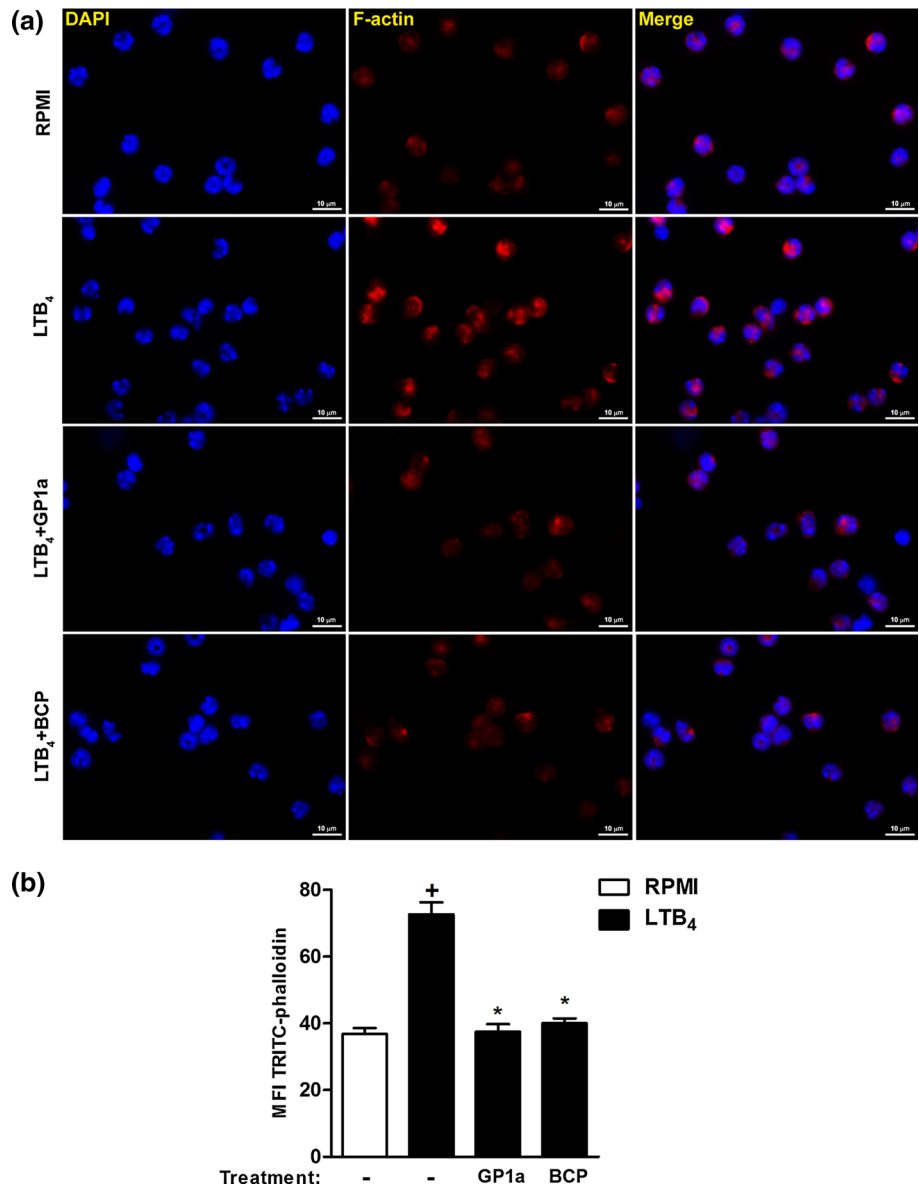
described in the Materials and Methods. **c** Representative images of adherent neutrophils on stimulated tEnd.1 cells. Original magnification, $\times 100$. Bars 25 μm . The results are expressed as the mean \pm SEM from quadruplicate wells in each group in each experiment and are representative of two separate experiments. ⁺ $P \leq 0.05$, significant differences between the stimulated and non-stimulated groups; ^{*} $P \leq 0.05$, significant differences between the treated and stimulated (BCG) groups, [#] $P \leq 0.05$, significant differences between the treated groups

