

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Luciana Magalhães Leo

Papel da Lipoxina A₄ na fisiologia do sistema nervoso central e no dano cognitivo associado à neuroinflamação

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

Orientador (es): Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza
Prof. Dr. Fabricio Alano Pamplona

RIO DE JANEIRO

2015

**FICHA CATALOGRÁFICA A SER ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DE MANGUINHOS
PARA A VERSÃO FINAL DA TESE (A ser impressa no verso da primeira folha de rosto)
INDICAR APENAS AS PALAVRAS-CHAVE NA VERSÃO APRESENTADA PARA A DEFESA PÚBLICA
DA TESE**

L576 Leo, Luciana Magalhães

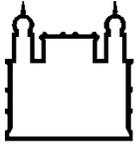
**Papel da Lipoxina A4 na fisiologia do sistema nervoso central e no dano cognitivo
associado à neuroinflamação / Luciana Magalhães Leo. – Rio de Janeiro, 2015.
xii,78 f. : il. ; 30 cm.**

**Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular, 2015.**

Bibliografia: f. 63-78

**1. Lipoxina A4. 2. Endocanabinoides. 3. Ansiedade. 4. Memória. 5. Neuroinflamação. I.
Título.**

CDD 573.8639



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Luciana Magalhães Leo

**PAPEL DA LIPOXINA A₄ NA FISIOLOGIA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E
NO DANO COGNITIVO ASSOCIADO À NEUROINFLAMAÇÃO**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza
Prof. Dr. Fabricio Alano Pamplona

Aprovada em: 14/08/2015

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Mariana Conceição de Souza, Farmanguinhos, FIOCRUZ - **Presidente**
Prof. Dr. Marília Zaluar P. Guimarães, Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ
Prof. Dr. Pablo Pandolfo, Neurobiologia, UFF
Prof. Dr. Patrícia Alves Reis, IOC, FIOCRUZ
Prof. Dr. Claudio de Azevedo Canetti, IBCCF, UFRJ

Rio de Janeiro, 14 de agosto de 2015

Agradecimentos

Os agradecimentos vão em primeiro lugar à minha família. Ao meu pai que me apoiou em cada passo do caminho e continua a apoiar agora que é quando eu mais preciso. À minha mãe, que aguentou todos os momentos de estresse e desespero, sempre oferecendo palavras de carinho e tentando me colocar de volta no caminho certo. Não teria conseguido sem você.

Quero agradecer a todos os colaboradores, que nos ajudaram a produzir esses belíssimos resultados e nos deram um teto para trabalhar, sempre sendo o mais acolhedores possíveis, Olavo Amaral, Claudio Canetti, Stevens Rehen e Rogério Panizzutti. Em especial vai um obrigado ao Olavo e a todos os membros do seu laboratório, onde eu passei mais tempo. Ao Olavo, Suellen, Clarissa, Thiago e Lara por toda a ajuda, por compartilhar seu conhecimento e por me fazer sentir parte integrante do laboratório sempre.

Muito obrigado também aos meus orientadores. Ao Fernando Bozza, que me acolheu no momento em que eu procurava um mestrado. Obrigada por me incluir num excelente grupo de trabalho e me apontar na direção de novos conhecimentos na área da neuroinflamação. Foi uma jornada bastante interessante. Ao Fabricio Pamplona, não há palavras para descrever o quanto eu estou agradecida por esses últimos 3 anos e meio. Você foi um excelente orientador, me pressionando onde era necessário, me apoiando quando eu mais precisava e acreditando na minha capacidade de fazer um bom trabalho. Graças a você eu aprendi muito e me sinto pronta para encarar os desafios que vêm daqui para a frente. Não é possível pedir mais do que você é em um orientador. Eu te desejo toda a sorte do mundo nas sua nova empreitada e espero que, se voltar à ciência você continue esse orientador espetacular para seus novos alunos. Tenho certeza que muitas jovens mentes vão se beneficiar do que você tem a oferecer.

Agradeço aos membros da banca por aceitar avaliar meu trabalho. Estou certa de que sua contribuição será de grande ajuda para o aprimoramento deste estudo. Gostaria de agradecer à pós-graduação em biologia celular e molecular do IOC, que me proporcionou a oportunidade de desenvolver esta dissertação e adquirir novos conhecimentos que sem dúvida foram e serão muito importantes para o meu futuro. Finalmente, agradeço às agências de fomento, FAPERJ e CNPq, sem as quais a progressão deste estudo seria impossível.

“As maiores atividades da consciência têm suas origens em ocorrências físicas do cérebro, assim como as mais belas melodias não são sublimes demais para serem expressas através de notas.”

Somerset Maugham

SUMÁRIO

Lista de abreviações.....	viii
Lista de figuras.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1 Lipoxina A ₄	1
1.2 O sistema endocanabinóide.....	3
1.3 Funções fisiológicas reguladas pelo sistema eCB.....	5
1.3.1 Emocionalidade.....	5
1.3.2 Appetite.....	6
1.3.3 Locomoção.....	7
1.3.4 Nocicepção.....	8
1.3.5 Memórias aversivas.....	9
1.4 Neuroinflamação na sepse.....	14
1.4.1 Neuroinflamação e dano cognitivo.....	15
1.4.2 Neuroinflamação e o sistema eCB.....	16
1.4.3 Neuroinflamação e LXA ₄	18
2. Objetivos.....	21
2.1 Objetivos específicos.....	21
3. Materiais e métodos.....	22
3.1 Animais.....	22
3.2 Modelo de sepse.....	22
3.3 Tratamentos.....	23
3.4 Testes comportamentais.....	24
3.4.1 Ansiedade.....	24
3.4.1.1 Labirinto em cruz elevado.....	24
3.4.1.2 Caixa claro-escuro.....	24
3.4.2 Consumo de água e alimento.....	25
3.4.3 Locomoção.....	25
3.4.4 Teste de nocicepção.....	26
3.4.5 Memória e aprendizado.....	26
3.4.5.1 Condicionamento aversivo contextual.....	26
3.4.5.2 Esquiva inibitória.....	28
3.4.5.3 Extinção de memória.....	28
3.5 Ensaio bioquímicos.....	29
3.5.1 Preparo de amostras.....	29
3.5.2 Dosagem de proteínas.....	29

3.5.3 ELISA para dosagem de LXA ₄ e cisteinil-leucotrienos.....	30
3.5.4 ELISA para dosagem de IL-1β e IL-6.....	30
3.5.5 <i>Western Blotting</i>	31
3.5.6 Imunohistoquímica.....	31
3.6 Análise Estatística.....	33
4. Resultados e discussão.....	34
4.1 Caracterização de animais 5-LO ^{-/-}	34
4.1.1 Ansiedade.....	34
4.1.2 Consumo de água e alimento.....	43
4.1.3 Locomoção.....	43
4.1.4 Nocicepção.....	45
4.1.5 Memórias aversivas.....	47
4.1.6 Expressão do receptor CB1 em camundongos 5-LO ^{-/-}	50
4.2 LXA ₄ e memórias aversivas em animais idosos.....	53
4.3 Neuroinflamação e dano cognitivo.....	55
4.3.1 Efeito da LXA ₄ sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias em modelo de sepse por injeção de LPS.....	55
4.3.2 Efeito da LXA ₄ no dano cognitivo em modelo de sepse por injeção de LPS.....	57
5. Conclusões.....	61
6. Referências Bibliográficas.....	63

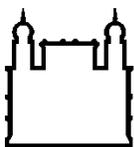
LISTA DE ABREVIACOES

- 12-LO – 12-lipoxigenase
15-LO – 15-lipoxigenase
15S-H(p)ETE – Ácido 15S-hidroxi-eicosatetraenoico
2-AG – 2-araquidonoilglicerol
5-LO – 5-lipoxigenase
AA – Ácido araquidnico
AEA – Araquidonoiletanolamida
ALX – Receptor de Lipoxina A₄
AMPA – Receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
ATP – Adenosina trifosfato
BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE – Barreira hematoencefálica
CB1 – Receptor canabinóide tipo 1
CB2 – Receptor canabinóide tipo 2
CCK – colecistocinina
CLP – Ligadura e punção cecal
CS – Estímulo condicionado
CysLT – Cisteinil-leucotrieno
eCB – Endocanabinóide
EA – Etanolamina
EAS – Encefalopatia associada à sepse
FAAH – Aminohidrolase de ácido graxo
FLAP – Proteína ativadora da 5-lipoxigenase
GABA – Ácido γ -aminobutírico
HPA – Hipotálamo-pituitária-adrenal
icv – Intracerebroventricular
IL-1 β – Interleucina-1 β
IL-6 – Interleucina-6
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida
i.p. – Intraperitoneal

LPS – Lipopolissacarídeo
LTA₄ – Leucotrieno A₄
LTD – Depressão de longa duração
LTP – Potenciação de longa duração
LXA₄ – Lipoxina A₄
LXB₄ – Lipoxina B₄
LXA₄ME – Lipoxina A₄-metil-éster
MAGL – Monoacilglicerol lipase
MCH – Hormônio concentrador de melanina
mPFC – Córtex pré-frontal medial
nACC – Núcleo *accumbens*
NLET – Núcleo do leito da estria terminal
NMDA – Receptor N-metil-D-aspartato
NO – Óxido nítrico
PAG – Substância cinzenta peri-aquedutal
PFA – Paraformaldeído
PI3K – Fosfoinositol-3-cinase
PKC γ – Fosfocinase C- γ
SNC – Sistema nervoso central
SNP – Sistema nervoso periférico
THC – Δ^9 -tetra-hidrocanabinol
TLR4 – Receptor *Toll-like 4*
US – Estímulo não condicionado
VTA – Área tegmental ventral
WB – *Western Blotting*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Biossíntese de lipoxinas.....	1
Figura 1.2 Esquematização da sinalização retrógrada por eCBs em uma sinapse glutamatérgica.....	4
Figura 1.3 Circuito no eixo dorsoventral do hipocampo.....	11
Figura 1.4 Processos de construção e desconstrução da memória.....	12
Figura 3.1 Protocolo de tratamento durante o condicionamento aversivo contextual....	27
Figura 3.2 Exemplificação do método de quantificação das imagens obtidas em microscopia de fluorescência.....	32
Figura 4.1 Redução dos níveis endógenos de LXA ₄ e outros derivados da 5-LO não influencia peso corporal ou consumo de água e alimento.....	43
Figura 4.2 Redução de LXA ₄ e outros derivados da 5-LO não tem impacto sobre locomoção ou ansiedade no teste de campo aberto.....	45
Figura 4.3 Redução de LXA ₄ e outros derivados da 5-LO causa diminuição dos limiares de nocicepção.....	46
Figura 4.4 Redução da LXA ₄ e outros derivados da 5-LO causa disfunção cognitiva..	47
Figura 4.5 Curva de aprendizado de animais 5-LO ^{-/-}	48
Figura 4.6 Disfunção na extinção de memória em camundongos 5-LO ^{-/-} adultos.....	49
Figura 4.7 Expressão de CB1 no cérebro de camundongos 5-LO ^{-/-} avaliada por WB...51	
Figura 4.8 Expressão de CB1 no hipocampo de camundongos 5-LO ^{-/-} analisada por imunohistoquímica.....	52
Figura 4.9 Animais <i>Swiss Webster</i> idosos (12 meses) têm redução da razão LXA ₄ /CysLTs acompanhada de disfunção cognitiva.....	54
Figura 4.10 Supressão da produção de IL-6 e IL-1β induzida por LPS após tratamento com LXA ₄	56
Figura 4.11 Consolidação de memória em modelo de sepse por injeção de LPS.....	58
Figura 4.12 Evocação de memórias já consolidadas em modelo de sepse por injeção de LPS (0,3mg/kg i.p.).....	59
Figura 4.13 Tratamento com LXA ₄ recupera dano cognitivo após injeção de LPS.....	60



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PAPEL DA LIPOXINA A₄ NA FISIOLOGIA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E NO DANO COGNITIVO ASSOCIADO À NEUROINFLAMAÇÃO

RESUMO/ABSTRACT

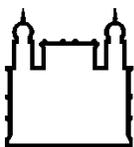
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luciana Magalhães Leo

O papel da lipoxina A₄ (LXA₄) no sistema imunológico é bem estudado, mas o papel dessa molécula na fisiologia do sistema nervoso central (SNC) só foi abordado recentemente. Como um modulador alostérico positivo, a LXA₄ produz efeitos canabimiméticos e pode, dessa forma, estar envolvida em vários aspectos de funções fisiológicas reguladas pelo sistema endocanabinóide (eCB). Nós investigamos essa hipótese analisando o comportamento de camundongos *knockout* (5-LO^{-/-}) para a enzima 5-lipoxigenase (5-LO), que participa da síntese de LXA₄. Ansiedade, consumo de água e alimento, locomoção, nocicepção e memórias aversivas são comportamentos reconhecidos como sob controle do sistema eCB e foram avaliados neste estudo. Nenhuma alteração foi observada no comportamento de 5-LO^{-/-} em relação ao consumo de água e alimento e locomoção no teste de campo aberto. No entanto, o tratamento com LXA₄ produziu efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevada. Além disso, inibição farmacológica da 5-LO demonstrou um efeito ansiogênico em animais idosos, mas não em adultos jovens, indicando que a LXA₄ endógena exerce um efeito regulatório sobre ansiedade de forma idade-dependente. Os animais 5-LO^{-/-} apresentaram um aumento na sensibilidade e redução na tolerância à dor no teste de sensibilidade ao choque. Ainda, uma disfunção em memória de curto prazo e extinção de memória no teste de esquiva inibitória foi observada nos animais 5-LO^{-/-}, indicando que a LXA₄ pode agir na facilitação do aprendizado. Esse dado é de grande importância para o possível uso da LXA₄ como tratamento do dano cognitivo decorrente de neuroinflamação.

O estudo da sepse nos revela que um estímulo inflamatório pode gerar produção exacerbada de moléculas pró-inflamatórias no SNC, o que causa neuroinflamação e disfunção cognitiva. A LXA₄ é uma boa candidata como alvo de terapia para o dano cognitivo decorrente de neuroinflamação, uma vez que tem potencial anti-inflamatório e neuroprotetor por ação em receptores ALX e CB1, respectivamente. Neste estudo foi possível observar queda na produção de citocinas pró-inflamatórias no plasma e no cérebro de camundongos com inflamação sistêmica induzida por lipopolissacarídeo (LPS) mediante tratamento com LXA₄. Além disso, o dano cognitivo observado sobre consolidação de memória neste modelo de sepse foi prevenido após tratamento com LXA₄.

Os dados apresentados neste estudo apontam funções do SNC sujeitas a modulação pela disponibilidade de LXA₄ endógena e um efeito benéfico do tratamento da LXA₄ no resgate de dano cognitivo decorrente de neuroinflamação. Apresentamos evidências que contribuem para o esclarecimento do papel fisiológico da LXA₄ no SNC e para o seu potencial no tratamento de patologias inflamatórias que atingem o encéfalo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PAPEL DA LIPOXINA A₄ NA FISIOLOGIA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E NO DANO COGNITIVO ASSOCIADO À NEUROINFLAMAÇÃO

RESUMO/ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luciana Magalhães Leo

The role of lipoxin A₄ (LXA₄) in the immune system is well studied, however the part this molecule plays in central nervous system (CNS) physiology has only recently been addressed. LXA₄, as a CB1 allosteric enhancer, has a cannabimimetic effect and may therefore be involved in various aspects of endocannabinoid system (eCB) physiological functions. We investigated this reasoning by analyzing the behavior of 5-lipoxygenase (5-LO) knockout mice (5-LO^{-/-}). Anxiety-like behavior, appetitive behavior, locomotion, nociception and learning and memory are all known to be under control of the eCB system and were assessed in this study. No alteration was observed in the behavior of 5-LO knockout mice regarding appetitive behavior, measured by food and water intake, or locomotion in the open field test. However, treatment with LXA₄ produced an anxiolytic-like effect on the elevated plus maze. Further, pharmacological inhibition of 5-LO showed an anxiogenic-like effect in aged, but not adult mice, indicating that endogenous LXA₄ has an age-dependent effect on the modulation of anxiety-like behavior. 5-LO^{-/-} mice presented an increase in pain sensitivity and a decrease in pain tolerance in the foot shock sensitivity test. Interestingly, the animals also presented impairment in short-term memory and extinction learning in the step-down inhibitory avoidance task, pointing out that LXA₄ may act in the facilitation of fear learning. These data are of great importance to the possible use of LXA₄ as treatment to neuroinflammation induced cognitive impairment.

The study of sepsis reveals that an inflammatory stimulus can induce the exacerbated production of pro-inflammatory cytokines in the CNS, which causes neuroinflammation and cognitive impairment. LXA₄ is a good candidate as target in the treatment of neuroinflammation induced cognitive impairment, since it has anti-inflammatory and neuroprotection potential due to its action on ALX and CB1 receptors, respectively. In this study, we observed a decrease in the production of pro-inflammatory cytokines in plasma and brain of mice with induced systemic inflammation by lipopolysaccharide (LPS) injection due to treatment with LXA₄. Moreover, the memory consolidation impairment observed in this sepsis animal model was prevented following LXA₄ treatment.

The data presented in this study point out CNS functions subjected to modulation by endogenous LXA₄ availability and a beneficial effect of LXA₄ treatment on neuroinflammation induced cognitive impairment. We present evidence that contributes to the understanding of the physiological role of LXA₄ in the CNS and its potential in the treatment of inflammatory pathologies that affect the brain.

1. Introdução

1.1 Lipoxina A₄

A lipoxina A₄ (LXA₄) e a lipoxina B₄ (LXB₄) são os principais representantes da classe das lipoxinas, produzidas a partir do metabolismo do ácido araquidônico (AA) pelas enzimas lipoxigenases (1). As lipoxinas são produzidas por duas vias de biossíntese transcelular (Figura 1.1). Na primeira, o AA é convertido a leucotrieno A₄ (LTA₄) pela enzima 5-lipoxigenase (5-LO) em neutrófilos polimorfonucleares. O LTA₄ liberado pode ser convertido a LXA₄ ou LXB₄ pela enzima 12-lipoxigenase (12-LO) de plaquetas após interação neutrófilo-plaqueta (2). Na segunda via, o AA é convertido a 15S-H(p)ETE pela enzima 15-lipoxigenase (15-LO) em células do tecido epitelial ou em monócitos, os quais interagem com neutrófilos. Em seguida, o 15S-H(p)ETE é convertido em LXA₄ ou LXB₄ pela enzima 5-LO dos neutrófilos (3) (Figura 1.1).

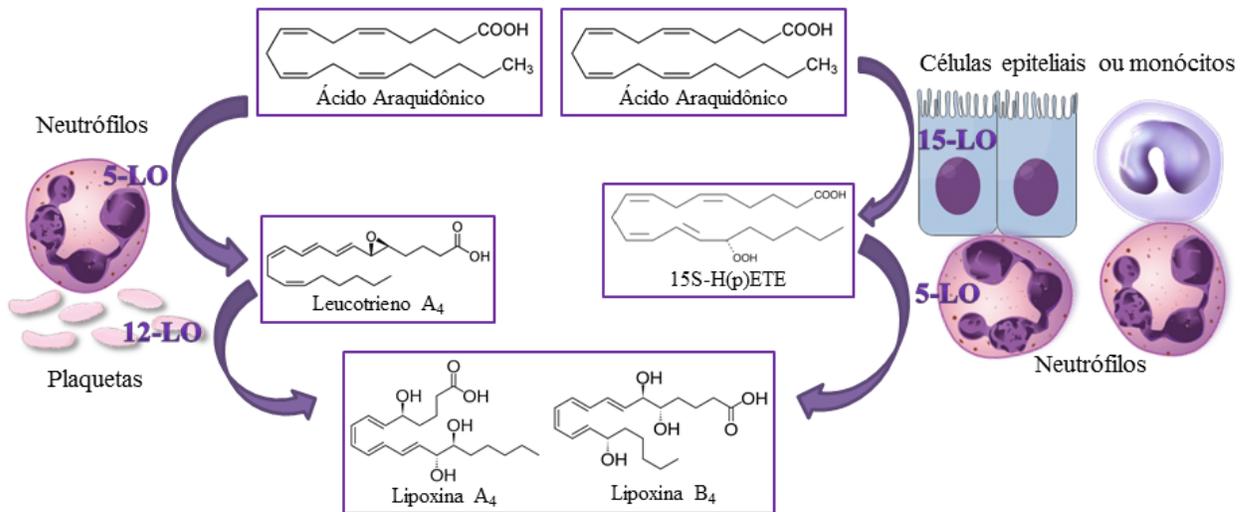


Figura 1.1 Biossíntese de lipoxinas. O ácido araquidônico é metabolizado pela enzima 5-lipoxigenase (5-LO) de neutrófilos a leucotrieno A₄, que então é convertido pela enzima 12-lipoxigenase (12-LO) de plaquetas a lipoxina A₄ ou lipoxina B₄. Alternativamente, o metabolismo do ácido araquidônico pode ocorrer em células do epitélio, onde a enzima 15-lipoxigenase (15-LO) gera 15S-H(p)ETE, o qual é rapidamente transformado em lipoxina A₄ ou lipoxina B₄ por 5-LO em neutrófilos.