neutrophils and lymphocytes into pleural cavity at 24 h after stimulation. This neutrophil migration is dependent on TNF- α and NO production, while lymphocyte accumulation is mediated by INF- γ , IL-12, LTB₄, and CCL2 [22–25]. Pretreatment with BCP inhibited CXCL1/KC, LTB₄, NO, and IL-12 during pleurisy. Conversely, inflammatory mediators that are mainly produced by macrophages, such as CCL2 and TNF- α , showed no change. It is noteworthy that the pretreatment with GPIa had a similar effect of inhibiting CXCL1/KC, LTB₄, and NO but not TNF- α . On the other hand, it has been shown that a CB₂ agonist can inhibit the production of pro-inflammatory mediators, such as TNF- α , CXCL1/KC, CXCL2, and IL-6 in murine macrophages stimulated with LPS in vitro [15, 44]. These findings highlight the importance of further investigating the role of CB₂ agonists in the production of pro-inflammatory mediators by macrophages stimulated with BCG. The effects of BCP on mycobacterial infection could also be explained by the impairment of neutrophil migration into infected tissue, as neutrophils at the infectious site release inflammatory mediators and contribute to macrophage activation, thereby amplifying the inflammatory reaction [45]. Thus, we analyzed the

direct effect of BCP on events involved in neutrophil migration.

Important events associated with neutrophil migration include the interaction of these cells with vascular endothelial cells and chemotaxis [46]. BCP impairs neutrophil adhesion to endothelial cells activated by TNF- α and neutrophil chemotaxis toward LTB₄. In the present study, the BCP pretreatment of the murine vascular endothelial cell line (tEnd.1) before TNF- α priming did not attenuate neutrophil adhesion (data not shown), suggesting that the effect of BCP is limited to neutrophils. In addition, we demonstrated that BCP pretreatment reduced the expression of integrin CD11b/CD18 on the neutrophil surface. This set of results indicates that BCP may directly interfere with neutrophil migration. Studies have shown that a CB₂ agonist can attenuate the leukocyte–endothelial interaction and reduce the expression of molecules involved in adhesion, such as ICAM-1 and VCAM-1, in endothelial cells stimulated by TNF- α [47, 48]. It was also demonstrated that pretreatment with JWH-133, another CB₂ agonist, inhibited neutrophils chemotaxis induced by CXCL2 [10]. These reports demonstrate that CB₂ agonists can inhibit cell adhesion by acting directly on endothelial cells or on leukocytes.

Fig. 4 Effect of BCP on murine neutrophil F-actin polymerization. Neutrophils from murine bone marrow were incubated with medium or BCP (10 μ M) for 1 h before stimulation with LTB₄ (10⁻⁷ M). F-actin was labelled with TRITC-phalloidin (red), and nuclei were stained using DAPI (blue). Cytoskeleton polymerization was determined based on immunofluorescence. **a** Representative fluorescent images. **b** Quantification of the mean fluorescence intensity (MFI). The results are expressed as the mean \pm SEM of three slides per group (five random fields each) and are representative of two separate experiments. ⁺*P* \leq 0.05, significant differences between the stimulated and non-stimulated groups; **P* \leq 0.05, significant differences between the treated and stimulated (LTB₄) groups



During chemotaxis, actin polymerization is required for effective directional cell migration. In the present study, we observed that BCP and GP1a inhibited neutrophil recruitment both in vivo and in vitro and reduced actin polymerization. This finding suggests that the inhibition of actin polymerization may be one of the mechanisms by which BCP and GP1a impair the neutrophil influx. Activation of CB₂ with a synthetic agonist inhibited neutrophil recruitment toward CXCL2 in chemotaxis assays by increasing p38 MAPK phosphorylation [10]. Activation of p38 indirectly inhibits the activity of phosphatidylinositol-3-OH kinase [PI(3)K], which is one of kinases involved in actin polymerization [49]. RhoA is one of the molecules implicated in cytoskeletal reorganization and cell migration. CB₂ ligands disrupt polarization and migration in a

RhoA-dependent manner in human neutrophils stimulated with fMLP [50]. Although there is some evidence of the molecular mechanisms by which CB₂ activation inhibits neutrophil polarization and migration, further studies are needed.

In summary, our findings provide evidence, for the first time, that CB₂ agonists modulate early inflammatory events induced by mycobacteria, by inhibiting neutrophil mobilization and migration. Our findings suggest that the activation of the CB₂ receptor may offer a novel target for modulating the inflammatory response, and especially neutrophil migration, during mycobacterium infection.

Acknowledgments This work was supported by the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) Sediadas 32/2013), Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 305986/2014-7 and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) PROCAD 149/2007. M. A. Silva and L. B. Correa are students of the Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular from Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflicts of interests.

References

- Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen JZ, Xie XQ, et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:9099–104.
- Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evid Based Complement Altern Med*. 2011;2011:253643.
- Basha RH, Sankaranarayanan C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. *Chem Biol Interact*. 2016;245:50–8.
- Hammami S, Jmii H, Mokni RE, Khmiri A, Faidi K, Dhaouadi H, et al. Essential oil composition, antioxidant, cytotoxic and antiviral activities of *teucrium pseudochamaepitys* growing spontaneously in Tunisia. *Molecules*. 2015;20:20426–33.
- Asdadi A, Hamdouch A, Oukacha A, Moutaj R, Gharby S, Harhar H, et al. Study on chemical analysis, antioxidant and in vitro antifungal activities of essential oil from wild *Vitex agnus-castus* L. seeds growing in area of argan tree of Morocco against clinical strains of *Candida* responsible for nosocomial infections. *J Mycol Med*. 2015;25:e118–27.
- Klauke AL, Racz I, Pradier B, Markert A, Zimmer AM, Gertsch J, et al. The cannabinoid CB₂ receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2014;24:608–20.
- Fernandes ES, Passos GF, Medeiros R, da Cunha FM, Ferreira J, Campos MM, et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur J Pharmacol*. 2007;569:228–36.
- Singh UP, Singh NP, Singh B, Price RL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Cannabinoid receptor-2 (CB₂) agonist ameliorates colitis in IL-10(–/–) mice by attenuating the activation of T cells and promoting their apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;258:256–67.
- Tschöp J, Kasten KR, Nogueiras R, Goetzman HS, Cave CM, England LG, et al. The cannabinoid receptor 2 is critical for the host response to sepsis. *J Immunol*. 2009;183:499–505.
- Murikinati S, Jüttler E, Keinert T, Ridder DA, Muhammad S, Waibler Z, et al. Activation of cannabinoid 2 receptors protects against cerebral ischemia by inhibiting neutrophil recruitment. *FASEB J*. 2010;24:788–98.
- Klein TW. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:400–11.
- Toguri JT, Lehmann C, Laprairie RB, Szczesniak AM, Zhou J, Denovan-Wright EM, et al. Anti-inflammatory effects of cannabinoid CB₂ receptor activation in endotoxin-induced uveitis. *Br J Pharmacol*. 2014;171:1448–61.
- Fukuda S, Kohsaka H, Takayasu A, Yokoyama W, Miyabe C, Miyabe Y, et al. Cannabinoid receptor 2 as a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014;15:275.