Em ambas as vias de produção de lipoxinas a ação da 5-LO é necessária para a geração de lipoxinas. No entanto, a ação da 5-LO depende da presença da proteína ativadora da 5-lipoxigenase (FLAP), a qual se liga ao AA e atua como uma proteína de transferência de AA, facilitando a apresentação do substrato à 5-LO (4). FLAP e 5-LO

são encontradas predominantemente em células mielóides, inclusive em neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) e sua expressão e atividade são estimuladas por uma variedade de fatores, como aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , presença de adenosina trifosfato (ATP), presença de fosfatidilcolina e, hidroperóxidos de lipídios (5). Além de lipoxinas, a 5-LO também é responsável pela produção de LTA_4 , uma molécula instável que pode ser transformada em LXA_4 ou LXB_4 por ação da 12-LO, ou ainda em leucotrieno B_4 (LTB_4) e leucotrieno C_4 (LTC_4) (5).

O primeiro receptor identificado para a LXA_4 foi o receptor ALX, um receptor acoplado à proteína G que está expresso em uma variedade de tipos celulares, incluindo PMNs, monócitos, células T, macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e astrócitos (6, 7). O ALX se acopla primariamente a proteínas G do tipo G_i/G_0 , mas também pode se ligar de forma secundária a proteínas G do tipo G_q/G_{11} (6, 7). A LXA_4 age como agonista de receptores ALX, estimulando mecanismos anti-inflamatórios e acelerando a resolução da inflamação (6). Através da ação em receptores ALX, a LXA_4 é capaz de controlar a amplificação de uma resposta inflamatória aguda impedindo a infiltração de leucócitos, regulando a produção de citocinas e quimiocinas, a expressão de receptores de quimiocinas e a expressão de moléculas de adesão, além de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio e de leucotrienos (6, 8). A interação LXA_4 -ALX induz o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e estimula a aderência e quimiotaxia em monócitos e promove a fagocitose de neutrófilos em apoptose por macrófagos, processo que produz efeito anti-inflamatório (6). Em neutrófilos, a LXA_4 inibe a quimiotaxia, aderência e transmigração destas células por tecido endotelial e epitelial (6). Essas propriedades denotam o papel da LXA_4 na promoção de resolução da inflamação, uma vez que a redução no número de neutrófilos, o recrutamento de monócitos para o sítio de inflamação e a remoção de neutrófilos em apoptose por macrófagos são eventos de grande importância para o reparo do tecido e resolução da inflamação no mesmo (6). Além disso, a LXA_4 também compete com leucotrieno D_4 pelo sítio de ligação ao seu receptor $CysLT_1$, funcionando como um antagonista de $CysLT_1$ (9).

No SNC, foi identificada a expressão de ALX em astrócitos do corno dorsal da medula de ratos (7). No entanto, funções fisiológicas descritas para a LXA_4 no SNC

difícilmente são explicadas por este fato, como modulação do sono de ondas lentas e sinalização neuronal por PKC γ (10, 11). Um estudo do nosso grupo demonstrou que o receptor canabinóide CB1 pode também ser alvo da LXA₄. Esta age como um ligante alostérico, aumentando a afinidade da anandamida (AEA) pelo receptor CB1 e reduzindo a taxa de dissociação, o que potencializa sua ação (12). O tratamento com LXA₄ apresentou efeitos canabimiméticos, influenciando a tétrede canabinóide (12), caracterizada por hipolocomoção, hipotermia, antinocicepção e catalepsia (13). Ainda, a co-administração de LXA₄ e β -amilóide no cérebro de camundongos reduziu o dano cognitivo provocado por β -amilóide numa tarefa de memória espacial, efeito que é bloqueado por um antagonista de CB1 (12). Essa descoberta tem um impacto significativo na busca de estratégias de tratamento envolvendo canabinóides, no entanto o papel da LXA₄ nas funções fisiológicas reguladas pelo sistema endocanabinóide (eCB) ainda não foi caracterizado.

1.2 O Sistema Endocanabinóide

Os sistemas de mensageiros transcelulares tem um papel importante na regulação da função sináptica. Entre estes está o sistema endocanabinóide. A descrição de dois receptores, CB1 e CB2, que respondem ao principal composto ativo na planta *Cannabis*, Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (THC), permitiu a purificação e caracterização de seus ligantes endógenos. Os canabinóides endógenos, que ficaram conhecidos como endocanabinoides (eCBs), são provenientes do metabolismo do AA. O primeiro eCB descrito foi a anandamida, ou araquidonoiletanolamida (AEA), seguida pelo 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (14, 15).

No sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (SNP), a expressão de receptores CB1 é abundante, especialmente em terminais nervosos pré-sinápticos, onde é responsável pela inibição da liberação de vários neurotransmissores, como o ácido γ -aminobutírico (GABA) e o glutamato (16). Os receptores do tipo CB2 são encontrados principalmente em linfócitos, nos quais modulam a resposta imune (17). A produção de eCBs ocorre mediante excitação do terminal pós-sináptico, com a elevação na concentração intracelular de Ca²⁺. Devido à sua propriedade lipofílica, os eCBs se difundem pela membrana, atingindo o terminal pré-sináptico, onde se ligam a receptores CB1 e inibem a liberação de neurotransmissores (17) (Figura 1.2).

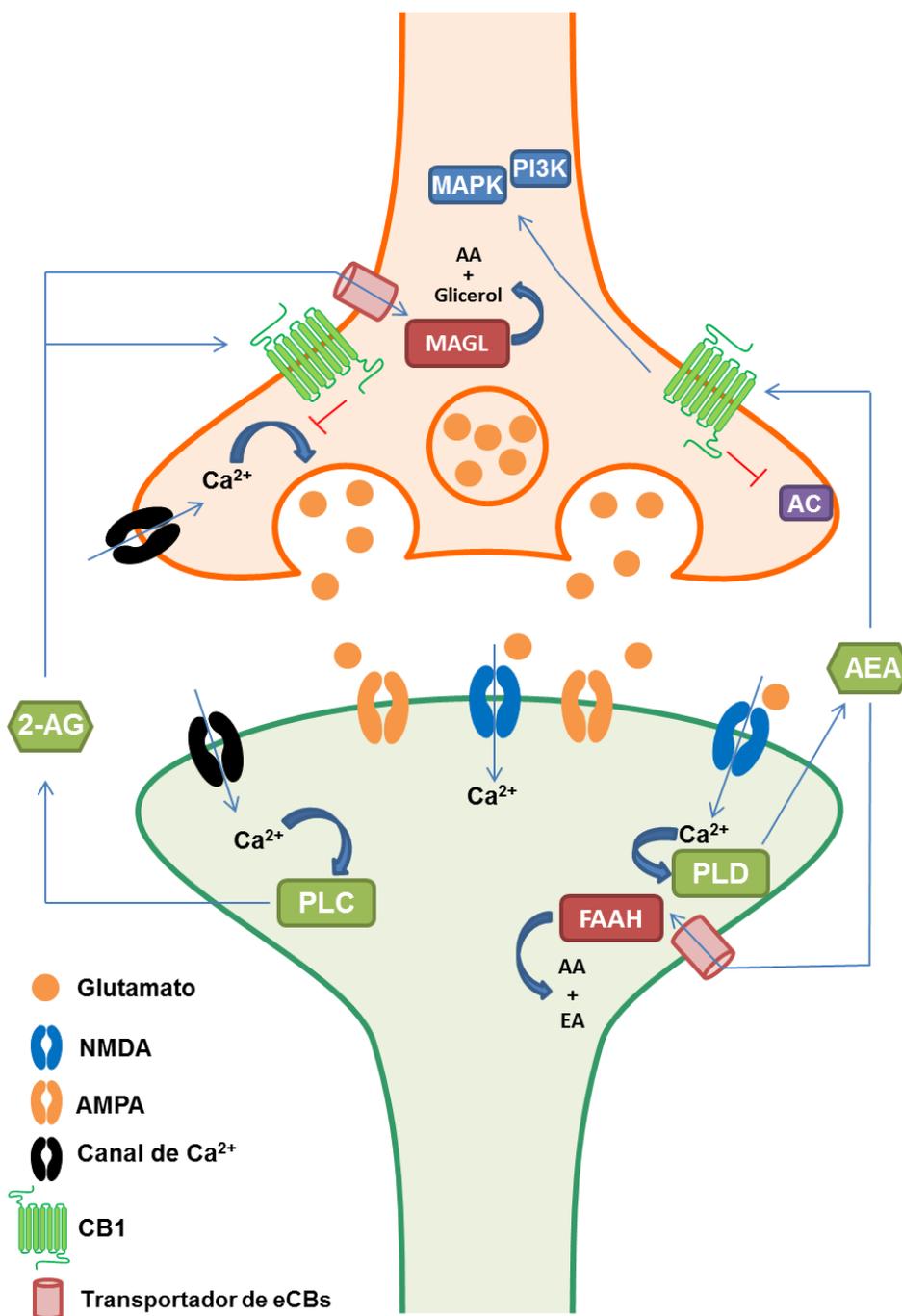


Figura 1.2 Esquemática da sinalização retrógrada por eCBs em uma sinapse glutamatérgica. AEA e 2-AG são produzidos mediante influxo de Ca²⁺ que ocorre após despolarização na pós-sinapse e ativam receptores CB1 na pré-sinapse. Esses receptores inibem adenilil ciclase (AC), reduzindo a produção de AMP cíclico ou influxo de íons por canais de Ca²⁺, suprimindo a liberação de neurotransmissores. Por outro lado também ativam as vias de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK) ou Fosfoinositol-3-cinase (PI3K). AEA e 2-AG são recaptados para o interior da célula por meio de transportadores de eCBs e degradados pelas enzimas FAAH e MAGL, respectivamente. EA: Etanolamina. FAAH: Aminohidrolase de ácido graxo. MAGL: Monoacilglicerol lipase. PLC: fosfolipase C. PLD: fosfolipase D.

Os receptores CB1 e CB2 se acoplam primariamente a proteínas $G_{i/o}$, causando uma inibição na atividade da enzima adenilil ciclase, o que provoca a redução dos níveis de AMP cíclico, além de inibição de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e ativação de canais de K^+ . Os eCBs também podem se ligar e ativar outros tipos de receptores, como TRPV1, PPAR α , PPAR δ e GPR55 (18).

Os receptores CB1 estão distribuídos de forma difusa e em altas densidades pelo SNC. Agonistas do receptor CB1 podem alterar diversas funções fisiológicas através da ativação de diversas regiões cerebrais com alta densidade desses receptores, como núcleos da base, hipocampo, cerebelo, amígdala, estriado e córtex pré-frontal (19). A partir da ação sobre essas e outras regiões, o sistema eCB é capaz de regular diversas funções fisiológicas do SNC, modificando comportamento.

1.3 Funções fisiológicas reguladas pelo sistema eCB

1.3.1 Emocionalidade

O medo é uma resposta adaptativa natural a situações aversivas, ou ameaçadoras, a qual se manifesta de forma transitória. Já a ansiedade é uma resposta de longa duração a estímulos aversivos ou que têm potencial de desencadear eventos desfavoráveis. A presença de ansiedade é de grande importância para sobrevivência do indivíduo, uma vez que o deixa alerta e preparado para uma eventualidade. No entanto, quando a resposta de ansiedade é exagerada para os padrões da ameaça ou quando persiste apesar da ausência de risco, esse comportamento pode levar o indivíduo a desenvolver transtornos de ansiedade, como ataques de pânico, estresse pós-traumático e transtorno de ansiedade generalizada (17). Há décadas cada vez mais estudos focam alvos para desenvolvimento de fármacos que possam controlar esses transtornos. Um dos alvos a ser estudados com esse propósito tem sido o sistema eCB.

Os circuitos neurais que comandam a emocionalidade compreendem regiões límbicas sub-corticais, como hipocampo, amígdala, estriado ventral e tálamo, bem como estruturas corticais, como córtex cingulado e córtex pré-frontal. Núcleos autonômicos do hipotálamo e tronco encefálico recebem projeções desse circuito, regulando a expressão de emoções e, por meio do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), estresse. Nessas áreas córtico-límbicas, a expressão do receptor CB1 encontra-se em

densidades moderadas a altas, além de apresentar posicionamento altamente favorável para modulação de sinapses excitatórias, inibitórias e monoaminérgicas nessas regiões. Portanto, o sistema eCB apresenta grande potencial de regulação sobre emocionalidade (20). De fato, uma série de estudos demonstrou que o aumento da sinalização pelo sistema eCB, através do uso de agonistas do receptor CB1, inibição da enzima de degradação da AEA ou inibição do transportador de AEA, é capaz de produzir um efeito tipo ansiolítico em roedores (21-23). No entanto, outros estudos já demonstraram que, apesar do tratamento com baixas doses de compostos canabinoides induzir um efeito tipo ansiolítico, quando altas doses são administradas, principalmente na amígdala, podem causar um efeito tipo ansiogênico (24).

1.3.2 Appetite

O controle da ingestão de alimentos é centralizado no hipotálamo e órgãos periféricos. Existem sinais químicos de curto e de longo prazo. Entre os de curto prazo estão a colecistocinina (CCK) e grelina. A CCK é liberada pelo intestino durante as refeições e promove saciedade estimulando fibras sensoriais do nervo vago, as quais se projetam para o complexo vagal dorsal no tronco encefálico, além de estimular os núcleos arqueado e paraventricular do hipotálamo. A grelina tem um papel oposto. É liberada quando antes das refeições, quando o estômago está vazio e age nos núcleos arqueado e paraventricular do hipotálamo e complexo vagal dorsal do tronco encefálico, assim como a CCK, porém promovendo fome ao invés de saciedade. Os sinais químicos de longo prazo para o controle da ingestão de alimentos são a leptina e insulina. Ambos estes hormônios ativam o núcleo arqueado do hipotálamo e o complexo vagal dorsal para reduzir o consumo de alimento e elevar o gasto de energia. Neurônios do núcleo arqueado transmitem os sinais da leptina e insulina através de projeções para o núcleo paraventricular, o qual é responsável pela homeostase energética (17).

O sistema eCB está presente no hipotálamo, sendo responsável pela modulação da comunicação entre os núcleos hipotalâmicos e órgãos periféricos. Por esse motivo, os eCBs são considerados importantes na regulação do consumo de alimento e peso corporal. Os níveis de eCBs aumentam no hipotálamo durante a privação alimentar e decrescem após consumo de alimento (25). Além disso, a ativação

de receptores CB1 causa hiperfagia em roedores (26), enquanto a inibição da sinalização por CB1, através de tratamento com o antagonista SR141716A ou de deleção genética do receptor, resulta em hipofagia (27, 28). No núcleo arqueado, eCBs causam aumento da excitabilidade de neurônios que expressam hormônio concentrador de melanina (MCH), o qual promovem o consumo de alimento e aumento do peso corporal. A ação de eCBs sobre essa região pode ser responsável pelo efeito orexígeno observado (29). Outro estudo recente propõe que eCBs agem em neurônios pró-ópiomelanocortina (POMC) do hipotálamo, os quais são responsáveis por inibir a fome (30). Os dados apresentados neste estudo apontam para a ação sobre neurônios POMC por duas rotas diferentes: na primeira, ativação de receptores CB1 em sinapses inibitórias reduz a liberação de GABA, causando o aumento da excitabilidade de neurônios POMC; na segunda, ativação de receptores CB1 na mitocôndria de neurônios POMC causa um aumento da respiração mitocondrial e, conseqüentemente, na expressão da proteína desacopladora 2 (UCP2), o que culmina no aumento da liberação de β -endorfinas (30).

O controle do consumo de água é realizado por sensores de hipovolemia nos rins, que transmitem informações para o SNC através de uma via neural e uma via endócrina. A via neural consiste na estimulação dos nervos glossofaríngeo e vagal, que transmitem a informação para o núcleo do trato solitário no tronco encefálico. Os neurônios do núcleo do trato solitário se projetam para a área pré-óptica e núcleo paraventricular do hipotálamo. A via endócrina consiste no sistema renina-angiotensina-aldosterona, que estimula o órgão subfornical, o qual ativa, entre outros alvos, a área pré-óptica e núcleo paraventricular do hipotálamo (17).

A presença de receptores CB1 no núcleo supra-óptico – responsável por liberação do hormônio anti-diurético – e núcleo paraventricular do hipotálamo, assim como no núcleo do trato solitário, é uma forte evidência do papel do sistema eCB sobre a ingestão de líquidos e controle volêmico (31).

1.3.3 Locomoção

O controle motor é realizado por diversas áreas do SNC que se integram para produzir o comportamento motor. Entre as áreas responsáveis pelo controle motor estão neocórtex, gânglios da base, cerebelo e medula.

Na medula, há liberação de eCBs durante a atividade locomotora e estes regulam a transmissão sináptica inibitória em interneurônios e neurônios motores, modulando a frequência de atividade basal (32). O cerebelo é responsável pelo aprendizado motor e refinamento do movimento. A sinalização de eCBs no cerebelo é relacionada principalmente à ação de 2-AG, o qual inibe sinapses excitatórias e inibitórias nas células de Purkinje, influenciando a plasticidade sináptica (33). No neocórtex, há integração de diferentes áreas, formando uma rede que é responsável pelo planejamento e execução dos movimentos. Além do córtex motor, o córtex sensorial também é importante nesta tarefa, uma vez que a formação de mapas sensoriais origina a representação das diversas partes do corpo no cérebro, o que é determinante para a organização dos circuitos motores. A indução de depressão de longa-duração (LTD) por eCBs auxilia na construção dos mapas sensoriais, tornando-os importantes na integração de circuitos sensório-motores e, conseqüentemente, na realização e aprendizado de tarefas motoras (32). Os gânglios da base são formados por um conjunto de estruturas integradas, estriado, substância nigra, globo pálido e núcleo subtalâmico, que formam duas vias opostas, direta e indireta, responsáveis por iniciar o movimento ou inibi-lo, respectivamente. A expressão de CB1 e eCBs nos gânglios da base é alta, onde são capazes de modular a sinalização dopaminérgica de forma indireta – reduzindo a neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica – e, dessa forma, o comportamento motor (33). Diversos estudos já demonstraram como o tratamento com agonistas do receptor CB1 inibe o comportamento motor e induz catalepsia em roedores (34-36).

1.3.4 Nocicepção

A nocicepção é iniciada quando um estímulo nocivo ativa os nociceptores da pele, ativando neurônios, cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios da raiz dorsal. Esses neurônios, então transmitem a informação até o corno dorsal da medula, que posteriormente atinge o tálamo e a substância cinzenta periaquedutal (PAG). Os neurônios do tálamo levam essa informação ao córtex somato-sensorial, giro cingulado

e ínsula, os quais são responsáveis pelo processamento e regulação da informação nociceptiva. A PAG tem o papel de controlar a nocicepção produzindo um efeito analgésico por uma via descendente que envolve neurotransmissão serotoninérgica nos núcleos da rafe ou noradrenérgica no locus ceruleus (17).