- Smith SR, Denhardt G, Terminelli C. The anti-inflammatory activities of cannabinoid receptor ligands in mouse peritonitis models. *Eur J Pharmacol*. 2001;432:107–19.
- Bento AF, Marcon R, Dutra RC, Claudino RF, Cola M, Pereira Leite DF, et al. β -Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB₂ receptor activation and PPAR γ pathway. *Am J Pathol*. 2011;178:1153–66.
- Horváth B, Mukhopadhyay P, Kechrid M, Patel V, Tanchian G, Wink DA, et al. β -Caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in a cannabinoid 2 receptor-dependent manner. *Free Radic Biol Med*. 2012;52:1325–33.
- Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet*. 2011;378:57–72.
- O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:475–527.
- Berrington WR, Hawn TR. *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev*. 2007;219:167–86.
- Antony VB, Sahn SA, Antony AC, Repine JE. *Bacillus Calmette-Guérin*-stimulated neutrophils release chemotaxins for monocytes in rabbit pleural spaces and in vitro. *J Clin Invest*. 1985;76:1514–21.
- Kasahara K, Sato I, Ogura K, Takeuchi H, Kobayashi K, Adachi M. Expression of chemokines and induction of rapid cell death in human blood neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 1998;178:127–37.
- Menezes-de-Lima-Júnior O, Werneck-Barroso E, Cordeiro RS, Henriques MG. Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin in mouse pleurisy. *J Leukoc Biol*. 1997;62:778–85.
- Souza MC, Penido C, Costa MF, Henriques MG. Mechanisms of T-lymphocyte accumulation during experimental pleural infection induced by *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*. 2008;76:5686–93.
- Penido C, Vieira-de-Abreu A, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Role of monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine ligand 2 on gamma delta T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *J Immunol*. 2003;171:6788–94.
- Costa MF, de Souza-Martins R, de Souza MC, Benjamim CF, Piva B, Diaz BL, et al. Leukotriene B₄ mediates gammadelta T lymphocyte migration in response to diverse stimuli. *J Leukoc Biol*. 2010;87:323–32.
- Eruslanov EB, Lyadova IV, Kondratieva TK, Majorov KB, Scheglov IV, Orlova MO, et al. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun*. 2005;73:1744–53.
- D'Avila H, Roque NR, Cardoso RM, Castro-Faria-Neto HC, Melo RC, Bozza PT. Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. *Cell Microbiol*. 2008;10:2589–604.
- Marzo E, Vilaplana C, Tapia G, Diaz J, Garcia V, Cardona PJ. Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2014;94:55–64.
- Dorhoi A, Kaufmann SH. Versatile myeloid cell subsets contribute to tuberculosis-associated inflammation. *Eur J Immunol*. 2015;45:2191–202.
- Dorhoi A, Kaufmann SH. Pathology and immune reactivity: understanding multidimensionality in pulmonary tuberculosis. *Semin Immunopathol*. 2016;38:153–66.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16:109–10.
- Henriques MG, Weg VB, Martins MA, Silva PM, Fernandes PD, Cordeiro RS, et al. Differential inhibition by two tetrazepine PAF

- antagonists of acute inflammation in the mouse. *Br J Pharmacol.* 1990;99:164–8.
33. Ferraris FK, Moret KH, Figueiredo AB, Penido C, Henriques M. Gedunin, a natural tetranortriterpenoid, modulates T lymphocyte responses and ameliorates allergic inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2012;14:82–93.
 34. Werneck-Barroso E, Moura AC, Monteiro MM, de Menezes Lima O Jr, de Meirelles MN, Henriques MG. Distinct ability to accumulate eosinophils during the inflammatory cellular response to *M. bovis* BCG in the mouse pleural cavity. *Inflamm Res.* 2000;49:206–13.
 35. Aleman M, de la Barrera SS, Schierloh PL, Alves L, Yokobori N, Baldini M, et al. In tuberculous pleural effusions, activated neutrophils undergo apoptosis and acquire a dendritic cell-like phenotype. *J Infect Dis.* 2005;192:399–409.
 36. Afonso PV, Janka-Junttila M, Lee YJ, McCann CP, Oliver CM, Aamer KA, et al. LTB4 is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis. *Dev Cell.* 2012;22:1079–91.
 37. Niggli V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:1619–38.
 38. Medeiros R, Passos GF, Vitor CE, Koepp J, Mazzuco TL, Pianowski LF, et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *Br J Pharmacol.* 2007;151:618–27.
 39. Montecucco F, Lenglet S, Braunersreuther V, Burger F, Pelli G, Bertolotto M, et al. CB(2) cannabinoid receptor activation is cardioprotective in a mouse model of ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46:612–20.
 40. Lowe DM, Redford PS, Wilkinson RJ, O'Garra A, Martineau AR. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? *Trends Immunol.* 2012;33:14–25.
 41. Gopal R, Monin L, Torres D, Slight S, Mehra S, McKenna KC, et al. S100A8/A9 proteins mediate neutrophilic inflammation and lung pathology during tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188:1137–46.
 42. Yeremeev V, Linge I, Kondratieva T, Apt A. Neutrophils exacerbate tuberculosis infection in genetically susceptible mice. *Tuberculosis.* 2015;95:447–51.
 43. Zhang X, Majlessi L, Deriaud E, Leclerc C, Lo-Man R. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity.* 2009;31:761–71.
 44. Gui H, Liu X, Liu LR, Su DF, Dai SM. Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates synovitis and joint destruction in collagen-induced arthritis. *Immunobiology.* 2015;220:817–22.
 45. Sawant KV, McMurray DN. Guinea pig neutrophils infected with *Mycobacterium tuberculosis* produce cytokines which activate alveolar macrophages in noncontact cultures. *Infect Immun.* 2007;75:1870–7.
 46. Dimasi D, Sun WY, Bonder CS. Neutrophil interactions with the vascular endothelium. *Int Immunopharmacol.* 2013;17:1167–75.
 47. Rajesh M, Mukhopadhyay P, B atkai S, Hask o G, Liaudet L, Huffman JW, et al. CB2-receptor stimulation attenuates TNF- α -induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H2210–8.
 48. Ramirez SH, Hask o J, Skuba A, Fan S, Dykstra H, McCormick R, et al. Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. *J Neurosci.* 2012;32:4004–16.
 49. Heit B, Robbins SM, Downey CM, Guan Z, Colarusso P, Miller BJ, et al. PTEN functions to 'prioritize' chemotactic cues and prevent 'distraction' in migrating neutrophils. *Nat Immunol.* 2008;9:743–52.
 50. Kurihara R, Tohyama Y, Matsusaka S, Naruse H, Kinoshita E, Tsujioka T, et al. Effects of peripheral cannabinoid receptor ligands on motility and polarization in neutrophil-like HL60 cells and human neutrophils. *J Biol Chem.* 2006;281:12908–18.