Receptores CB1 estão presentes em áreas relacionadas à dor no SNC e SNP, como a substância cinzenta periaquedutal, corno dorsal da medula e gânglios da raiz dorsal, além de nervos periféricos (39). No SNP, receptores CB1 nos terminais sensoriais controlam a transdução de sinais provenientes de estímulos nocivos (40). Na medula, há alta expressão de CB1 nos terminais pré-sinápticos de interneurônios excitatórios no corno dorsal, onde pode ter efeito anti-nociceptivo em casos de dor aguda (41). Além disso, injeção de agonistas canabinóides no tálamo ou PAG também tem efeito anti-nociceptivo em dor aguda (41). Portanto, o sistema eCB é capaz de limitar a nocicepção em nível central e periférico. Na periferia, receptores CB1 e CB2 localizados nos terminais sensoriais aferentes regulam a transdução de sinais nociceptivos provenientes de estímulos nocivos (41). No corno dorsal da medula espinhal, eCBs promovem analgesia através de ação em receptores CB1 nos terminais pré-sinápticos centrais de aferentes nociceptivos primários e de interneurônios excitatórios (41). No encéfalo, o sistema eCB controla a nocicepção modulando sinais nociceptivos ascendentes no tálamo, sinais anti-nociceptivos centrais descendentes no tronco encefálico e fatores emocionais relacionados à dor através de ação em circuitos límbicos frontais (41). Ainda, a ação de eCBs sobre receptores CB2 na periferia promove um efeito anti-inflamatório, que reduz a algia causada por inflamação (41).

O sistema eCB reduz a nocicepção e a hiperalgesia em modelos experimentais de dor neuropática, inflamatória e aguda (42). Estudos clínicos demonstraram eficácia no uso de canabinóides para combater a dor em patologias como esclerose múltipla e artrite reumatoide e dor crônica (42).

1.3.5 Memórias aversivas

A formação de memórias aversivas é essencial para a sobrevivência, uma vez que impacta a resposta do animal a estímulos potencialmente ameaçadores. Em laboratório, o método mais utilizado para investigar memórias aversivas tem sido o

condicionamento clássico de Pavlov. Nesse método, o animal é exposto a um estímulo inócuo, que é chamado de estímulo condicionado (CS), como um som, o qual é apresentado ao mesmo tempo em que um estímulo nocivo, como um choque, o qual é chamado de estímulo não-condicionado (US). Dessa forma, quando exposto novamente ao CS, o animal passa a antecipar a presença do US e apresenta uma resposta aversiva, como congelamento, sobressalto, aumento da frequência cardíaca, entre outros (43). A estrutura central no processamento de memórias aversiva é a amígdala, na qual há intensa atividade neuronal na resposta de medo. A amígdala também recebe informação sensorial de várias partes do cérebro, sendo capaz de realizar a associação entre CS e US (44).

O hipocampo é uma estrutura que há muito tempo é relacionada a memória e cognição (45), no entanto também tem um papel importante na emocionalidade (46, 47). Essas funções distintas são reguladas por regiões diferentes, hipocampo dorsal e hipocampo ventral, respectivamente (47) (Figura 1.2). O hipocampo dorsal participa principalmente da memória espacial. As projeções enviadas pela região CA1 dorsal ao córtex cingulado anterior transmitem informações sobre o contexto e, dessa forma, impactam tarefas de memória espacial. Além disso, a região CA3 dorsal transmite informações sobre o contexto até a área tegmental ventral (VTA) de forma indireta por meio de projeções para o septo, podendo influenciar a associação entre recompensa e contexto. O hipocampo dorsal também estende projeções para o hipocampo ventral. Este se comunica com o núcleo accumbens (nACC), assim sendo capaz também de controlar a VTA, com o hipotálamo, onde é possível que exerça controle sobre o eixo HPA, com o córtex pré-frontal medial (mPFC) – circuito importante para ansiedade, medo condicionado e tarefas cognitivas de memória espacial –, com o núcleo do leito da estria terminal (NLET), estrutura relacionada à ansiedade e que está conectada à VTA, amígdala e hipotálamo, e, finalmente, com a amígdala (48). O circuito formado por hipocampo ventral e amígdala exerce controle sobre ansiedade e comportamento social, mas também pode participar de processos de condicionamento aversivo ao contexto e auditivo (48). Logo, dados da literatura sugerem que, no condicionamento aversivo contextual, o hipocampo dorsal transmite as informações sobre o contexto para o hipocampo ventral, o qual se comunica com a amígdala, onde ocorre a associação entre CS e US (49).

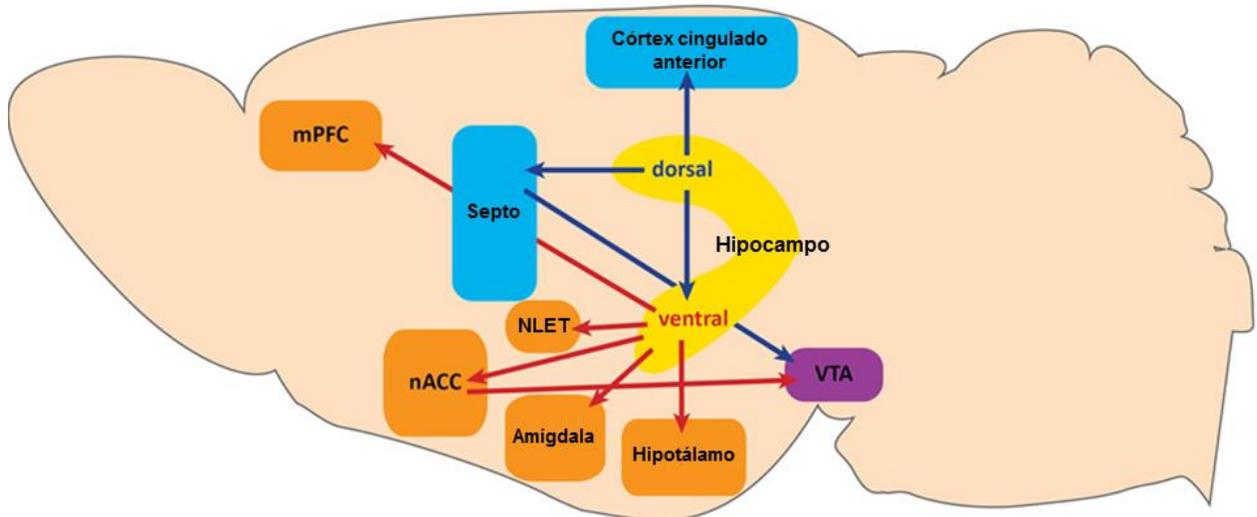


Figura 1.3 Circuito no eixo dorsoventral do hipocampo. O hipocampo dorsal forma conexões com o córtex cingulado anterior, septo e hipocampo ventral. Este se projeta para amígdala, hipotálamo, córtex pré-frontal medial (mPFC), núcleo accumbens (nACC) e núcleo do leito da estria terminal (NLET). Tanto o septo quanto o nACC projetam para a área tegmental ventral (VTA). Adaptado de (48).

Ao nível celular, a formação de memórias aversivas depende da plasticidade sináptica no hipocampo e amígdala. O processo de potenciação de longa duração (LTP) é o processo de plasticidade sináptica mais bem estudado e é apontado como responsável pela aquisição de memória (49). A LTP ocorre por meio da neurotransmissão glutamatérgica. Em resposta a um estímulo de alta frequência há liberação de glutamato pelo terminal pré-sináptico, que ativa receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA). Após o limiar de despolarização ser atingido, ocorre a ativação dos receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) no terminal pós-sináptico. Os receptores NMDA possibilitam o influxo de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico, o que causa uma série de eventos de curto e de longo prazo, como a inserção de mais receptores AMPA na superfície do terminal pós-sináptico e ativação de fatores de transcrição, que provocam o aumento da eficácia sináptica (17). A ativação de receptores NMDA pelo glutamato e indução de LTP tanto no hipocampo como na amígdala é essencial para a formação de memórias no condicionamento aversivo contextual (50-52). Além disso, a neurotransmissão GABAérgica inibitória também é importante neste processo. Durante a aquisição de memórias aversivas, a síntese e a liberação de GABA são reduzidas, facilitando a indução de LTP nas sinapses excitatórias (49).

Quando apresentado a uma tarefa, o traço de memória proveniente dessa experiência passa por uma série de processos responsáveis pela formação ou não da memória de longo prazo (Figura 1.3). A primeira fase é chamada de aquisição e leva à formação de uma memória de curto prazo de caráter instável. Após a fase de consolidação, que dura até 24 horas após a exposição à tarefa, o traço de memória é estabilizado e armazenado como memória de longo prazo. Se não ocorrer reativação desse traço de memória, ocorre o esquecimento. No entanto, se houve reativação, a manutenção da memória de longo prazo depende do processo de reconsolidação, sem o qual o traço de memória também cai no esquecimento. Quando ocorre reativação, a memória encontra-se novamente em um estado lábil, passível de modificação. Se o animal for reexposto à mesma tarefa com o pareamento de CS e US, ocorre reconsolidação. Por outro lado, se não houver pareamento de CS e US, ou seja, se o CS for apresentado repetidamente ou por um longo período de tempo na ausência do US, ocorre extinção (44) (Figura 1.3). A extinção difere do esquecimento uma vez que é, na verdade, considerada uma outra forma de aprendizado, em que um novo traço de memória (CS-sem US) é criado e reprime o traço de memória anterior (CS-US) (44).

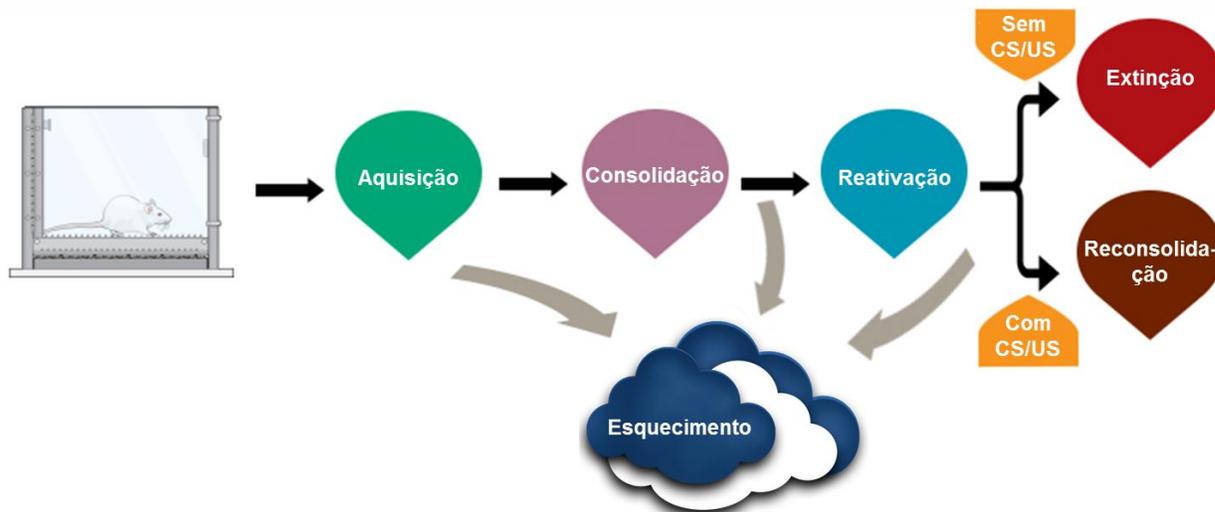


Figura 1.4 Processos de construção e desconstrução da memória. O primeiro evento é o de aquisição do traço de memória, que é seguido pela consolidação e consequente estabilização do mesmo. Em um evento de reativação, o traço de memória se torna instável e pode sofrer extinção, caso não seja realizado o pareamento de CS e US (Sem CS/US), ou reconsolidação, caso haja pareamento de CS e US (Com CS/US).

A expressão de receptores CB1 encontra-se em altas densidades no hipocampo e córtex frontal, duas regiões de grande importância para a formação dos

processos de memória, onde pode exercer um efeito modulador sobre as diferentes fases da memória e aprendizado (53-60). No hipocampo, o receptor CB1 está localizado em terminais sinápticos glutamatérgicos, onde inibe a sinalização excitatória glutamatérgica (61, 52). No entanto, CB1 é predominantemente encontrado em terminais sinápticos GABAérgicos de interneurônios inibitórios que expressam CCK, onde agonistas de CB1 reduzem a liberação de GABA (63, 64). Receptores CB1 são encontrados no núcleo basolateral da amígdala também em terminais pré-sinápticos de neurônios GABAérgicos que expressam CCK, onde controlam a liberação de GABA (65). O papel do sistema eCB no aprendizado e memória ainda é controverso em certos aspectos. Por um lado, foi demonstrado que tratamento com agonistas do receptor CB1 tem um efeito amnésico (66, 67). Ainda, infusão de um agonista de CB1 no núcleo basolateral da amígdala reduziu consolidação e reativação de memórias aversivas (68). Por outro lado, há estudos na literatura que mostraram que o aumento na disponibilidade de AEA pode facilitar a aquisição, principalmente no caso de memórias aversivas (69, 70). Além disso, alguns estudos também argumentam que a infusão de um antagonista de receptores CB1 diretamente no hipocampo, mPFC ou núcleo basolateral da amígdala produz um efeito amnésico (53, 55, 58, 71).

O processo de reconsolidação não recapitula a consolidação da mesma forma. Estudos sugerem que o papel da reconsolidação é a integração de nova informação ao traço de memória, o que causa a sua atualização (72). As principais estruturas cerebrais envolvidas nesse processo são amígdala, hipocampo, no que diz respeito a pistas contextuais, e área pré-límbica do mPFC (73). Os principais sistemas de neurotransmissores que participam da reconsolidação são glutamato, noradrenalina e eCBs. Sinalização pelos receptores NMDA de glutamato e β -adrenérgicos de noradrenalina facilitam a reconsolidação de memória, enquanto a alta ativação de receptores CB1 a inibe (73). A extinção de memórias aversivas ocorre quando o CS é apresentado na ausência de US. O indivíduo, então, deixa de expressar a resposta de medo quando é exposto ao CS, porém esse fenômeno não é fruto de esquecimento. Durante os testes de extinção, forma-se uma nova associação entre CS e ausência de US que compete com a associação prévia entre CS e presença de US (49, 73, 74). As estruturas do SNC responsáveis pela extinção de memórias aversivas são a amígdala, onde ocorre a aquisição e o armazenamento das memórias de extinção, o hipocampo,

que controla o fator de contexto, e a região infralímbica do mPFC, que realiza a consolidação da memória de extinção (49, 73). Assim como na reconsolidação, a extinção requer ativação de receptores NMDA, no entanto somente a extinção envolve canais de Ca^{2+} voltagem dependentes do tipo L (73). O sistema eCB também é capaz de regular a extinção de memórias. Animais com deleção genética do receptor CB1 ($CB1^{-/-}$) apresentam um déficit na extinção de memórias aversivas, assim como animais selvagens ($CB1^{+/+}$) tratados com antagonista do receptor CB1 (75). Além disso, o tratamento com agonistas de CB1 ou inibidores da degradação de AEA facilita a extinção (76-78).

1.4 Neuroinflamação na sepse

A neuroinflamação é o processo de ativação do sistema imunológico inato do cérebro em resposta a algum tipo de estímulo inflamatório. Esse processo é iniciado com a ativação de células gliais – astrócitos e microglia – que passam a produzir moléculas pró-inflamatórias, como citocinas, quimiocinas e prostanoídes. A neuroinflamação é encarada como agente causador de doenças psiquiátricas (79) e neurodegenerativas (80). Ela pode se originar no próprio cérebro, como ocorre nos casos de envelhecimento, estresse, alteração na liberação de neurotransmissores, lesão cerebral traumática, encefalite ou isquemia, ou na periferia, como no caso da sepse (81, 82).

A sepse é uma patologia definida por infecção e falha múltipla de órgãos e que pode causar um quadro de encefalopatia associada à sepse (EAS). Até 70% dos pacientes que desenvolvem sepse podem apresentar EAS, exibindo disfunção cognitiva, déficit de atenção, depressão e potencialmente coma (83). A EAS é uma patologia complexa, uma vez que é causada por fatores diversos, como redução do aporte sanguíneo cerebral e disponibilidade de oxigênio para o cérebro, comprometimento da barreira hematoencefálica (BHE), alterações no metabolismo celular, edema cerebral, alterações na neurotransmissão e aumento na produção de citocinas inflamatórias (84, 85). A fim de investigar os fatores que levam à disfunção cerebral na sepse, uma série de esforços têm se voltado à tentativa de mimetizar a EAS em modelos animais. A injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) e a ligadura e punção cecal (CLP) são modelos experimentais bem sucedidos na reprodução da

EAS, produzindo efeitos semelhantes à mesma, como aumento na concentração de citocinas pró-inflamatórias e déficits de memória (86, 87). O LPS age ligando-se a receptores Toll-like 4 (TLR4) em células do sistema imune, desencadeando um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (88). Em modelos de endotoxemia sistêmica, a interação entre LPS e TLR4 no cérebro ocorre nos órgãos circunventriculares, onde a barreira hematoencefálica é permeável. Além disso, a elevada produção de citocinas inflamatórias na periferia causa a ativação do endotélio cerebral, o que provoca o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (88). Ambos os casos levam à ativação da microglia, o que propaga e amplifica a inflamação no cérebro (89, 90).

1.4.1 Neuroinflamação e dano cognitivo

Uma das consequências da EAS é disfunção cognitiva, que pode persistir de 6 meses a 8 anos após alta hospitalar (91, 92). Nos modelos de EAS em roedores já foi observado dano cognitivo de longo prazo de 30 dias a 3 meses após a indução de sepse (93-96). Essas alterações já foram observadas em testes comportamentais para memória espacial, memória de habituação, memória de reconhecimento de objetos e memórias aversivas (93-100). Alguns estudos apontam o estresse oxidativo e a inflamação como os fatores mais importantes no desenvolvimento de dano cognitivo após EAS (101-104). Dos fatores pró-inflamatórios mais apontados como responsáveis pela disfunção cognitiva que ocorre na EAS podemos citar a interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6) (104-107).

Em condições fisiológicas, a expressão de IL-1 β no cérebro é muito baixa, no entanto sua expressão é induzida no hipocampo após tarefas de memória espacial e encontra-se aumentada durante o período em que ocorre a consolidação de memória (108). Alguns estudos mostram que a administração de baixas doses de IL-1 β por via intracerebroventricular (icv) pode facilitar a consolidação de memória em tarefas dependentes da atividade do hipocampo, enquanto o bloqueio da sinalização por IL-1 β através de estratégias de manipulação farmacológica ou genética tem efeito amnésico (108). Portanto, entende-se que níveis baixos de IL-1 β no hipocampo são necessários para os processos de aprendizado e memória. Contudo, uma série de estudos demonstraram que a administração de IL-1 β ou o aumento da produção de IL-1 β e

expressão de seu receptor em condições inflamatórias (109) induzem dano cognitivo em tarefas de memória dependentes do hipocampo (104, 105, 108). No modelo de sepse em que é utilizada injeção de LPS, os níveis séricos e cerebrais de IL-1 β encontram-se elevados 4 horas após a injeção e atingem um pico após 24 horas (110). Em níveis elevados, a IL-1 β pode interferir com a neurotransmissão estimulando a produção de glutamato, através de aumento na expressão de glutaminase (111), e reduzindo a captação de glutamato por células gliais através de redução de transportadores de glutamato na superfície celular (112). Esses mecanismos podem contribuir para a toxicidade neuronal encontrada em modelos de EAS. Além disso, a IL-1 β é capaz de inibir a fosforilação de receptores AMPA e, por isso, o seu direcionamento para a membrana, atenuando a LTP no hipocampo (113). A IL-1 β também pode reduzir o número de sinapses em cultura de neurônios do hipocampo (114) e atenuar a indução de expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (115). Todos esses mecanismos podem ser apontados como responsáveis pelo dano cognitivo decorrente de elevação nos níveis de IL-1 β .