The cannabinoid 2 receptor agonist β -caryophyllene modulates the inflammatory reaction induced by *Mycobacterium bovis* BCG by inhibiting neutrophil migration

Inflammation Research

Magaiver Andrade-Silva¹, Luana B. Correa¹, André Candéa¹, Simone C. Cavalher-Machado¹, Helene Santos Barbosa², Elaine Cruz Rosas^{1,3} and Maria das Graças Henriques^{1,3} *

¹*Laboratório de Farmacologia Aplicada, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Sizenando Nabuco 100, 21041-250, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil*

²*Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-361, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil*

³*Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Inovação em Doenças Negligenciadas (INCT/IDN), Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS); Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-361, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

*Corresponding author at Laboratório de Farmacologia Aplicada, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Sizenando Nabuco 100, 21041-250, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel.: +55 21 3977 2479.

E-mail address: gracahenriques@fiocruz.br

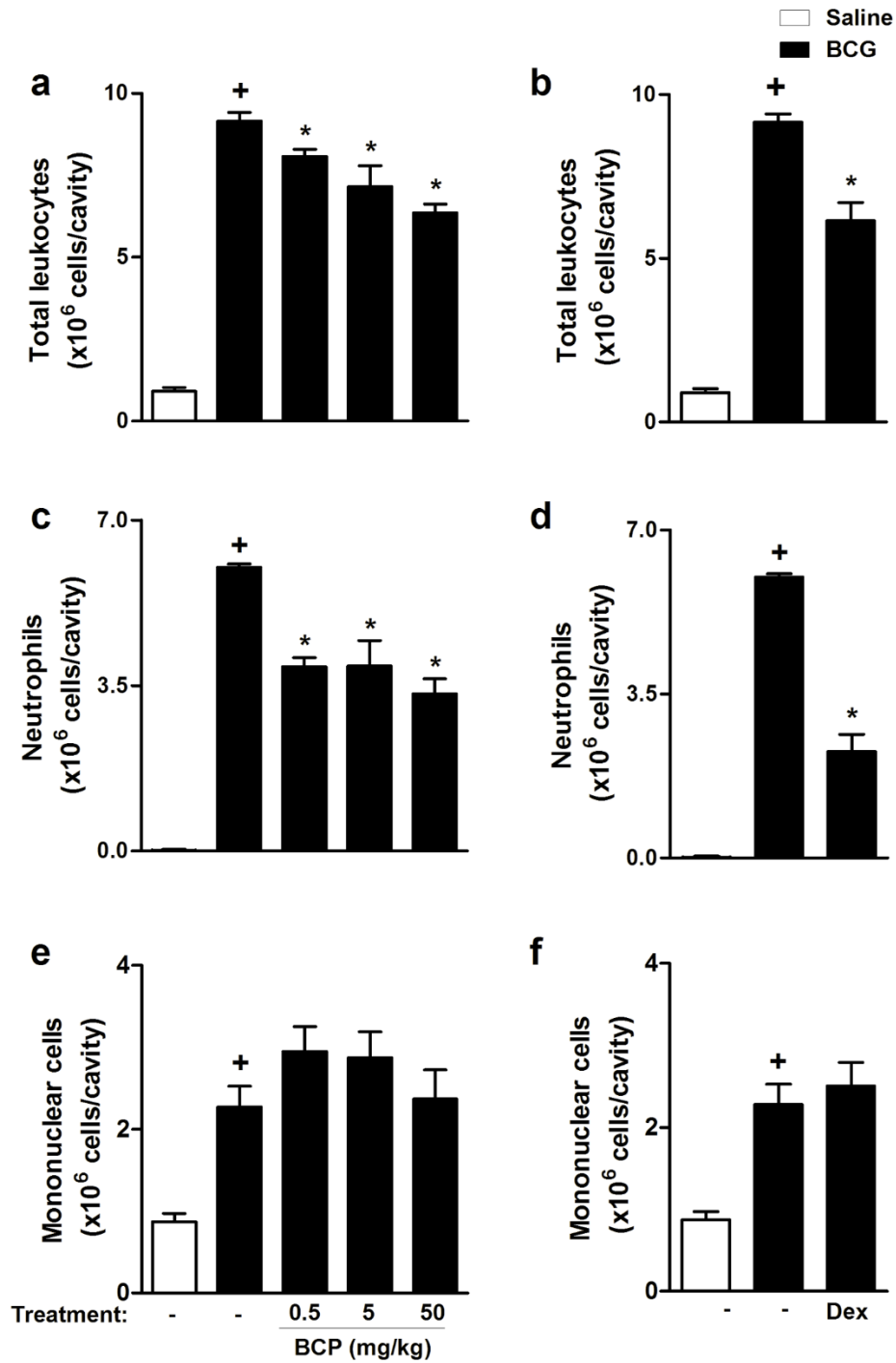


Fig. S1 Effects of different doses of BCP on cell migration during BCG-induced pleurisy. Mice received an i.t. injection of BCG (4×10^5 CFU/cavity) 1 h after oral pretreatment with BCP (0.5–50 mg/kg) or dexamethasone (Dex, 2 mg/kg, i.p.). After 24 h, the pleural wash (PW) was collected for the analysis of (a) total leukocytes, (b) neutrophils and (c) mononuclear cells. The control groups either received vehicle (filtered water–DMSO 2%) or were injected (i.t) with the same volume of sterile saline. Dexamethasone was used as a reference anti-inflammatory drug. The results are expressed as the mean \pm SEM from at least six animals per group and are representative of two separate experiments. + $P \leq 0.05$, significant differences between the stimulated (BCG) and non-stimulated groups; * $P \leq 0.05$, significant differences between the treated and non-treated groups