A IL-6 tem um papel prejudicial em processos cognitivos no contexto do envelhecimento (116), mas evidências sugerem que esta citocina tem um papel fisiológico que envolve a terminação da LTP e, conseqüentemente, a inibição da formação de memória (108). Em camundongos que receberam injeção de LPS, a ausência de IL-6 por deleção genética protege contra o dano de memória de curto prazo induzido pela inflamação, além de inibir a expressão de outras citocinas inflamatórias somente no SNC (117). Após a injeção de LPS os níveis séricos de IL-6 se elevam rapidamente, atingindo um pico após 4 horas e posteriormente retornando próximo a níveis basais (110). No cérebro, a produção de IL-6 também aumenta rapidamente, com elevação 4 horas após a injeção de LPS, e se mantém relativamente estável, com uma pequena elevação após 16 horas (110).

1.4.2 Neuroinflamação e o sistema eCB

O papel modulatório do receptor CB2 no sistema imunológico é bem estabelecido (118), contudo o receptor CB1 também pode participar da regulação da resposta inflamatória. Apesar de baixa, a expressão de CB1 em células do sistema imune existe e pode contribuir para a supressão de mecanismos pró-inflamatórios em

células dendríticas, células T, células B e macrófagos (119). No SNC, eCBs são capazes de inibir a ativação da microglia através de receptores CB1 (119). As células microgliais podem ser ativadas para assumir o fenótipo clássico M1, que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e que tem um papel central na defesa contra infecções virais e bacterianas. Alternativamente, as células da microglia podem ser ativadas e assumir o fenótipo M2, no qual expressam moléculas anti-inflamatórias e promovem efeito neuroprotetor e reparo do tecido (120). Um estudo recente demonstrou que a microglia M1 apresenta supressão da expressão de proteínas do sistema eCB, incluindo CB1 e CB2, enquanto a microglia M2 apresenta um aumento na expressão dessas proteínas (121). Além disso, a exposição de células microgliais em cultura a 2-AG e AEA induziu a polarização no fenótipo M2, processo que pode ser mediado tanto por CB1 como CB2 (121).

Em modelos de EAS, citocinas inflamatórias causam um aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em células gliais, gerando elevação nos níveis de óxido nítrico (NO), o qual tem um papel importante na disfunção neuronal (122). O NO pode modular a auto-regulação do fluxo sanguíneo cerebral e influenciar a transmissão sináptica, causando alteração comportamental e neuroendócrina, e perturbando a formação de memórias (122). Além disso, o NO inibe a respiração mitocondrial, o que provoca depleção dos níveis de ATP, desregulação da homeostase de Ca^{2+} no citoplasma e morte neuronal (122). Em astrócitos, o aumento da produção de NO induzido por aplicação de LPS *in vitro* é inibido pela aplicação de AEA e também do agonista de CB1 e CB2 CP-55940 (123). Ainda, tratamento com o antagonista seletivo para CB1, SR-141716A, provocou um acréscimo na produção de NO induzida por LPS, indicando que eCBs endógenos modulam a resposta inflamatória em astrócitos (123). Outro estudo também demonstrou que tratamento com o agonista canabinoide WIN55212-2 inibe a produção de mediadores inflamatórios em cultura de astrócitos estimulados com IL-1 β (124).

O estudo do papel do sistema eCB em modelos de sepse ainda é incipiente. No entanto, um estudo demonstrou que o tratamento com canabidiol, um dos compostos ativos da *Cannabis* que não possui efeito psicotrópico e que acredita-se agir como modulador alostérico negativo de receptores CB1, em um modelo de sepse

induzida por CLP foi capaz de reduzir o estresse oxidativo no SNC e na periferia, além de reduzir o dano cognitivo decorrente de sepse e a mortalidade (125). Em contraste, no modelo de sepse por injeção de LPS, uma dose baixa de THC (0,002 mg/Kg) foi capaz de prevenir o dano cognitivo induzido por inflamação, além de reduzir a expressão de cicloxigenase-2 (COX-2), enzima responsável pela produção de prostaglandinas e induzida durante o processo inflamatório (126). Ainda, o estímulo da sinalização por eCBs, por meio de tratamento com um inibidor do transporte de AEA, suprime a produção de IL-1 β e IL-6 induzidas por LPS, sendo que pelo menos o efeito sobre IL-1 β é mediado por CB1 (127). O tratamento com o agonista canabinóide HU210 inibiu a produção de IL-1 β induzida por LPS no cérebro e plasma de ratos por um mecanismo dependente de CB1 (128). Finalmente, o tratamento com baixas doses de LPS causa uma redução nos níveis de CB1 no hipocampo especificamente em sinapses glutamatérgicas (129).

Os dados aqui apresentados indicam que o sistema eCB pode ter um efeito benéfico no tratamento de patologias induzidas por neuroinflamação. De fato, seu efeito neuroprotetor (130) o torna atrativo para o tratamento de várias disfunções que envolvem neurodegeneração. Levando em conta que a disponibilidade de CB1 pode estar reduzida em pré-sinapses de neurônios glutamatérgicos em alguns modelos de sepse (129), a sua capacidade de conter a excitotoxicidade induzida por excesso de liberação de glutamato pode estar comprometida, portanto é possível que o aumento na ativação de CB1 possa compensar esse fato e reduzir a liberação de glutamato. Ao combinar neuroproteção, efeito anti-inflamatório e modulação sobre processos de memória, o sistema eCB tem um grande potencial como alvo para a prevenção do dano cognitivo decorrente de neuroinflamação.

1.4.3 Neuroinflamação e LXA₄

Devido ao papel anti-inflamatório da ação da LXA₄ em receptores ALX é de se esperar que o tratamento com a mesma alivie os sintomas da sepse. De fato, em modelos de CLP a LXA₄ é capaz de inibir a resposta inflamatória na periferia, reduzir a carga bacteriana e aumentar a taxa de sobrevivência (131, 132). No entanto, os papéis da LXA₄ na resposta inflamatória no SNC e na restauração do dano cognitivo induzido por neuroinflamação ainda não foram bem estudados. Em modelos de isquemia

cerebral focal, um análogo estável da LXA₄, lipoxina A₄ metil éster (LXA₄ME), foi capaz de diminuir a disfunção da BHE reduzindo a expressão da metaloproteinase de matriz-9 (133); além de reduzir a inflamação através de supressão da infiltração de neutrófilos, peroxidação de lipídios, produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de astrócitos e microglia e aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias (134). Em um modelo de hipoperfusão cerebral crônica, tratamento com LXA₄ME icv por 2 dias resgatou o dano cognitivo avaliado por uma tarefa de memória espacial, além de reduzir a perda neuronal, a peroxidação de lipídios e a expressão de proteínas pró-apoptóticas no hipocampo (135). Em roedores submetidos à lesão cerebral traumática, a LXA₄ administrada por via icv reduziu a permeabilidade da BHE, o edema cerebral e a expressão de citocinas pró-inflamatórias (136). Em camundongos submetidos a injeção de β -amilóide, a LXA₄ inibiu o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias no córtex, no hipocampo e em cultura de células microgлияis (137), além de resgatar o dano cognitivo induzido por β -amilóide através de um mecanismo dependente de CB1 (12).

O tratamento com aspirina provoca uma acetilação irreversível na enzima COX-2, o que a faz com adquirir ação de lipoxigenase. Dessa forma, a COX-2 metaboliza o AA em células epiteliais e monócitos a 15R-HETE, o qual é convertido a 15-epi-lipoxina A₄ (15-epi-LXA₄) pela 5-LO nos leucócitos (6). É possível que a 15-epi-LXA₄ também atue em receptores CB1, uma vez que é capaz de induzir catalepsia em camundongos assim como a LXA₄ (138). Em um modelo transgênico da doença de Alzheimer, o tratamento com 15-epi-LXA₄ foi capaz de aumentar o recrutamento de microglia M2, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentando a produção de citocinas anti-inflamatórias e promovendo a remoção de depósitos de β -amilóide por fagocitose, além de resgatar o dano cognitivo nesses animais (139). A 15-epi-LXA₄ também é capaz de reduzir a ativação e a resposta inflamatória em cultura de células microgлияis e astrócitos estimuladas com LPS (140-142).

Tendo em vista todas as evidências citadas, é possível formular a hipótese de que a administração de LXA₄ seria benéfica para o tratamento da EAS. Através de sua ação anti-inflamatória em receptores ALX (6), a LXA₄ tem o potencial de reduzir a resposta inflamatória exacerbada nos órgãos periféricos em modelos de sepse. No SNC, a ação da LXA₄ sobre receptores CB1 (12) pode potencialmente induzir

neuroproteção através de redução na ativação de células gliais (121, 123), de modulação da plasticidade sináptica ou por outros mecanismos (129, 130). Dessa forma, a LXA₄ poderia tanto reduzir o curso da resposta inflamatória como resgatar a disfunção cognitiva observada em modelos de sepse.

Os leucotrienos também são produtos do metabolismo das lipoxigenases que estão envolvidos com os processos de neuroinflamação. Estudos já demonstraram que leucotrienos são capazes de induzir ativação de células microgлияis, portanto, levando ao processo inflamatório (143, 144). Os leucotrienos também podem participar do dano cognitivo decorrente de neuroinflamação. Em modelo de lesão cerebral traumática, no qual há indução de inflamação, o bloqueio da produção de leucotrienos reduz a disfunção em aprendizado e memória em roedores (145). Além disso, em outro estudo, a infusão de LTD₄ no cérebro de camundongos induziu dano em memória e amiloidogênese através de ação em receptores CysLT₁ (146). A ação descrita para a LXA₄ como antagonista de receptores CysLT₁, bloqueando os efeitos de LTD₄ (9), é mais uma evidência do potencial da LXA₄ no tratamento da disfunção cognitiva induzida por neuroinflamação.

2. Objetivos

O objetivo principal deste estudo foi a investigação da interação entre LXA₄ e CB1 em condições basais e mediante neuroinflamação. Para isso, primeiro voltamos esforços para identificar funções reguladas pelo sistema eCB influenciadas pela disponibilidade de LXA₄ endógena. Este objetivo foi cumprido com a análise do comportamento de camundongos com deleção genética da enzima 5-LO (5-LO^{-/-}). Além disso, a produção de LXA₄ também foi avaliada em camundongos selvagens idosos, com a finalidade de esclarecer seu papel sobre cognição.

A fim de analisar o efeito da LXA₄ sobre o dano cognitivo induzido por neuroinflamação, camundongos selvagens foram submetidos a um protocolo de inflamação de sistêmica e seu comportamento foi avaliado, bem como o nível de citocinas pró-inflamatórias no SNC e na periferia. Os animais foram testados em uma tarefa de memória aversiva contextual para caracterizar o dano cognitivo apresentado, o qual poderia posteriormente ser revertido mediante tratamento com LXA₄.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Avaliar a participação de LXA₄ em funções reconhecidamente sob o controle do sistema eCB. O comportamento de ansiedade, o consumo de água e alimento, a locomoção, nocicepção e formação e extinção de memórias aversivas foram analisados em camundongos 5-LO^{-/-}. Ainda, a relação entre produção de LXA₄ e dano cognitivo em camundongos idosos selvagens foi investigada.

2.1.2 Avaliar o efeito do tratamento com LXA₄ na produção de citocinas pró-inflamatórias no SNC após estímulo inflamatório, relacionando possíveis efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores ao dano cognitivo.

2.1.3 Avaliar o potencial da LXA₄ na prevenção da disfunção cognitiva causada por neuroinflamação em modelo de sepse.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Camundongos isogênicos da linhagem SV129 com deleção gênica para a enzima 5-LO (5-LO^{-/-}) e seu controle genético (5-LO^{+/+}), também da linhagem SV129, foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e mantidos no Centro Nacional de Bioimagem (CENABIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 foram adquiridos do Instituto de Microbiologia Paulo Góes da UFRJ e mantidos no CENABIO. Camundongos não isogênicos *Swiss Webster* foram obtidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da FIOCRUZ e mantidos no CENABIO da UFRJ, ou no biotério do pavilhão Ozório de Almeida, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Os animais utilizados foram machos adultos jovens (3 a 4 meses), machos idosos (12 meses) ou fêmeas 5-LO^{-/-} e 5-LO^{+/+} adultas jovens (3 a 4 meses). Os camundongos foram mantidos em caixas coletivas (30 x 20 x 13 cm), contendo 3 a 5 indivíduos sob condição controlada de temperatura (23 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h, fase clara das 6:00 às 18:00). Água e ração especial para roedores foram providas *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram conduzidos cuidadosamente de acordo com as normas do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEUA/UFRJ IBQM058), que segue normas internacionais de utilização de animais para pesquisa científica.

3.2 Modelo de sepse

O modelo de sepse utilizado para este estudo foi a injeção aguda de LPS. Camundongos *Swiss Webster* adultos jovens (3-4 meses) receberam uma injeção de LPS de *Escherichia coli* 0127:B8 (0,3, 1 ou 3mg/kg i.p.; Sigma-Aldrich) dissolvido em solução de NaCl 0,9%, enquanto os animais no grupo controle receberam somente solução de NaCl 0,9%. Após o preparo da solução de LPS, a mesma foi submetida à sonicação por 5 min para dissolução das micelas formadas pelo LPS em solução. Este processo foi repetido a cada 30 min. O volume de injeção foi de 10ml/kg para todos os grupos experimentais. A injeção de LPS foi administrada imediatamente após o

condicionamento na tarefa de memória aversiva ou 24 h depois da mesma, ou ainda 4 h antes da coleta das amostras de plasma e cérebro.

A indução de inflamação pelo modelo utilizado, injeção única de LPS, é muito utilizada no estudo da biologia básica da sepse. Camundongos são tipicamente menos sensíveis aos efeitos sistêmicos do LPS. Em humanos, uma dose de 2 ng/kg é capaz de gerar efeitos psicológicos semelhantes aos da sepse, enquanto que em modelos murinos uma dose de 500 ng/kg não parece produzir efeitos comportamentais (147). Após a administração de LPS em doses mais altas, efeitos sistêmicos são aparentes após pouco tempo e sua progressão é rápida. O conjunto desses sintomas é chamado de *sickness behavior* e inclui redução da atividade locomotora, tremores, piloereção e hipotermia (147). Além disso, a produção de citocinas também aumenta rapidamente, atingindo um pico entre 1 hora e 30 minutos e 4 horas e 30 minutos após a injeção de LPS (147). No nosso modelo, utilizando a dose de 0,3 mg/kg de LPS, não foi possível observar alterações comportamentais indicativas de *sickness behavior* ou mortalidade, entretanto, houve aumento na produção de citocinas inflamatórias apenas 4 horas após a injeção de LPS.

3.3 Tratamentos

Camundongos *Swiss Webster* foram tratados com Lipoxina A₄ (LXA₄) (1-10 µg/kg i.p. ou 1 pmol/2µl icv; Cayman Chemical) dissolvida em solução de etanol 0,1% em solução salina (NaCl 0,9%), AM251 (1 ou 3 mg/kg i.p; Cayman Chemical), Zileuton (40 mg/kg, p.o.; Cayman Chemical) e MK-886 (3-10 mg/kg, i.p.; Cayman Chemical), dissolvidos em solução fisiológica contendo dimetilsulfóxido 10% (DMSO). Os veículos usados para dissolução foram utilizados como soluções controle. O volume de injeção foi de 10 ml/kg de peso corporal para via i.p. e 2µl para via icv. As injeções por via icv foram realizadas segundo previamente descrito (148, 149). Os camundongos foram anestesiados em uma câmara com isoflurano e os fármacos foram introduzidos com o uso de uma agulha (13 x 0,4 mm; 26 Gauge) acoplada a uma microseringa (Hamilton) por um tubo de polietileno. Um anteparo de tubo de polietileno foi utilizado para limitar a penetração da agulha a 2,5mm de profundidade. A cabeça do animal foi mantida na posição horizontal pelo experimentador e a agulha foi inserida unilateralmente de forma perpendicular ao crânio do camundongo. Duas linhas imaginárias, uma coronal

seguinto a base das orelhas e uma sagital, seguindo a linha medial do crânio, foram delimitadas. A intersecção entre duas linhas imaginárias secundárias, uma perpendicular à linha coronal da base das orelhas distante 2 a 3 mm na direção rostral e uma perpendicular à linha medial distante 1 a 2 mm, foi o sítio de injeção. Dessa forma é possível atingir os ventrículos laterais causando o mínimo possível de dano ao tecido.

3.4 Testes Comportamentais

Todos os experimentos comportamentais foram idealizados de modo a minimizar o número de animais utilizados e realizados seguindo estritamente normas internacionais de cuidado e manuseio de animais para experimentação científica. Cada bloco de experimentos foi realizado no mesmo período do dia, durante a fase clara, minimizando a influência de flutuações do ritmo circadiano dos animais. As salas de experimentação foram mantidas com temperatura (23 ± 2 °C) e luminosidade (aproximadamente 300-400 lux) controladas no período de habituação (pelo menos 1 hora antes dos experimentos) e durante o experimento. Os experimentos foram monitorados por equipamento de vídeo e avaliados *off-line* manualmente ou com uso do software Any-Maze (Stoelting) na função de *video tracking*.

3.4.1 Ansiedade

3.4.1.1 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado foi utilizado para avaliação de comportamento emocional tipo ansiedade (150). Os camundongos (3-4 meses ou 12 meses) foram testados num aparato em forma de cruz elevado a 50 cm do chão, que contém dois braços abertos opostos (30 x 5 cm), compostos de acrílico transparente, e dois braços fechados opostos (30 x 5 x 15 cm), compostos de madeira lacada branca. Os animais foram posicionados no centro do aparato na direção dos braços abertos e o exploraram livremente durante 5 minutos. O teste foi monitorado por vídeo e a avaliação dos vídeos foi realizada *off-line* manualmente com o uso de cronômetros. O tempo e o número entradas nos braços abertos foram utilizados como parâmetros de ansiedade e o número de entradas nos braços fechados foi utilizado como parâmetro locomotor. O

tratamento com AM251 (1 ou 3 mg/kg i.p), um antagonista seletivo de receptores CB1 e reconhecido como promotor de aumento nos níveis de ansiedade em roedores (151), foi utilizado como controle positivo de efeito ansiogênico.

3.4.1.2 Caixa claro-escuro

A caixa claro-escuro consiste em uma caixa de acrílico (50 x 20 x 20 cm) dividida por uma parede com uma pequena porta (10 x 3 cm) entre dois compartimentos de área semelhante. O compartimento claro foi iluminado por uma lâmpada de 60 W gerando uma luminosidade superior a 400 Lux. Já o compartimento escuro foi iluminado indiretamente e possui paredes negras, gerando luminosidade inferior a 30 Lux. A caixa foi utilizada para avaliação de comportamento emocional tipo ansiedade (152). Os animais (3-4 meses ou 12 meses) foram inicialmente posicionados no compartimento claro e a exploração livre do aparato foi avaliada por 5 min. O tempo em cada compartimento, claro e escuro, foi utilizado como parâmetro de ansiedade e o número de transições entre os dois compartimentos foi utilizado como parâmetro de locomoção durante o teste.

3.4.2 Consumo de água e alimento e peso corporal

Camundongos 5-LO^{-/-} e 5-LO^{+/+} (3-4 meses) tiveram seu consumo de alimento (ração padrão para roedores) e água monitorado durante um período de cinco dias. Durante esse período os animais receberam água e alimento *ad libitum*. A quantidade de ração e o volume de água foram medidos diariamente em cada gaiola de animais. Ao final do período de monitoramento, obtivemos uma taxa de consumo por dia para cada animal. O peso corporal de todos os camundongos 5-LO^{-/-} e 5-LO^{+/+} foi aferido em um único evento. A pesagem foi realizada em animais de aproximadamente 4 meses de idade.

3.4.3 Locomoção

Para a avaliação da atividade locomotora de animais 5-LO^{-/-} e 5-LO^{+/+} (3-4 meses), os camundongos foram submetidos ao teste de campo aberto. Este foi realizado em uma arena de 30x30x30 cm, a qual os animais exploraram livremente durante 10 minutos. A atividade durante esse período foi monitorada por uma câmera

filmadora (Sony Handycam). A avaliação dos vídeos foi realizada *off-line* pelo software Any-Maze. A velocidade média de locomoção e a distância total percorrida durante o teste foram utilizadas como parâmetros da atividade motora (153). A demarcação de duas zonas de mesma área, uma central e uma periférica, permitiu a análise do comportamento de ansiedade através do tempo e número de entradas no centro ou na periferia (154).

3.4.4 Teste de nocicepção

Para avaliar a nocicepção em camundongos 5-LO^{-/-} e 5-LO^{+/+} (3-4 meses), os animais foram submetidos ao teste de sensibilidade ao choque como descrito anteriormente (155). Os camundongos foram posicionados no centro de uma caixa de 26x10x35 cm, que possui no piso uma grade de metal conectada a um gerador de choque. Um minuto após o início do teste, os animais receberam uma sucessão de choques de 0,4 a 1,2 mA/2s em incrementos de 0,1 mA e em intervalos de 20 s. Dois limiares de nocicepção foram estabelecidos, o primeiro quando o animal apresentou uma leve agitação (*flinching*) e o segundo quando o animal pulou com as quatro patas e realizou vocalização (*jumping*). Ao encontrar a intensidade de choque que dá origem à resposta comportamental, ela foi diminuída e aumentada para confirmar a presença da resposta especificamente naquela intensidade de estímulo (156). Foi registrada para comparação entre os grupos a intensidade de choque em que o animal apresentou o comportamento característico de cada um dos limiares. O *flinching* é o primeiro sinal comportamental que indica que o animal sentiu o estímulo. O *jumping* ocorre com o aumento da intensidade de estímulo. Portanto, *flinching* e *jumping* são utilizados respectivamente como parâmetros de sensibilidade e tolerância à dor.

3.4.5 Memória e aprendizado

3.4.5.1 Condicionamento aversivo contextual

A fim de avaliar o dano cognitivo após neuroinflamação, camundongos *Swiss Webster* (3-4 meses) tratados com LPS foram posicionados no interior de uma caixa de condicionamento com piso em grades de metal conectadas a um gerador de choque. Foram permitidos 3 minutos de exploração para habituação à caixa e formação da memória de contexto. Após esse período de habituação, os animais receberam um

choque de 1 mA por 2 s. Decorridos 58 s após o choque, os animais foram retirados da caixa e retornaram à gaiola. Depois de período de sete dias, os animais foram reexpostos à caixa de condicionamento por 3 minutos. O teste foi registrado por equipamento de vídeo e analisado *off-line* manualmente com auxílio de um cronômetro. O tempo de congelamento, ou seja, ausência de movimento foi registrado como parâmetro da retenção de memória aversiva. Para avaliar o efeito da injeção de LPS no condicionamento de memória, os animais foram tratados imediatamente após a sessão de condicionamento. Ainda, a fim investigar o efeito do tratamento com LXA₄, uma injeção de LXA₄ (1pmol/2µl icv) foi administrada uma hora após a indução de inflamação com LPS (0,3mg/ml i.p.) (Figura 3.1).

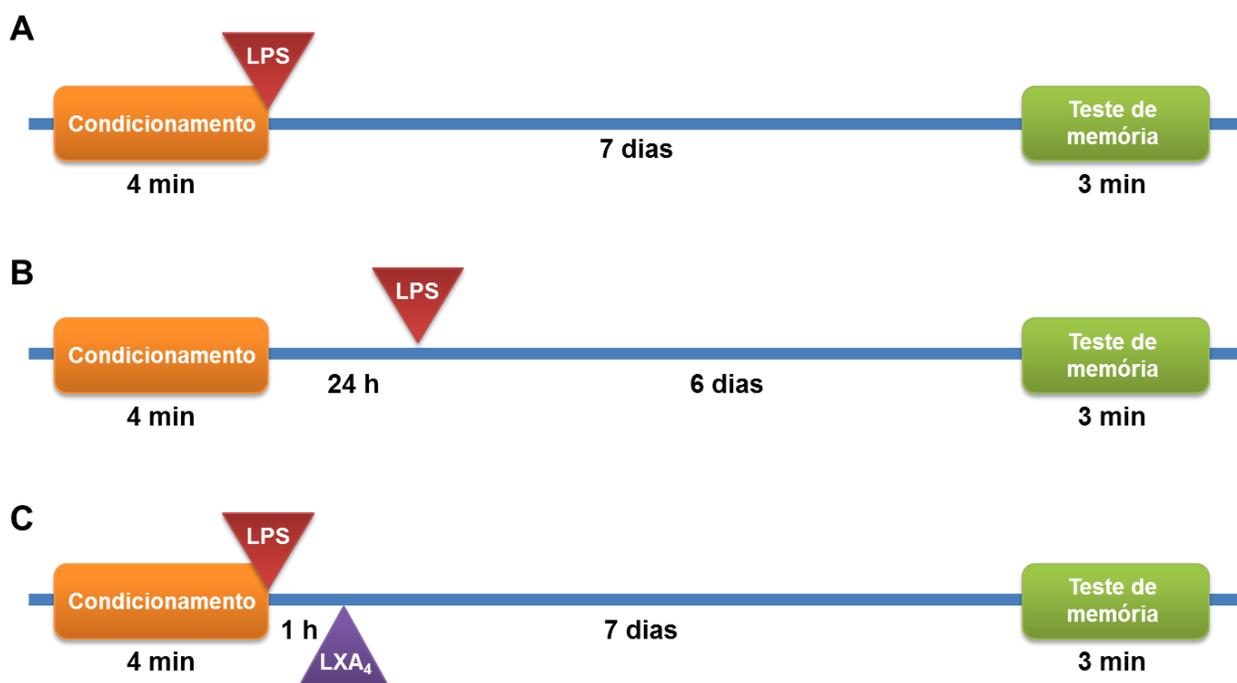


Figura 3.1 Protocolo de tratamento durante o condicionamento aversivo contextual. (A) Para avaliação do efeito do LPS sobre consolidação de memória, a injeção foi administrada imediatamente após a fase de condicionamento. (B) Para análise do efeito do LPS sobre a evocação de memórias já consolidadas, a injeção foi administrada após a fase de consolidação da memória, ou seja, 24 horas depois do condicionamento. (C) Para avaliar o efeito do tratamento com LXA₄ no dano cognitivo induzido por neuroinflamação, uma injeção de LXA₄ (1pmol/2µl icv) foi administrada 1 hora após a injeção de LPS.

Dessa forma, foi possível evitar qualquer influência de *sickness behavior* que poderia alterar o desempenho na tarefa ou a análise do teste de forma inespecífica (157). Para avaliar o efeito do LPS sobre memórias já consolidadas, o tratamento foi realizado 24 horas depois da sessão de condicionamento, ou seja, após o período de

tempo em que ocorre a fase de consolidação. Novamente, a aplicação de LPS 6 dias antes da avaliação comportamental final nos permitiu evitar a influência de *sickness behavior*.

3.4.5.2 Esquiva inibitória

O teste de esquiva inibitória foi utilizado para avaliar memória aversiva em camundongos 5-LO^{-/-} e 5-LO^{+/+} (3-4 meses). Para este teste foi utilizada uma caixa de 26x10x35 cm com piso em barras de metal conectadas a um gerador de choque. No centro da caixa foi instalada uma plataforma de acrílico medindo 10x10x4 cm, onde o animal foi posicionado no início do teste. Ao descer da plataforma espontaneamente, o animal recebeu um choque de 0,7 mA por 2 s e foi imediatamente retirado da caixa (158). Após 30 minutos ou 24 horas, os animais foram posicionados novamente sobre a plataforma e o tempo de latência para descer foi registrado. Um tempo máximo de 180 s de latência foi estipulado; se o animal não descesse após esse tempo seria gentilmente guiado para fora da plataforma. A fim de estabelecer uma curva de aprendizado, os animais foram imediatamente retornados à plataforma após o primeiro choque e a latência para descer novamente foi registrada. Caso a latência fosse menor do que o critério previamente estabelecido de 180 s, o animal receberia mais um choque, e assim sucessivamente até que atingisse 180 s de latência. O número de tentativas até atingir o critério foi registrado para comparação entre os grupos (86). Decorridas 24 horas da sessão de aprendizado, os camundongos foram posicionados novamente na plataforma e sua latência para descer foi registrada, dessa forma pudemos avaliar a consolidação e reativação de memória.

3.4.5.3 Extinção de memória

Foi estabelecido um protocolo para avaliar a extinção de memórias aversivas em camundongos 5-LO^{-/-} e 5-LO^{+/+} (3-4 meses). O teste de esquiva inibitória também foi utilizado, porém os animais foram condicionados sob um choque de alta intensidade (1 mA/2 s), assegurando que atingissem a latência máxima estipulada (180s), sendo assim possível observar a extinção. Os testes de extinção foram executados a partir do 12^o dia após o condicionamento. Nesses testes, os animais foram posicionados novamente sobre a plataforma e o tempo de latência para descer foi registrado. Um

máximo de 180 s foi estipulado e caso o animal não descesse, era gentilmente conduzido às barras metálicas no piso. Uma vez fora da plataforma, foram permitidos 30 s para exploração livre da caixa. Quatro exposições foram realizadas sucessivamente em intervalos de 24 h, ou seja, nos dias 12, 13, 14 e 15 após o condicionamento (159). Os valores de latência dos quatro testes de extinção foram comparados para os grupos analisados.

3.5 Ensaio bioquímicos

3.5.1 Preparo de amostras

Os camundongos (3-4 meses ou 12 meses) foram anestesiados profundamente com Isoflurano e rapidamente decapitados para coleta de amostras de cérebro e de plasma. No preparo das amostras de plasma, o sangue dos animais (aproximadamente 900 µl) foi coletado por punção cardíaca e diluído em 100 µl de citrato de sódio 3,2%, utilizado como agente anticoagulante. O sangue foi, então, centrifugado a 3000 rpm por 6 min e o sobrenadante foi coletado para dosagem de eicosanoides e citocinas por ELISA. No preparo de amostras de cérebro, o tecido fresco foi coletado e pesado e, em seguida, homogeneizado em tampão de lise RIPA com inibidores de proteases e fosfatases (Santa Cruz Biotechnology).

3.5.2 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas das amostras de cérebro foi quantificada pelo método do ácido bicinonínico (BCA), ou ensaio à base de cobre (Thermo Scientific). As amostras foram diluídas 20 vezes e aplicadas no volume de 10µl a uma placa de 96 poços. Em seguida foi adicionado o reagente contendo sulfato de cobre (II) e BCA e a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos. O método é baseado na redução de Cu^{+2} a Cu^{+1} realizada por proteínas num meio alcalino e na detecção colorimétrica de Cu^{+1} com BCA (160). O reagente forma uma cor roxa que corresponde à quelação de duas moléculas de BCA com um íon Cu^{+1} . A absorbância foi medida por espectrofotometria a 562 nm. Os valores obtidos para as amostras foram comparados a uma curva padrão obtida a partir de albumina de soro bovino (BSA) e a concentração de proteína foi determinada.

3.5.3 ELISA para dosagem de LXA₄ e cisteinil-leucotrienos

A quantificação dos níveis de LXA₄ no cérebro de camundongos (córtex, hipocampo) foi realizada por meio de kit de ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) competitivo (Oxford Biomedical Research). As amostras foram incubadas com o composto conjugado HRP-LXA₄ (peroxidase) por 1 hora à temperatura ambiente (25 °C) em placa de 96 poços tratada com anticorpos anti-LXA₄. Após sucessivas lavagens, a reação foi revelada com uso de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) como substrato, cuja coloração azul é inversamente proporcional à quantidade de LXA₄ na amostra. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm. A quantidade de LXA₄ nas amostras foi normalizada pela concentração de proteína (em mg) nas amostras de cérebro ou pelo volume da amostra de plasma.

A dosagem dos níveis de cisteinil leucotrienos (cys-LTs) foi realizada por meio de kit de ELISA competitivo (Cayman Chemical). As amostras foram incubadas com o conjugado cys-LT-acetilcolinesterase e anticorpos específicos anti-cys-LT numa placa de 96 poços tratada com anticorpo anti-IgG de camundongo. Após sucessivas lavagens, as placas foram reveladas com reagente de Ellman, que contém o substrato para a acetilcolinesterase. A absorbância foi medida por espectrofotometria (412 nm) e a concentração de cys-LTs foi calculada como uma medida inversamente proporcional à intensidade de cor amarela observada. A quantidade de cys-LTs foi normalizada de acordo com o volume da amostra.

3.5.4 ELISA para dosagem de IL-1 β e IL-6

Amostras de cérebro e plasma de camundongos *Swiss Webster* tratados com LPS na presença ou ausência de LXA₄ foram submetidas a dosagem de IL-1 β e IL-6 por ELISA sanduíche (R&D Systems). Uma placa de 96 poços foi incubada *overnight* com o anticorpo de captura à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada com tampão salina-fosfato (PBS) e incubada com solução de bloqueio (PBS contendo BSA 1%) por uma hora à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, foram aplicados 50 μ l das amostras e foi realizada incubação *overnight* à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente e 50 μ l do anticorpo de detecção conjugado a biotina foram aplicados a cada poço durante uma hora. A placa foi então incubada por

30 minutos com streptavidina-HRP, a qual se liga ao anticorpo de detecção. Finalmente, foi aplicado o substrato TMB por 20 minutos. Uma solução de ácido sulfúrico 1 M foi adicionada para parar a reação, mudando a cor do azul para o amarelo. A absorbância foi medida por espectrofotometria (450 nm) e a concentração das citocinas foi normalizada de acordo com o volume da amostra de plasma ou com a concentração de proteína nas amostras de cérebro.

3.5.5 Western Blotting

Amostras de hipocampo, córtex e cerebelo de camundongos 5-LO^{-/-} e 5-LO^{+/+} foram coletadas e homogeneizadas em tampão de lise RIPA com inibidores de proteases e fosfatases (Santa Cruz Biotechnology) para análise da expressão de CB1 por *Western Blotting* (WB). Os procedimentos foram conduzidos como descrito previamente (161). A quantidade de proteínas das amostras foi aferida pelo kit para ensaio de BCA (Thermo Fisher Scientific, USA). As amostras foram, então, diluídas à concentração de 3 mg/ml de proteína e preparadas com tampão de amostra Laemmli para WB (60mM Tris-Cl pH 6.8, dodecil sulfato de sódio 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,01%). Em seguida, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, o qual foi posteriormente transferido para uma membrana de PVDF Immobilon-FL (Merck Millipore). As membranas foram bloqueadas por 1h com tampão de bloqueio para WB de fluorescência (Rockland) e incubadas com anticorpo anti-CB1 1:1000 (Merck Millipore) e anti-β-actina (Sigma-Aldrich) *overnight* e, posteriormente, com os anticorpos secundários conjugados a um fluoróforo infravermelho (680 e 800 nm) por 45 min. Finalmente, as membranas foram reveladas por um sistema de imagem com emissão de luz infravermelha Odyssey (Li-Cor Biosciences). As imagens obtidas foram analisadas pelo software Image Studio (Li-Cor Biosciences) e os valores de densitometria óptica foram normalizados pelo controle de carregamento β-actina.

3.5.6 Imunohistoquímica

Camundongos 5-LO^{-/-} e 5-LO^{+/+} foram sacrificados por anestesia profunda e submetidos a perfusão transcardíaca com PBS e posteriormente com paraformaldeído (PFA) 4%. Os cérebros foram dissecados e mantidos submersos em solução de PFA

4% a 4°C *overnight*. Em seguida, foram submetidos à crioproteção em solução de sacarose 30%. Seções de 40 µm foram obtidas em criostato a -20°C abrangendo a área do hipocampo. As seções foram montadas em lâminas de vidro e processadas para imunohistoquímica. As lâminas foram submersas em solução tampão citrato 0,01 M a 60°C por 20 minutos para realizar a recuperação de antígeno. Em seguida, as seções foram permeabilizadas com cloreto de amônio 50 mM e Triton X-100 0,5% por 20 minutos; este passo também é responsável por reduzir a auto-fluorescência do tecido. Foi realizado bloqueio de sítios inespecíficos com solução de BSA 5% por uma hora à temperatura ambiente e as seções foram incubadas com anticorpo anti-CB1 1:1000 (Merck Millipore) *overnight* a 4°C. Subsequentemente as seções foram incubadas com anticorpo anti-IgG de coelho Alexa Fluor® 594 (Life Technologies) 1:400 por 2 horas e o agente intercalante de DNA DAPI por 5 minutos. Um passo final para eliminação de auto-fluorescência para lipofuscina foi realizado com a incubação com Sudan Black B 1% em etanol 70% por 5 minutos. Em seguida as lâminas foram montadas com uma lamínula de vidro e auxílio do meio de montagem Aqua Poly/Mount (Polysciences). As imagens foram analisadas pelo *software* ImageJ (NIH) assim como previamente descrito (162). Duas camadas foram destacadas e selecionadas para quantificação de densitometria óptica, *stratum pyramidale* (SP) e *stratum radiatum* (SR) baseado na descrição de alta expressão de CB1 (158) tanto na região CA1 como na região CA3 do hipocampo (Figura 3.2).

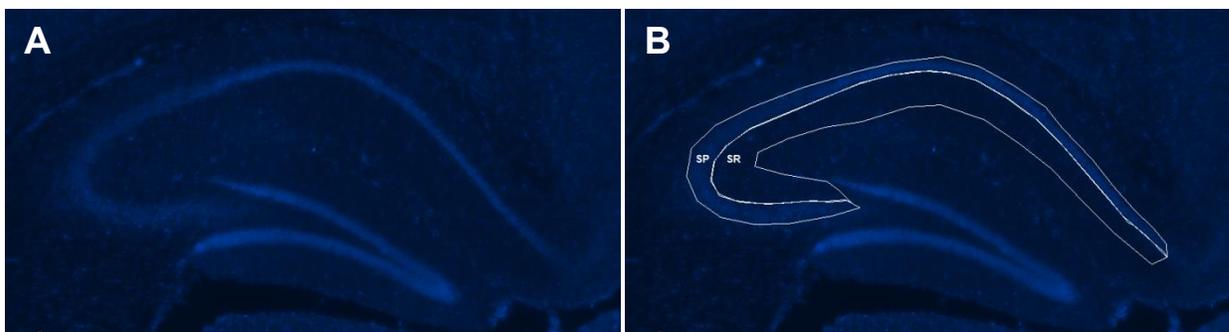


Figura 3.2 Exemplificação do método de quantificação das imagens obtidas em microscopia de fluorescência. As camadas *stratum pyramidale* (SP) e *stratum radiatum* (SR) foram delimitadas para a quantificação da densitometria óptica.

3.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e os experimentos foram avaliados por teste t de student não pareado, análise de variância (ANOVA) de 1 via, ou ANOVA de 2 vias com pós-teste de Bonferroni. Os testes *post hoc* de Newman-Keuls ou de Dunnett foram utilizados para comparações ponto a ponto após análise global por ANOVA. Todos os testes foram conduzidos considerando um intervalo de confiança de 95%. As análises estatísticas foram realizadas com o *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização de animais 5-LO^{-/-}

O primeiro objetivo deste estudo foi o esclarecimento da relevância da interação entre a LXA₄ endógena e o receptor CB1 em condições fisiológicas. Para isso, investigamos uma série de funções reguladas pelo sistema eCB em camundongos 5-LO^{-/-}, que têm uma redução na produção de LXA₄. Entre os comportamentos avaliados estão ansiedade, consumo de água e alimento, locomoção, nocicepção e memórias aversivas.