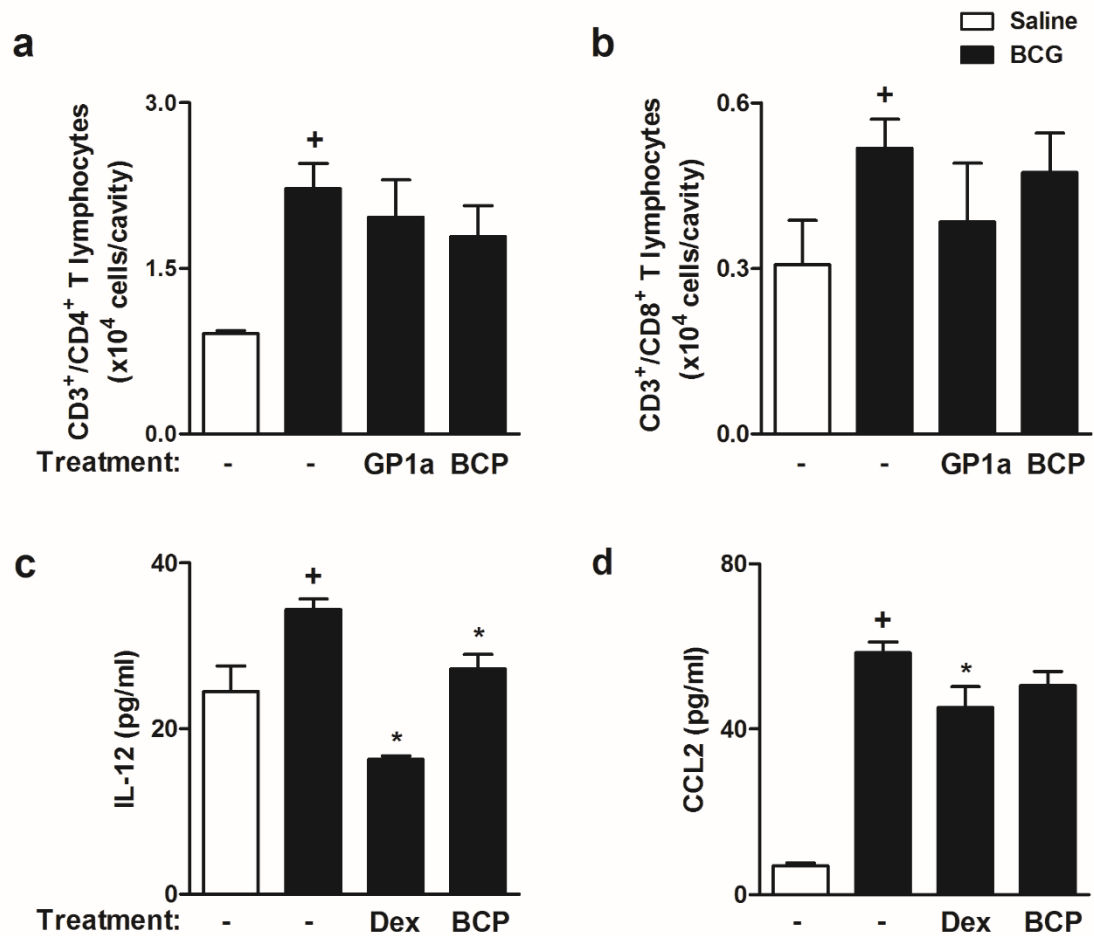


Fig. S2 Effect of BCP pretreatment on cell accumulation in BCG-induced pleurisy. Pleural stimulus with BCG (4×10^5 CFU/cavity) was given by *i.t.* injection 1h after treatment with BCP (50 mg/kg, p.o), dexamethasone (Dex, 2 mg/kg, i.p) or GP1a (10 mg/kg, i.p). Following 24 h, pleural wash (PW) was collected to analysis of T lymphocytes (a) CD3⁺/CD4⁺ cells, (b) CD3⁺/CD8⁺ cells. The pleural washes cell-free were used to quantify the production of (c) IL-12 and (d) CCL2/MCP-1 by ELISA. Dexamethasone was used as reference anti-inflammatory drug. The selective CB₂ agonist, GP1a, was used as a positive control of CB₂ activation in this reaction. Control groups were oral treated just vehicle (filtered water-DMSO 2%) or injected (*i.t.*) with the same volume of sterile saline. Results are expressed as the mean \pm SEM from at least six animals per group and are representative of three separated experiments. ⁺ $P \leq 0.05$, significant differences between stimulated (BCG) and non-stimulated groups; * $P \leq 0.05$, significant differences between treated and non-treated groups