4.1.1 Ansiedade

O primeiro comportamento avaliado nos camundongos 5-LO^{-/-} foi o de ansiedade. Os animais foram submetidos aos testes no labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro. Nenhuma alteração foi observada no comportamento de ansiedade entre camundongos 5-LO^{-/-} e 5-LO^{+/+} adultos. Também foram testados camundongos *Swiss Webster* tratados com o inibidor da 5-LO, Zileuton, e com o inibidor da FLAP, MK-886. Nenhuma alteração foi observada quando os fármacos foram administrados a animais adultos jovens, porém quando MK-886 foi administrada a animais idosos (12 meses) foi observado um efeito ansiogênico. Além disso, o tratamento de animais adultos jovens com LXA₄ exógena produziu um efeito ansiolítico. Esses dados indicam que a relevância da LXA₄ endógena para o comportamento de ansiedade se torna importante no envelhecimento, quando, curiosamente, a expressão de 5-LO se encontra aumentada (163), porém a produção de LXA₄ é reduzida quando comparado a adultos jovens. Ademais, a aplicação de LXA₄ tem efeito ansiolítico e esse efeito provavelmente é mediado pela sua interação com receptores CB1 (21-23).

Artigo publicado em 2014 no periódico PLoS ONE:

Leo LM, Almeida-Corrêa S, Canetti CA, Amaral OB, Bozza FA, Pamplona FA. Age-dependent relevance of endogenous 5-lipoxygenase derivatives in anxiety-like behavior in mice. PLoS One. 2014 Jan 8;9(1):e85009.

Age-Dependent Relevance of Endogenous 5-Lipoxygenase Derivatives in Anxiety-Like Behavior in Mice

Luciana M. Leo^{1,5}, Suellen Almeida-Corrêa^{2,3}, Claudio A. Canetti⁴, Olavo B. Amaral^{2,3}, Fernando A. Bozza^{1,5}, Fabricio A. Pamplona^{1*}

1 D'Or Institute for Research and Education, Rio de Janeiro, Brazil, 2 Lab. Neurobiology of Memory, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil, 3 National Center for Bioimaging (CENABIO), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil, 4 Lab. Inflammation, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil, 5 Lab. Immunopharmacology, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

When 5-lipoxygenase (5-LO) is inhibited, roughly half of the CNS effect of the prototypic endocannabinoid anandamide (AEA) is lost. Therefore, we decided to investigate whether inhibiting this enzyme would influence physiological functions classically described as being under control of the endocannabinoid system. Although 5-LO inhibition by MK-886 reduced lipoxin A₄ levels in the brain, no effect was found in the elevated plus maze (EPM), even at the highest possible doses, via i.p. (10 mg/kg,) or i.c.v. (500 pmol/2 μl) routes. Accordingly, no alterations in anxiety-like behavior in the EPM test were observed in 5-LO KO mice. Interestingly, aged mice, which show reduced circulating lipoxin A₄ levels, were sensitive to MK-886, displaying an anxiogenic-like state in response to treatment. Moreover, exogenous lipoxin A₄ induced an anxiolytic-like profile in the EPM test. Our findings are in line with other reports showing no difference between FLAP KO or 5-LO KO and their control strains in adult mice, but increased anxiety-like behavior in aged mice. We also show for the first time that lipoxin A₄ affects mouse behavior. In conclusion, we propose an age-dependent relevancy of endogenous 5-LO derivatives in the modulation of anxiety-like behavior, in addition to a potential for exogenous lipoxin A₄ in producing an anxiolytic-like state.

Citation: Leo LM, Almeida-Corrêa S, Canetti CA, Amaral OB, Bozza FA, et al. (2014) Age-Dependent Relevance of Endogenous 5-Lipoxygenase Derivatives in Anxiety-Like Behavior in Mice. PLoS ONE 9(1): e85009. doi:10.1371/journal.pone.0085009

Editor: Ulrike Schmidt, Max Planck Institute of Psychiatry, Germany

Received: April 19, 2013; **Accepted:** November 25, 2013; **Published:** January 8, 2014

Copyright: © 2014 Leo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study is supported by grant from CNPq -Brasil (474443/2012-4) and FAPERJ (E-26/112.448/2012) hold by FAP and a FAPERJ studentship hold by LML (E-26/102.721/2012). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: fabriciopamplona@gmail.com

Introduction

Our laboratory recently described that the 5-lipoxygenase (5-LO) derivative lipoxin A₄ is a positive allosteric modulator of CB1 cannabinoid receptors [1]. Such mechanism had not been previously described for this or other endogenous lipids, and occurs in addition to the well-described interaction of lipoxin A₄ with ALX receptors [2]. Interestingly, when 5-LO is inhibited, roughly half of the CNS effect of the prototypic endocannabinoid anandamide (AEA) is lost [1]. Therefore, we decided to investigate whether 5-LO inhibition would influence physiological functions classically described as being under control of the endocannabinoid system (for a recent review, see [3]). This research line was started with anxiety, which is deeply influenced by the endocannabinoid system, and particularly by AEA. We hypothesized that if 5-LO inhibition reduces AEA effects in the brain, mice treated with 5-LO inhibitors would show increased anxiety-like behavior, similarly to what occurs with mice treated with CB1 receptor antagonists [4] and contrary to what occurs after enhancement of AEA levels by URB597 [5]. However, we could not observe this behavioral phenotype and two recent studies investigating 5-LO knockout mice suggest that lack of effect may indeed be the

expected result [6,7]. On the other hand, exogenous lipoxin A₄ induced an anxiolytic-like profile in the elevated plus maze (EPM) test.

Methods

Animals

Swiss albino and C57BL/6 adult (3 months) and aged (12 months) male mice have been used in this study. 5-LO knockout female mice were provided by Fundação Oswaldo Cruz and kept in the animal facilities of the National Center for Bioimaging (CENABIO) at Universidade Federal do Rio de Janeiro. The animals were maintained under a 12:12 h light cycle with standard rodent chow and filtered water provided *ad libitum*. All procedures were carried out in strict accordance with international recommendations for the Care and Use of Laboratory Animals. The Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Universidade Federal do Rio de Janeiro approved our experimental protocols (IBQM058).

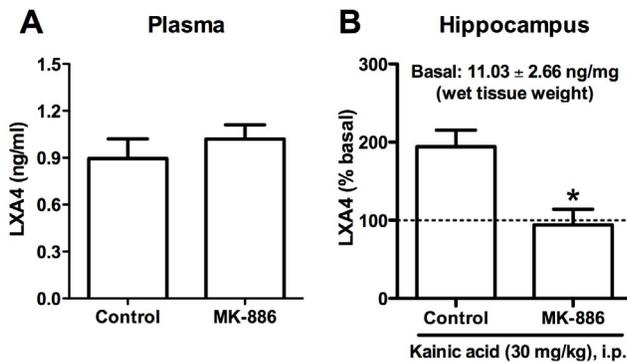
Lipoxin A₄ levels after MK-886

Figure 1. MK-886 prevents on demand synthesis of lipoxin A₄ in adult Swiss mice. Treatment with (MK-886 10 mg/kg, i.p.) did not reduce (A) basal circulating levels of lipoxin A₄ (n = 8–12). However, (B) MK-886 (10 mg/kg, i.p.) successfully prevented the increase in lipoxin A₄ levels induced by kainic acid in the brain of adult Swiss mice (n = 6–7). Data are presented as mean ± SEM and were analyzed by two-tailed Student's t test. In "B" data was normalized by basal levels found in control animals. *p < 0.05 vs control. LXA₄: Lipoxin A₄. doi:10.1371/journal.pone.0085009.g001

Drugs and Treatment Schedule

MK-886 (Cayman), an inhibitor of the 5-LO activating protein (FLAP) was injected systemically (3–10 mg/kg, i.p.) and intracerebroventricularly (250–500 pmol/2 µl, i.c.v.). This drug had already been tested in our previous paper, and a dose of 3 mg/kg was sufficient to inhibit half of AEA-induced catalepsy [1]. Doses ranging from 3 to 10 mg/kg also influence mouse behavior in the forced swim test [8]. The direct 5-LO inhibitor zileuton

(Cayman) was given orally in a selected high dose (40 mg/kg, p.o.), which is roughly 25% above the dose known to inhibit 50% of the enzyme activity (ED₅₀) in the periphery [9]. Both drugs were injected 1 h before behavioral experiments and 10% DMSO was used as vehicle. AM251 (1–3 mg/kg) and lipoxin A₄ (1–10 µg) were injected i.p. 30 min before testing.

Behavioral Test

The elevated plus maze (EPM) test evaluates anxiety-like behavior in rodents, and was conducted with the same protocol previously shown by our group [10] and others [4] to be sensitive to manipulations of the endocannabinoid system. A positive control with the CB1 antagonist AM251 was also performed to confirm that the experimental settings are sensitive to manipulations inducing an anxiogenic-like state. In brief, each mouse was placed in the center of a plus-shaped elevated maze, which has two open arms and two enclosed arms, and is allowed to explore the apparatus for 5 min. The time spent in the open arms and the number of entries in these arms is regarded as an inverse measure of anxiety, whereas the number of closed arm entries is regarded as a measure of total locomotion [11]. The experiments have been conducted under approximately 300–400 Lux illumination.

Immunodetection of Lipoxin A₄ by ELISA

Blood plasma has been collected from Swiss and 5-LOX KO mice and applied into a double-sandwich ELISA kit (Oxford Biomedical Research), read at 650 nm, and expressed as (ng/ml of plasma). To evaluate if 5-LO inhibition would prevent the increase of lipoxin A₄ levels in a condition that induces on demand endocannabinoid synthesis, we injected Swiss mice with MK-886 (10 mg/kg, i.p.) 30 min before kainic acid (30 mg/kg, i.p.) to measure lipoxin A₄ in the hippocampus. Brains were harvested and the hippocampus has been dissected 30 min after kainic acid

Table 1. Treatment with MK-886 does not influence anxiety-like behavior in the EPM test.

Mouse strain (n)	Treatment/Statistics	Open Arm Time	Closed Arm Time	Open Arm Entries	Closed Arm Entries
Swiss (10)	Vehicle i.p.	8.4 ± 3.3	138.4 ± 7.3	1.6 ± 0.7	13.8 ± 1.1
	MK-886 3 mg/Kg i.p.	5.5 ± 2.3	150.3 ± 7.7	1.2 ± 0.4	15.0 ± 1.0
	MK-886 10 mg/Kg i.p.	7.6 ± 2.6	160.2 ± 6.2	1.2 ± 0.4	13.6 ± 0.9
	ANOVA	F(2,7) = 0.29, p = 0.75	F(2,7) = 2.3, p = 0.11	F(2,7) = 0.22, p = 0.80	F(2,7) = 0.58, p = 0.57
C57BL/6 (8–9)	Vehicle i.p.	54.0 ± 14.5	157.1 ± 25.3	6.5 ± 1.9	8.1 ± 1.7
	MK-886 3 mg/Kg i.p.	44.4 ± 18.7	166.8 ± 17.7	3.0 ± 1.0	6.2 ± 0.7
	MK-886 10 mg/Kg i.p.	53.4 ± 16.9	152.1 ± 14.0	4.8 ± 1.3	8.0 ± 0.4
	ANOVA	F(2,2) = 0.10, p = 0.90	F(2,2) = 0.16, p = 0.85	F(2,2) = 1.48, p = 0.25	F(2,2) = 1.13, p = 0.34
Swiss (9–10)	Vehicle i.c.v.	20.2 ± 7.2	146.8 ± 11.8	3.1 ± 1.1	12.1 ± 0.5
	MK-886 250 pmol/2 µl i.c.v.	38.8 ± 12.1	134.7 ± 11.4	5.1 ± 1.5	13.4 ± 1.2
	MK-886 500 pmol/2 µl i.c.v.	32.9 ± 9.0	123.0 ± 11.9	4.7 ± 1.0	13.9 ± 0.8
	ANOVA	F(2,2) = 0.99, p = 0.38	F(2,2) = 0.35, p = 0.36	F(2,2) = 0.81, p = 0.45	F(2,2) = 1.29, p = 0.29
Swiss (6–8)	Vehicle i.p.	15.6 ± 3.8	147.0 ± 7.4	3.0 ± 0.7	14.7 ± 1.6
	AM251 1 mg/Kg i.p.	5.5 ± 3.0*	141.8 ± 11.8	0.7 ± 0.2**	10.5 ± 2.5
	AM251 3 mg/Kg i.p.	3.6 ± 1.7*	202.9 ± 14.5**	0.5 ± 0.2**	8.9 ± 1.9
	ANOVA	F(2,18) = 5.2, p = 0.02	F(2,18) = 8.3, p = 0.003	F(2,18) = 10.65, p = 0.009	F(2,18) = 2.4, p = 0.12

Mice were treated with MK-886 via i.p. or i.c.v. route and tested on the EPM. There was no significant difference in anxiety-like behavior among groups in either mouse strain (Swiss or C57BL/6) or administration route (i.p. or i.c.v.). AM251, a CB1 antagonist, was used as positive control. Data are presented as Mean ± SEM. Statistical analysis was carried out by ANOVA followed by Duncan's post hoc test.

*p < 0.05 vs vehicle.

**p < 0.01 vs vehicle.

doi:10.1371/journal.pone.0085009.t001

5-LO KO mice

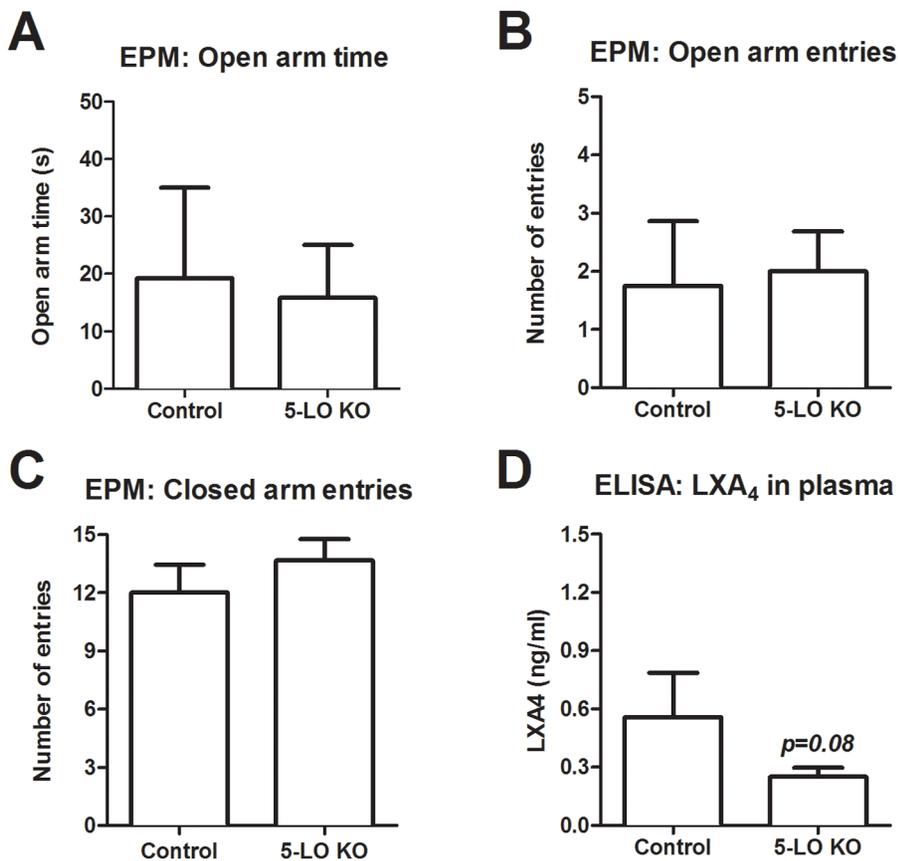


Figure 2. 5-LO knockout mice exhibit unaltered anxiety-like behavior in the EPM test. No difference was observed between control and 5-LO knockout mice as to (A) open arm time, (B) open arm entries or (C) closed arm entries ($n=8-12$). (D) 5-LO knockout mice show significantly reduced lipoxin A₄ in plasma ($n=8-10$). Data are expressed as mean \pm SEM and statistical analysis was performed by two-tailed or one-tailed Student's *t* test, respectively. KO: knockout, 5-LO: 5-lipoxygenase enzyme. doi:10.1371/journal.pone.0085009.g002

administration. The ELISA procedure followed the supplier's instruction and has been previously described, and lipoxin A₄ levels were expressed as ng/mg of wet tissue weight [1].

Statistics

The results were compared by one-way ANOVA using treatment as independent variable for the multiple doses schedules. Significant differences have been compared by the Newman-Keuls post-hoc test. Two-group comparisons have been performed by Student's *T*-test. Statistical significance was set as $p < 0.05$.

Results

Our first approach was to inject MK-886, which is a 5-LO activating protein (FLAP) inhibitor, generating an indirect inhibition of 5-LO. This drug had already been tested in our previous paper, and a dose of 3 mg/kg was sufficient to inhibit half of AEA-induced catalepsy [1]. Doses ranging from 3 to 10 mg/kg also influence mouse behavior in the forced swim test [8]. Therefore, we tried to observe whether pharmacological 5-LO inhibition in fact reduces circulating lipoxin A₄ levels (Fig. 1). In basal circumstances, one hour after MK-886 (10 mg/kg, i.p.) injection, there was no evidence of reduced plasmatic levels of lipoxin A₄ in the plasma of adult male Swiss mice [$t(18) = 0.73$,

$p = 0.47$]. On the other hand, when production of lipoxin A₄ was induced by kainic acid administration [$p < 0.05$ vs control] a significant prevention of induction by MK-886 was observed in the hippocampus [$t(11) = 3.44$, $p = 0.006$].

To evaluate the impact of 5-LO inhibition on anxiety-like behavior, we injected MK-886 (3–10 mg/kg, i.p.) in young adult male Swiss mice and 1 h later they were tested in the EPM test. There was no effect of MK-886 on open arm time ($p = 0.90$), open arm entries ($p = 0.25$), closed arm time ($p = 0.85$), or closed arm entries ($p = 0.34$) (Table 1).

As information about MK-886 bioavailability in the CNS is scarce [12] – even though the drug has been shown to act systemically – we also injected MK-886 via i.c.v. route, in order to overcome any putative obstacle in drug absorption. MK-886 was injected at the maximal possible doses (250–500 pmol/2 μ l, i.c.v.) considering its solubility in DMSO 10% (used as vehicle). However, once again, there was no effect of MK-886 in the EPM test (Open arm time: $p = 0.38$; Open arm entries: $p = 0.46$; Closed arm time: $p = 0.35$; Closed arm entries: $p = 0.29$) (Table 1). MK-886 was also ineffective in C57BL/6 mice ($p > 0.05$ in all parameters) (Table 1). A similar approach was tested in the dark-light box, without any effect of 5-LO inhibitors (MK-886 and zileuton) (Table S1).