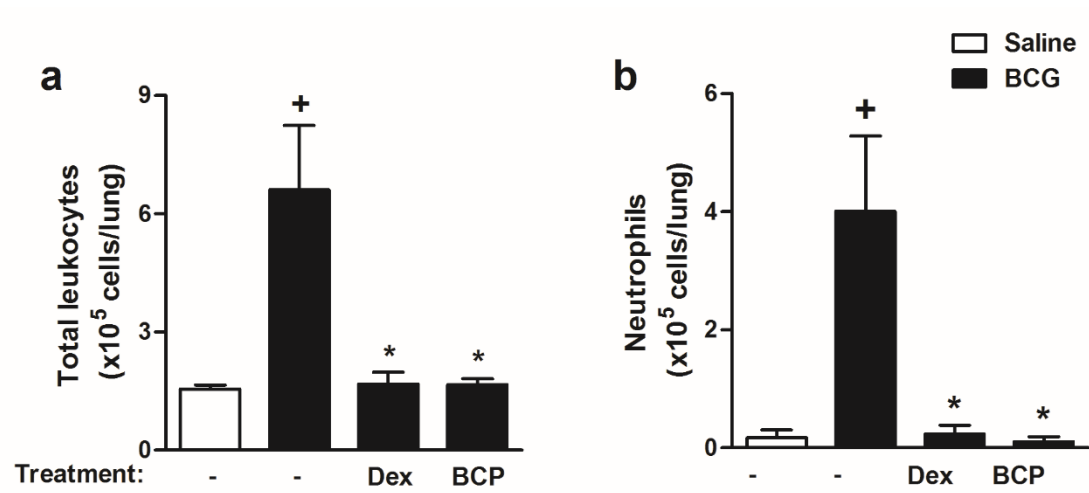


Fig. S3 Effect of BCP on cell migration in BCG-induced pulmonary inflammation. Mice were pretreated with BCP (p.o., 50 mg/kg) or dexamethasone (Dex., i.p., 2 mg/kg) 1 h before and 24 h after *i.n.* treatment with BCG (1×10^6 CFU/lung). After 48 h, the bronchoalveolar lavage (BAL) was collected for the analysis of (a) total leukocyte and (b) neutrophil influx into the lungs. The control groups received vehicle (filtered water-DMSO 2%) or were administered the same volume of sterile saline. Dex was used as a reference inhibitor. The results are expressed as the mean \pm SEM from eight animals per group. $+P \leq 0.05$, significant differences between the stimulated (BCG) and non-stimulated groups; $*P \leq 0.05$, significant differences between the treated and non-treated groups

The cannabinoid 2 receptor agonist β -caryophyllene modulates the inflammatory reaction induced by *Mycobacterium bovis* BCG by inhibiting neutrophil migration

Inflammation Research

Magaiver Andrade-Silva¹, Luana B. Correa¹, André Candéa¹, Simone C. Cavalher-Machado¹, Helene Santos Barbosa², Elaine Cruz Rosas^{1,3} and Maria das Graças Henriques^{1,3} *

¹*Laboratório de Farmacologia Aplicada, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Sizenando Nabuco 100, 21041-250, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil*

²*Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-361, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil*

³*Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Inovação em Doenças Negligenciadas (INCT/IDN), Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS); Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-361, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

*Corresponding author at Laboratório de Farmacologia Aplicada, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Sizenando Nabuco 100, 21041-250, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel.: +55 21 3977 2479.

E-mail address: gracahenriques@fiocruz.br

Table S1 Effect of BCP on proinflammatory mediator production by murine macrophages stimulated with BCG

	Medium	BCG (MOI 3:1)	Dex (0.05 μ M)	BCP (100 μ M)
CCL2 (pg/ml)	0.00 \pm 0.00	4550 \pm 531	3830 \pm 584*	4060 \pm 58
IL-12 (pg/ml)	20 \pm 0.00	3075 \pm 57	2314 \pm 52*	3502 \pm 90
IL-10 (pg/ml)	1315 \pm 42	5159 \pm 43	4819 \pm 59*	5090 \pm 31
TNF- α (pg/ml)	526.0 \pm 65.84	2966 \pm 146.0	2197 \pm 123.6	2959 \pm 135.9
PGE ₂ (pg/ml)	70 \pm 10	1555 \pm 60	900 \pm 31*	1666 \pm 60
NO (μ M)	4 \pm 0.1	75 \pm 4	78 \pm 5	76 \pm 1

The J774A.1 macrophage cell line was stimulated with BCG (MOI 3:1) for 6 h, and the cells were incubated with different concentrations of BCP (100 μ M) or Dex (0.05 μ M). After 24 h, the supernatant was collected to evaluate inflammatory mediator production. ELISAs were used to quantify the levels of cytokines and chemokine, and NO production was measured via the Griess method. Dex was used as a reference inhibitor. The results are expressed as the mean \pm SEM from four wells per group. * $P \leq 0.05$, significant differences between the treated and stimulated (Control) groups

Table S2 Effect of BCP on macrophage viability

	BCP (μM)					
	1	5	10	50	100	500
Cell viability	100%	100%	100%	100%	98%	16%

The results are expressed as the percentage of cell viability (%) from quadruplicate wells (10^5 cells/well), after incubation of cells with BCP for 1 h (37°C , 5% CO_2). Cell viability was assessed using the MTT assay