Aged mice (12 months)

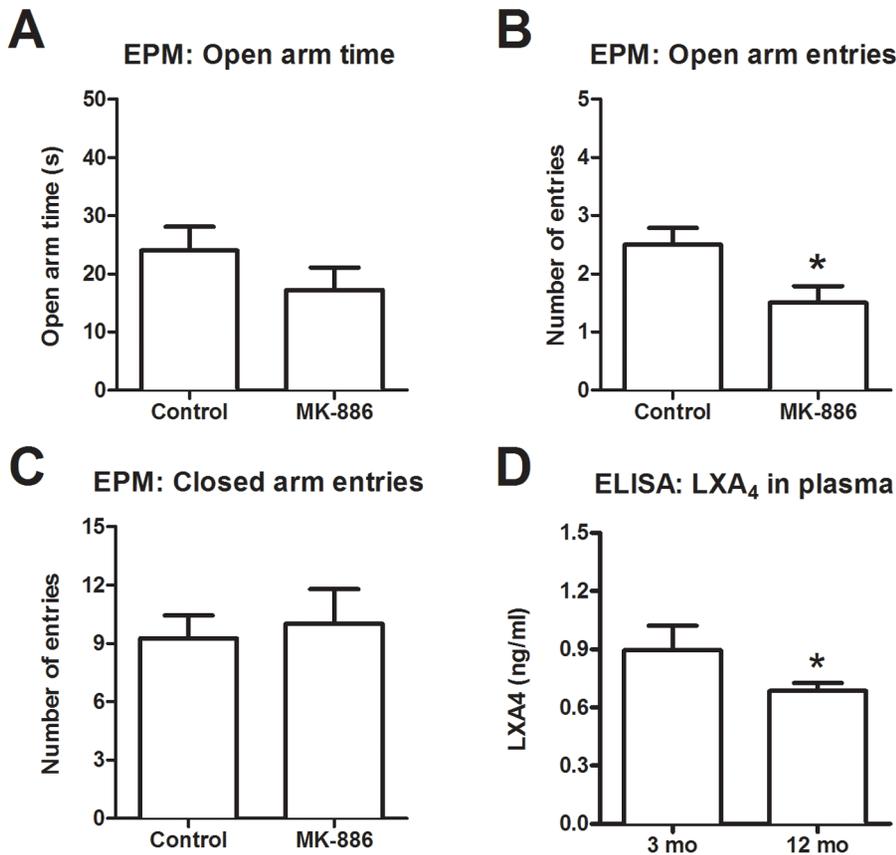


Figure 3. MK-886 induced anxiogenic-like behavior in 12-month-old Swiss mice in the EPM test. After treatment with MK-886 (10 mg/kg, i.p.) aged mice displayed a tendency toward reduced (A) open arm time and a significant decrease in the number of (B) entries in open arms, while no changes were observed in (C) entries in closed arms ($n=4$). (D) Twelve-month-old mice also show reduced lipoxin A_4 levels in plasma compared to 3-month-old mice ($n=12-15$). Data are presented as mean \pm SEM, statistical analysis was carried out by two-tailed Student's *t* test. * $p<0.05$ vs vehicle. mo: months.
doi:10.1371/journal.pone.0085009.g003

Mouse behavior in the current EPM setting was sensitive to the CB1 cannabinoid antagonist AM251, used as a positive control in the current study. CB1 blockade affected both the time spent [$F(18,2)=5.20$; $p=0.02$] and entries [$F(18,2)=10.65$; $p=0.002$] in open arms, as well as time spent in closed arms [$F(18,2)=8.32$; $p=0.003$]. Both 1 mg/kg and 3 mg/kg of AM251 caused anxiogenic-like behavior in the EPM ($p<0.05$), while 3 mg/kg apparently also reduced locomotion (Table 1).

Similarly to what occurred with pharmacological 5-LO inhibition, genetic deletion of this enzyme did not induce significant behavioral alteration in the EPM test, as shown previously by other groups in young adult mice [6,7,8,13]. Adult female 5-LO KO mice presented a behavioral profile similar to wild-type controls, at least as far as time spent [$t(18)=0.20$, $p=0.84$] and entries [$t(18)=0.20$, $p=0.84$] in open arms and time spent [$t(18)=1.27$, $p=0.22$] and entries [$t(18)=0.93$, $p=0.36$] in closed arms are regarded. Similarly, 5-LO KO mice presented a tendency towards reduced plasmatic lipoxin A_4 levels compared to controls [$t(16)=1.48$, $p=0.08$] (Fig. 2). As already reported in the literature, basal lipoxin A_4 levels are slightly reduced in the 5-LO KO compared to control animals, but the difference becomes quite evident when lipoxin A_4 synthesis is artificially induced, for instance, by a pathogen infection [14].

Curiously, the absence of 5-LO seems to influence anxiety-like behavior at a later time point during the aging process [14]. Therefore, to confirm this data using a pharmacological approach, we treated 12-month-old male Swiss mice with the same dose of MK-886 used in the previous experiments (10 mg/kg, i.p.). A very small number of aged animals were available for the experiment ($n=4$) but, to our surprise, a single administration of this 5-LO inhibitor induced a slight anxiogenic-like effect in the EPM. Open arm entries were reduced [$t(6)=2.45$, $p=0.05$] and time spent in open arms were not significantly different [$t(6)=1.2$, $p=0.27$] (Fig. 3). Importantly, the same behavioral profile was consistent in the light-dark box, as shown in the supplement (Table S1) (reduced time in bright side [$t(7)=3.32$, $p=0.01$]; increased time in the dark side [$t(7)=3.11$, $p=0.02$] and no changes in transitions [$t(7)=0.57$, $p=0.59$]). Moreover, 12-month old mice showed reduced lipoxin A_4 levels compared to adult controls [$t(25)=1.72$, $p=0.05$].

Although the previous results suggest that endogenous 5-LO derivatives' impact on emotionality is age-dependent, we wanted to know whether exogenous systemic application of lipoxin A_4 would induce an anxiolytic-like effect in the EPM. That is what would be expected given its recently described enhancement of AEA potency due to positive allosteric modulation of CB1

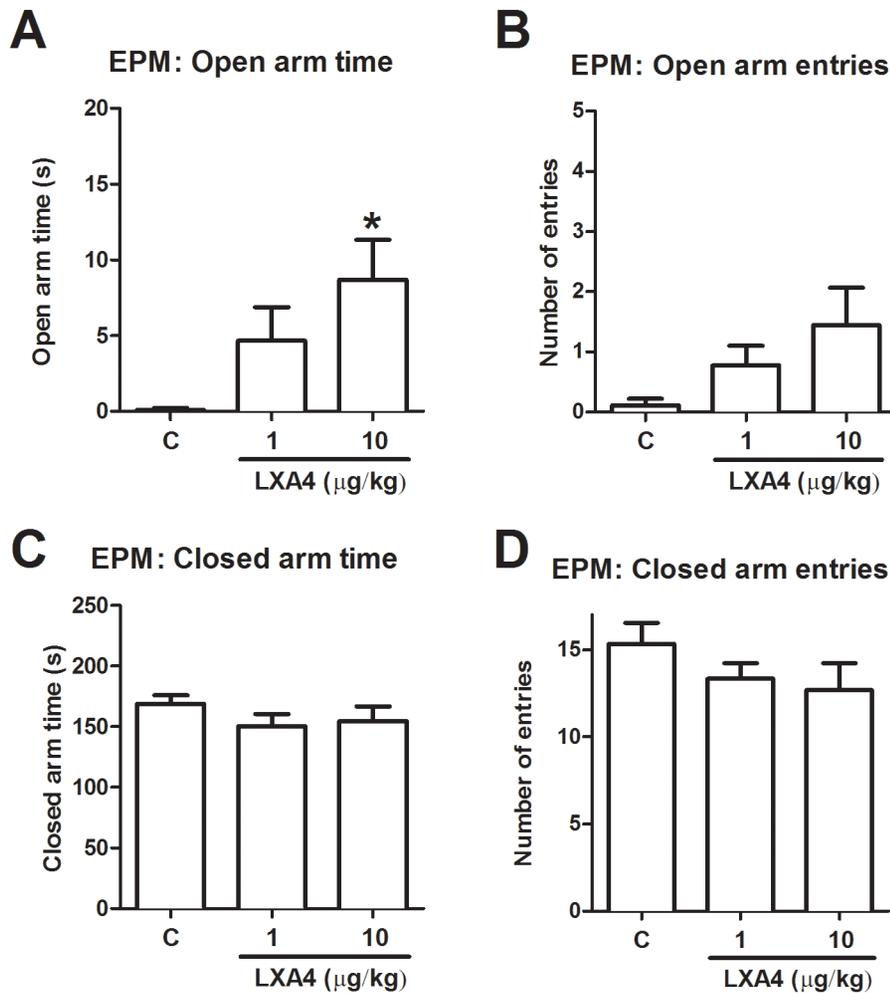
Lipoxin A₄ i.p.

Figure 4. Anxiolytic-like effect of exogenous Lipoxin A₄ in the EPM test. After a single dose of Lipoxin A₄ (10 µg/kg, i.p.), adult Swiss mice showed a significant increase in (A) open arm time. No difference was observed in (B) entries in open arms, (C) time in closed arms or (D) entries in closed arms. Data are presented as mean ± SEM (n=9). Statistical Analysis was performed by ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test. *p<0.05 vs vehicle.

doi:10.1371/journal.pone.0085009.g004

receptors [1]. Indeed, lipoxin A₄ (1–10 µg/kg, i.p.) increased time spent [F(24,2)=4.61; p=0.02] and a trend towards entries [F(24,2)=2.62; p=0.09] in open arms, without affecting time spent [F(24,2)=0.96; p=0.39] and entries (F(24,2)=1.25; p=0.31) in closed arms in the EPM test (Fig. 4).

Discussion

The current set of experiments presents evidence that endogenous 5-LO derivatives' influence on anxiety-like behavior in mice is age-dependent, although exogenous lipoxin A₄ induces anxiolytic-like effects. This is important under the light of a recent report showing that lipoxin A₄ is an endogenous positive allosteric modulator of CB1 cannabinoid receptors, which enhances the potency of the endocannabinoid AEA [1]. Since a potential therapeutic exploitation of AEA signaling has already been proposed by many authors [4,15,16], this paper suggests that positive allosteric modulation of CB1 receptors is a valid

mechanism to achieve this goal, although this modulation might not be endogenously relevant in physiological circumstances.

In the current study, either pharmacological inhibition or genetic deletion of 5-LO did not influence anxiety-like behavior in the EPM in adult animals, although 5-LO inhibition induced an anxiogenic-like state in aged mice. The 5-LO inhibitor could prevent induction of lipoxin A₄ levels in the brain, but did not change basal plasmatic levels. As kainic acid induces on demand endocannabinoid synthesis in the hippocampus [17,18], these results suggest that lipoxin A₄ may also be released in a condition in which increased endocannabinoid levels are observed. Likewise, 5-LO KO presented a tendency towards reduced basal lipoxin A₄ levels, which is consistent with the current literature [14]. Aged animals displayed reduced lipoxin A₄ in the plasma and anxiogenic-like behaviors in the EPM, showing that this molecule may influence emotionality under age-related conditions.

Two recent papers have studied the effect of genetic deletion of 5-LO on anxiety using the EPM [6,7]. In the first paper, the authors investigated whether female 5-LO KO (commercially

available at Jackson Laboratory) expressed behavioral alterations in this task compared to control mice. One interesting point of this article is that they tested mice of 3 to 12 months of age. Our results are in line with their initial observations that 3-month-old KO mice exhibited a behavioral profile very similar to that of control mice in the EPM [6]. However, when older female mice were tested, different results were observed. Both 6 or 9-month-old female mice displayed an anxiogenic-like profile compared to control mice, in line with our initial expectations on the outcome of 5-LO inhibition [6]. In the second paper, the authors investigated the same issue using FLAP knockout mice from Jackson Laboratory [7]. Similar to what was observed in 5-LO KO, FLAP KO mice displayed “normal” behavior in the EPM at the age of 3 months, but displayed increased anxiety-like behavior with age (statistically significant at 12 months of age). This behavior alteration was accompanied by reduced locomotion in the EPM, but not by alterations in spontaneous alternation task in the Y-maze [7]. Remarkably, Uz et al have reported results in an opposite direction: at the age of 2–3 months, male 5-LO KO mice showed *reduced* anxiety in the EPM and marble burying tests, without alterations in locomotor activity or spontaneous alternation in the T-maze [13]. The difference between these studies certainly deserves careful examination. While the KOs used by Joshi and Pratico were generated on a C57BL/6 background (and therefore C57BL/6 mice were used as controls), Uz et al used KO mice generated on a hybrid background, an F₂ generation of B6/129 mice as controls. In the former, there was no difference between C57BL/6 mice and KOs in the EPM, while an unexpected anxiolytic effect was reported in the latter. However, in the same paper, Uz et al showed that their control mice displayed behavioral differences when compared to C57BL/6 and 129P3 parental strains [13]. This effect supports the notion that the interpretation of results is potentially flawed by a floor effect, since the B6129SF2 mice shows a marked anxiogenic-like profile. The strain background issue is one of the reasons why we prefer to use outbred mouse strains to perform pharmacological research. We believe that any drug potentially intended for translational research must at least induce an effect higher than the “natural” variance observed in a heterogeneous population. Of course, it is not possible, nor acceptable, to use outbred mice as controls for knockout strains.

All in all, our negative findings on 5-LO modulation and anxiety-like behaviors are in line with most - if not all - data available on young adult mice carrying genetic ablation of 5-LO-related genes. An overall analysis of these data may suggest that 5-LO derivatives are important for anxiety modulation only

References

- Pamplona FA, Ferreira J, Menezes de Lima O, Jr., Duarte FS, Bento AF, et al. (2012) Anti-inflammatory lipoxin A₄ is an endogenous allosteric enhancer of CB1 cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 21134–21139.
- Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, et al. (2009) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev* 61: 119–161.
- Ruehle S, Rey AA, Remmers F, Lutz B (2012) The endocannabinoid system in anxiety, fear memory and habituation. *J Psychopharmacol* 26: 23–39.
- Patel S, Hillard CJ (2006) Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 304–311.
- Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valino F, Duranti A, et al. (2003) Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 9: 76–81.
- Joshi YB, Pratico D (2011) Knockout of 5-lipoxygenase results in age-dependent anxiety-like behavior in female mice. *PLoS One* 6: e29448.
- Joshi YB, Pratico D (2013) The involvement of 5-lipoxygenase activating protein in anxiety-like behavior. *J Psychiatr Res* 47: 694–698.
- Uz T, Dimitrijevic N, Imbesi M, Manev H, Manev R (2008) Effects of MK-886, a 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) inhibitor, and 5-lipoxygenase

under specific circumstances, such as gender (e.g. only important in females), during specific phases of development (e.g. aging) or pathological states. That would explain why we could not observe any effect of pharmacological 5-LO inhibition using healthy adult male mice, but succeeded to do so using 12 month-old Swiss mice. This is a relevant finding, as it was not previously clear whether the anxiogenic-like effect observed in aged 5-LO KO mice was due to the age in which the behavioral tests were performed or to the cumulative effects of the gene knockout over a long period of time. One limitation of our study is that drug treatment was not chronic/repeated, which might yield a more potent 5-LO inhibition and then influence behavior. However, data from the 5-LO KO mice further support data from our pharmacological approach.

Our results suggest that this may be related to a time point in the aging process where lipoxin A₄ is naturally reduced. There is evidence of a similar age-related reduction in lipoxin A₄ levels in humans (Gangemi et al, 2005). In this sense, it would be interesting to explore the potential application of lipoxin A₄ (or derived synthetic molecules) as replacement therapy in aged individuals. This paper shows that, at least as far as anxiety-like behaviors are regarded; using exogenous lipoxin stable analogs might be a useful strategy to reduce anxiety-like behaviors.

Supporting Information

Table S1 In the Light-Dark Box task, MK-886 treatment induces anxiogenic-like behavior in aged mice, but not in 3-month-old nor in 5-LO knockout mice. After treatment with 5-LO inhibitors (MK-886 or Zileuton), adult (3 months) or aged (12 months) mice were tested in the Light-Dark box task. Three-month-old mice did not show altered anxiety-like behavior in response to either treatment, whereas 12-month-old mice displayed an anxiogenic-like behavior, as measured by reduced time spent in bright side and increased time spent in dark side. Adult 5-LO knockout mice (5-LO KO) did not show any difference in anxiety-like behavior compared to control mice. Data are presented as Mean ± SEM. *p<0.05 vs vehicle. (DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CAC OBA FAP FAB. Performed the experiments: LML SA FAP. Analyzed the data: LML FAP. Contributed reagents/materials/analysis tools: CAC OBA FAB. Wrote the paper: LML CAC OBA FAP.

- deficiency on the forced swimming behavior of mice. *Neurosci Lett* 436: 269–272.
- Singh VP, Patil CS, Kulkarni SK (2005) Differential effect of zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor, against nociceptive paradigms in mice and rats. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 433–439.
- Takahashi RN, Pamplona FA, Fernandes MS (2005) The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neurosci Lett* 380: 270–275.
- Cruz AP, Frei F, Graeff FG (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49: 171–176.
- Biserni A, Giannessi F, Sciarroni AF, Milazzo FM, Maggi A, et al. (2008) In vivo imaging reveals selective peroxisome proliferator activated receptor modulator activity of the synthetic ligand 3-(1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butylthio-5-isopropylindol-2-yl)-2,2-dimethylpropanoic acid (MK-886). *Mol Pharmacol* 73: 1434–1443.
- Uz T, Dimitrijevic N, Tueting P, Manev H (2002) 5-lipoxygenase (5LOX)-deficient mice express reduced anxiety-like behavior. *Restor Neurol Neurosci* 20: 15–20.
- Shryock N, McBerry C, Salazar Gonzalez RM, Janes S, Costa FT, et al. (2013) Lipoxin A(4) and 15-epi-lipoxin A(4) protect against experimental cerebral malaria by inhibiting IL-12/IFN-gamma in the brain. *PLoS One* 8: e61882.

15. Naidu PS, Varvel SA, Ahn K, Cravatt BF, Martin BR, et al. (2007) Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. *Psychopharmacology (Berl)* 192: 61–70.
16. Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodriguez de Fonseca F (2000) The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 21: 218–224.
17. Monory K, Massa F, Egertova M, Eder M, Blaudzun H, et al. (2006) The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 51: 455–466.
18. Lourenco J, Matias I, Marsicano G, Mulle C (2011) Pharmacological activation of kainate receptors drives endocannabinoid mobilization. *J Neurosci* 31: 3243–3248.

Table S1. In the Light-Dark Box task, MK-886 treatment induces anxiogenic-like behavior in aged mice, but not in 3-month-old nor in 5-LO knockout mice.

Mouse strain, age (n)	Treatment/Statistics	Time in bright side	Time in dark side	Transitions
Swiss, 3 months (8-9)	Vehicle i.p.	20.6 ± 2.8	62.9 ± 3.5	11.4 ± 1.9
	MK-886 3mg/Kg i.p.	30.1 ± 3.5	54.2 ± 4.3	16.1 ± 1.8
	MK-886 10mg/Kg i.p.	23.5 ± 2.7	60.9 ± 2.2	16.7 ± 2.2
	ANOVA	F(2,23)=0.19, p=0.82	F(2,21)=1.67, p=0.21	F(2,21)=0.48, p=0.63
Swiss, 3 months (7-9)	Vehicle i.p.	113.0 ± 8.1	150.6 ± 10.6	13.4 ± 1.4
	MK-886 250pmol/2µl i.c.v.	109.8 ± 10.1	155.0 ± 11.1	14.4 ± 2.6
	MK-886 500pmol/2µl i.c.v.	126.7 ± 8.7	128.9 ± 10.4	11.8 ± 1.8
	ANOVA	F(2,21)=1.00, p=0.38	F(2,21)=1.67, p=0.21	F(2,21)=0.48, p=0.63
Swiss, 3 months (9-10)	Vehicle p.o.	142.8 ± 6.8	157.2 ± 6.8	14.0 ± 1.1
	Zileuton 40mg/Kg p.o.	126.0 ± 19.7	174.0 ± 19.7	12.4 ± 1.8
	Two-tailed Student's t test	t(17)=0.83, p=0.41	t(17)=0.83, p=0.41	t(17)=0.75, p=0.46
Swiss, 12 months (4-5)	Vehicle i.p.	61.5 ± 4.6	21.6 ± 4.4	6.4 ± 2.6
	MK-886 10mg/Kg i.p.	34.1 ± 7.3*	48.8 ± 8.1*	15.8 ± 4.0
	Two-tailed Student's t test	t(7)=3.33, p=0.01	t(7)=3.11, p=0.02	t(7)=0.57, p=0.59
5-LO KO, 3 months (8-12)	Control	65.6 ± 9.8	163.3 ± 11.0	14.9 ± 2.3
	5-LO KO	85.7 ± 5.4	177.8 ± 7.0	16.2 ± 1.4
	Two-tailed Student's t test	t(18)=1.94, p=0.07	t(18)=1.17, p=0.25	t(18)=0.50, p=0.62

After treatment with 5-LO inhibitors (MK-886 or Zileuton), adult (3 months) or aged (12 months) mice were tested in the Light-Dark box task. Three-month-old mice did not show altered anxiety-like behavior in response to either treatment, whereas 12-month-old mice displayed an anxiogenic-like behavior, as measured by reduced time spent in bright side and increased time spent in dark side. Adult 5-LO knockout mice (5-LO KO) did not show any difference in anxiety-like behavior compared to control mice. Data are presented as Mean ± SEM. *p<0.05 vs vehicle.

4.1.2 Consumo de água e alimento

A fim de observar se a redução nos níveis de LXA₄ endógena tem efeito sobre a regulação hipotalâmica do consumo de água e alimento, a qual é modulada pelo sistema eCB, nós avaliamos o peso corporal e a taxa de consumo de ração e água em camundongos 5-LO^{-/-} e 5-LO^{+/+} (Figura 4.1). O peso corporal de camundongos 5-LO^{-/-} e 5-LO^{+/+} adultos foi aferido em apenas um evento. O consumo de água e alimento foi medido durante um período de cinco dias para o cálculo da taxa de consumo por dia para cada animal. Não foi encontrada nenhuma alteração de peso ou diferença no consumo de alimento e água nos animais 5-LO^{-/-} comparado aos animais 5-LO^{+/+}. Não foi possível descartar a possibilidade de a LXA₄ ou outros derivados da 5-LO estarem envolvidos na regulação hipotalâmica da alimentação e consumo de água em outras situações comportamentais, como estresse ou privação de alimento. No entanto, a influência da LXA₄ sobre situações fisiológicas é o que estava contido no escopo deste questionamento.

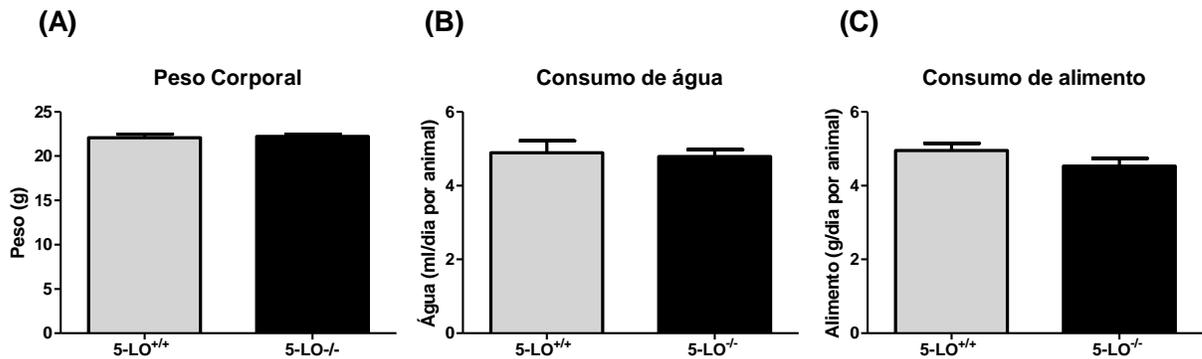


Figura 4.1 Redução dos níveis endógenos de LXA₄ e outros derivados da 5-LO não influencia peso corporal ou consumo de água e alimento. (A) Não houve alteração no peso corporal de camundongos 5-LO^{-/-} ($p=0,76$; $n=26-30$), assim como (B) na taxa diária de consumo de alimento ($p=0,16$; $n=8$) e (C) de água ($p=0,79$; $n=8$). Dados expressos como média \pm erro padrão e análise estatística realizada por teste t não pareado.

4.1.3 Locomoção

Camundongos 5-LO^{-/-} e 5-LO^{+/+} foram avaliados no teste de campo aberto para avaliação do papel da LXA₄ na locomoção. Não foi encontrada alteração significativa na locomoção dos camundongos 5-LO^{-/-} quando comparado aos seus controles 5-LO^{+/+} (Figura 4.2). Ainda, uma avaliação para ansiedade no teste de campo

aberto foi realizada utilizando os parâmetros de tempo em exploração no centro da arena e na periferia. Corroborando os nossos resultados anteriores nos testes de labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro, não observamos nenhuma diferença no comportamento de ansiedade de animais 5-LO^{-/-} adultos jovens no teste de campo aberto (Figura 4.2C-D). Logo, não detectamos qualquer influência da LXA₄ endógena sobre o comportamento motor. Não foi possível distinguir se este fenótipo e o observado para o consumo de água e alimento são produtos de uma adaptação à privação crônica de LXA₄ durante o desenvolvimento, o que já foi descrito para outros animais com deleção genética. Ainda assim, esses dados fornecem evidências de que o consumo de água e alimento e o comportamento motor não são influenciados pela disponibilidade endógena de LXA₄. Se isso pode ser devido à produção escassa de LXA₄ ou inabilidade de potencializar a sinalização por CB1 através da AEA nos sítios cerebrais responsáveis pela regulação desses tipos de comportamento ainda precisa ser determinado. O efeito da administração exógena de LXA₄ sobre esses comportamentos ainda não foi abordado. É possível que, como demonstramos no comportamento de ansiedade, este eicosanoide só impacte o consumo de água e alimento e a locomoção sobre condições específicas, como envelhecimento e administração exógena.

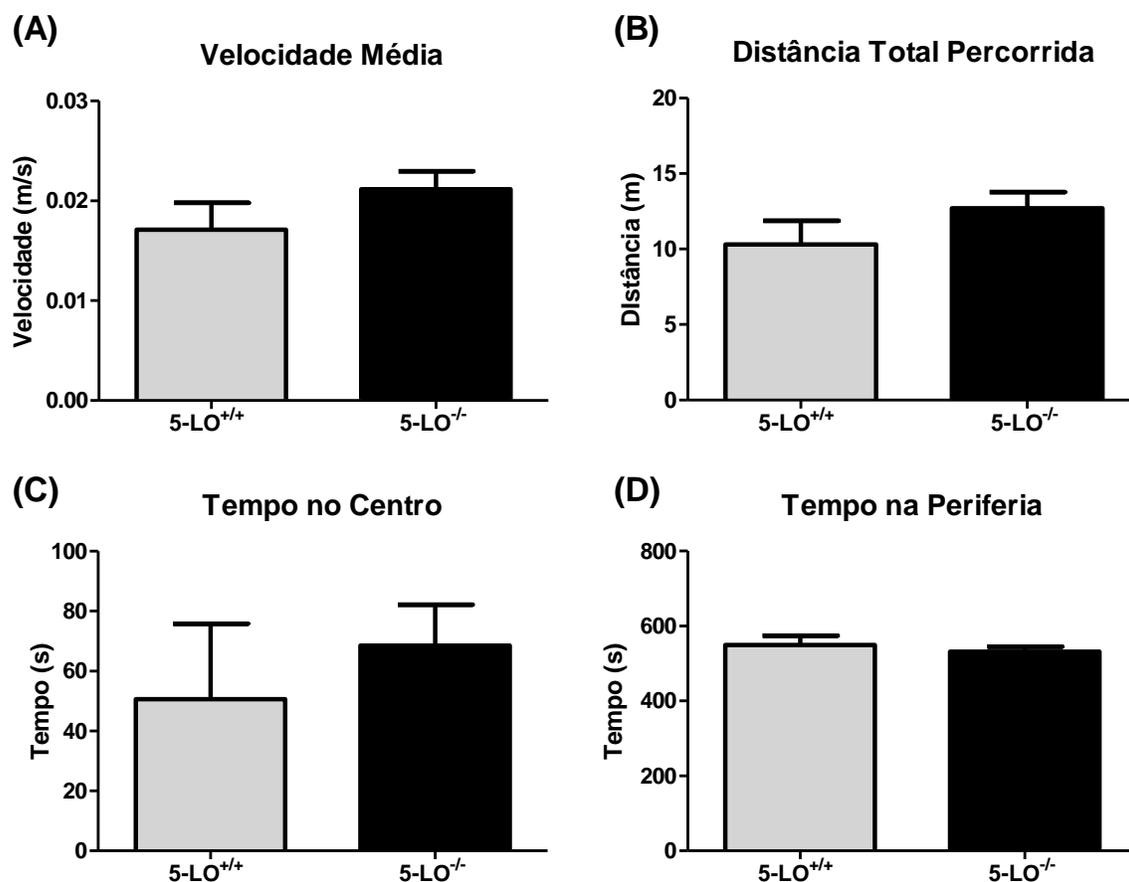


Figura 4.2 Redução de LXA₄ e outros derivados da 5-LO não tem impacto sobre locomoção ou ansiedade no teste de campo aberto. (A) Não houve alteração significativa da distância total percorrida ($p=0,20$; $n=8-12$), nem (B) da velocidade média dos camundongos 5-LO^{-/-} em relação aos animais controle ($p=0,21$; $n=8-12$). (C) Nenhuma diferença significativa no tempo no centro da arena ($p=0,50$; $n=8-12$). (D) Nenhuma diferença entre os genótipos no tempo explorando a periferia da arena ($p=0,50$; $n=8-12$). Dados apresentados como média \pm erro padrão. Análise estatística realizada por teste t não pareado.

4.1.4 Nocicepção

Considerando a notoriedade do sistema eCB na promoção de analgesia (39-41), nós avaliamos se a redução dos níveis endógenos de LXA₄ por deleção gênica da enzima 5-LO tem efeito sobre a regulação da nocicepção. Camundongos 5-LO^{-/-} foram submetidos ao teste de sensibilidade ao choque. Uma sucessão de choques elétricos em incrementos de 0,1 mA e em intervalos de 20 s foram gerados por um gerador de choque e administrados por uma grade de metal no piso do aparato. O primeiro limiar de dor foi registrado quando o animal apresentou um comportamento de agitação (*flinching*). O segundo limiar foi definido como um salto com remoção das 4 patas da

grade e vocalização (*jumping*). Foi observado que os animais 5-LO^{-/-} apresentaram redução de ambos os limiares de nocicepção avaliados neste estudo (Figura 4.3). A resposta de *flinching* é o primeiro comportamento observado que demonstra que o animal sentiu o estímulo e corresponde ao limiar de sensibilidade à dor. A resposta de *jumping* ocorre com o aumento do estímulo e é estritamente dependente da intensidade do choque, representando o limiar de tolerância à dor. Portanto, animais 5-LO^{-/-} apresentam um aumento na sensibilidade e uma redução na tolerância à dor.

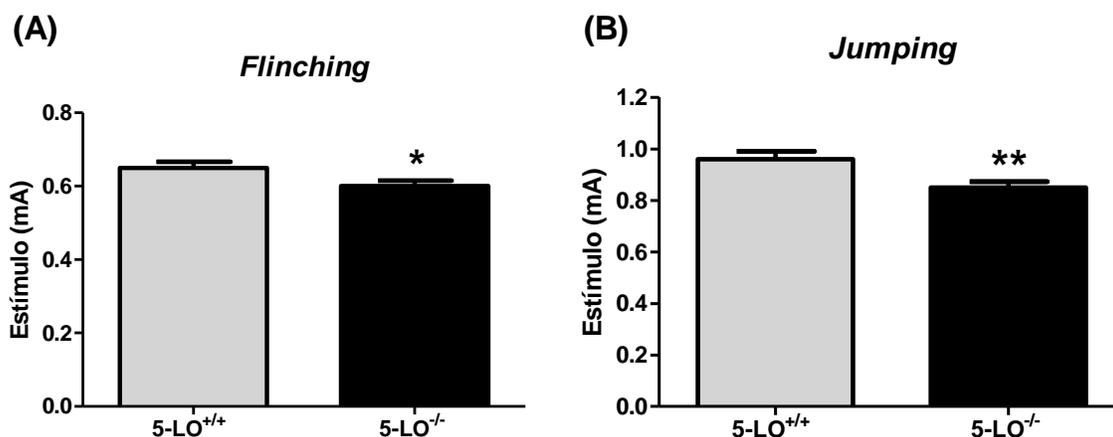


Figura 4.3 Redução de LXA₄ e outros derivados da 5-LO causa diminuição dos limiares de nocicepção. (A) Animais 5-LO^{-/-} apresentam redução na intensidade de estímulo necessária para desencadear *flinching* (p=0,04; n=10). (B) Também foi possível observar redução da intensidade de choque necessária para desencadear *jumping* (p=0,001; n=10). Dados são expressos como média ± erro padrão. Análise estatística realizada por teste t não pareado. *p<0,05 **p<0.01

O efeito anti-nociceptivo da LXA₄ já foi demonstrado em modelos de dor induzida por inflamação (163, 166). Contudo, esses estudos focaram no papel anti-inflamatório da LXA₄ agindo em receptores ALX. O papel do sistema eCB na modulação da dor é bem documentado (39-41), portanto a ação deste eicosanoide em receptores CB1 também deve ser considerando na investigação de seus efeitos na percepção de dor. A relevância da LXA₄ endógena na nocicepção em condições fisiológicas ainda não havia sido avaliada. Nossos resultados apontam para a importância dos derivados da 5-LO na sensibilidade e tolerância à dor. Devido à interação com receptores CB1, a LXA₄ é a candidata mais provável para mediar esse efeito antinociceptivo.

4.1.5 Memórias aversivas

Para investigar o papel da LXA₄ em processos de memórias aversivas regulados pelo sistema eCB, decidimos avaliar o comportamento de camundongos 5-LO^{-/-} no teste de esQUIVA inibitória. Quando o teste de retenção foi realizado 24 horas após o condicionamento, os animais não apresentaram diferença significativa na latência para descer da plataforma (Figura 4.4B). Por outro lado, na avaliação de memória de curto prazo, em que um intervalo de 30 minutos foi utilizado entre as sessões de condicionamento e teste, os camundongos 5-LO^{-/-} apresentaram latência reduzida, o que sugere a presença de dano cognitivo em memória de curto prazo (Figura 4.4A).

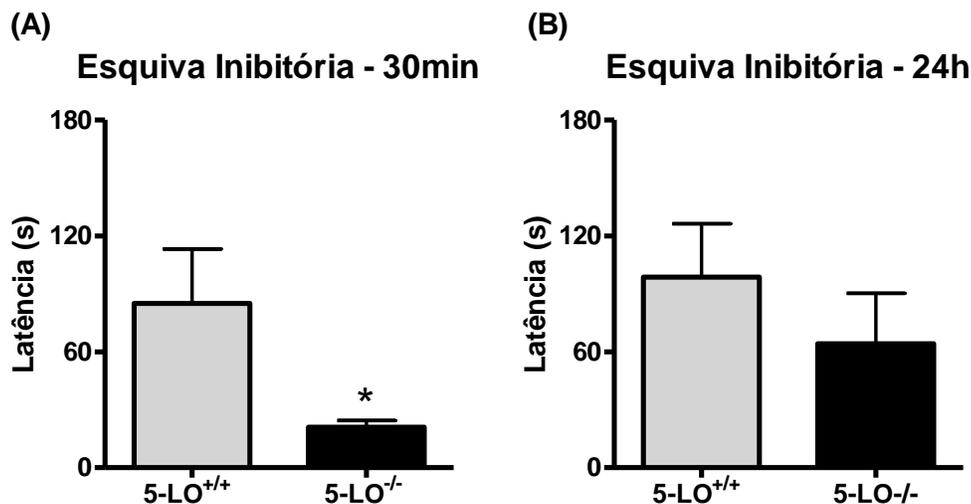


Figura 4.4 Redução de LXA₄ e outros derivados da 5-LO causa disfunção cognitiva. (A) Redução do tempo de latência em camundongos 5-LO^{-/-} quando o teste foi realizado 30 minutos após o condicionamento ($p=0,01$; $n=7-11$). (B) Nenhuma diferença entre os genótipos na latência para descer da plataforma quando o teste foi realizado 24 horas após o condicionamento ($p=0,40$; $n=8$). Dados expressos como média \pm erro padrão. Análise estatística feita por teste t não pareado. * $p<0,05$

No intento de elucidar a natureza do fenótipo observado, nós obtivemos uma curva de aprendizado dos animais 5-LO^{-/-}. Neste caso, os camundongos receberam um choque elétrico a cada descida da plataforma até que a latência para descer atingisse o critério de 180 s. O número de tentativas necessárias para atingir o critério foi significativamente maior em 5-LO^{-/-} do que em 5-LO^{+/+}, indicando uma dificuldade de aprendizado. Corroborando os resultados anteriores, o teste de memória após 24 horas

demonstrou uma retenção similar entre os dois genótipos (Figura 4.5). Esses resultados indicam que a redução dos níveis de LXA₄ endógena provoca uma disfunção cognitiva que abrange somente memória de curto prazo. Além disso, levando em conta os resultados obtidos no teste de nocicepção, os camundongos 5-LO^{-/-} apresentam maior sensibilidade ao choque, o que significa que sua resposta ao teste deveria ser mais pronunciada, ou seja, apresentar maior latência, quando se usa a mesma intensidade de choque para ambos os grupos. Isto corrobora os nossos dados e indica que este resultado pode estar sendo subestimado.

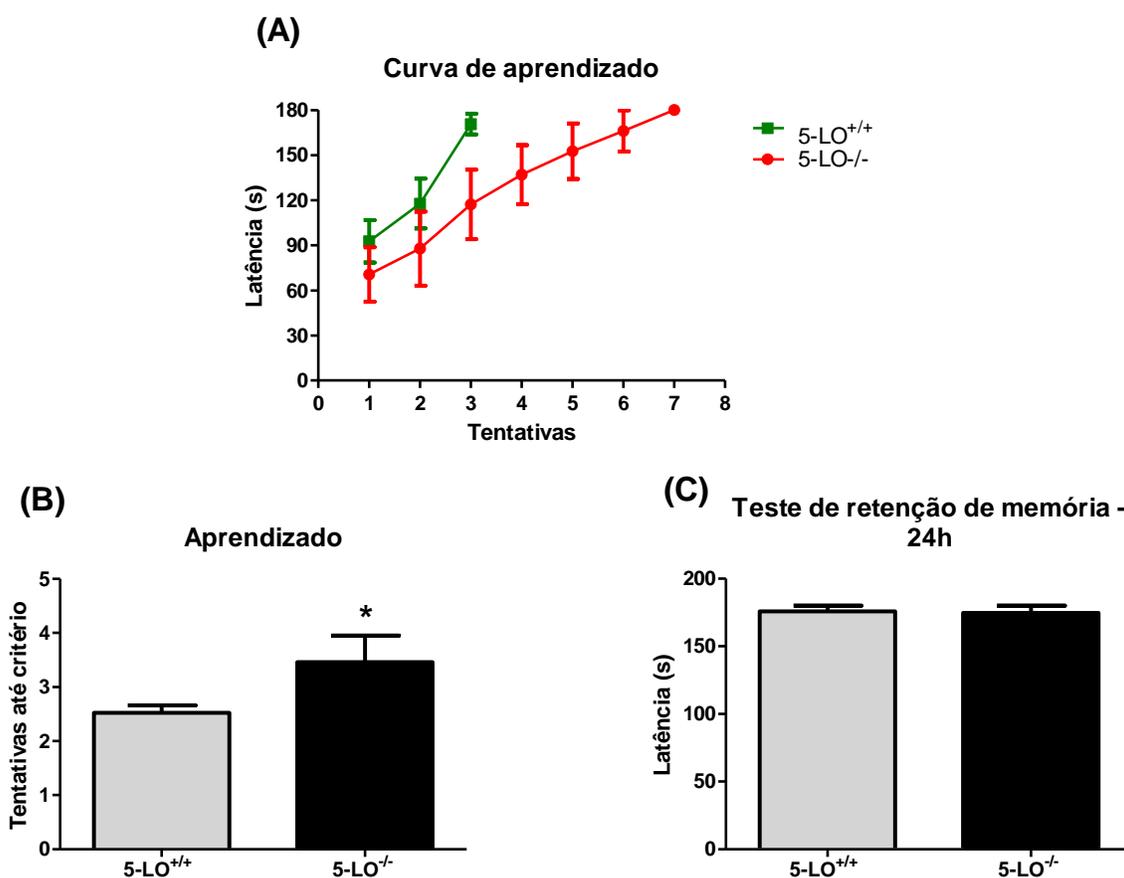


Figura 4.5 Curva de aprendizado de animais 5-LO^{-/-}. (A) Latência para descer da plataforma em todas as tentativas até o critério de 180s ($p=0,0003$). (B) Camundongos 5-LO^{-/-} precisam de um número significativamente maior de tentativas para atingir o critério ($p=0,03$; $n=13-23$). (C) Teste de retenção após 24 horas não mostrou diferença entre os genótipos ($p=0,86$; $n=13-23$). A comparação entre todas as tentativas foi realizada entre os tempo de latência do mesmo animal. Dados apresentados como média \pm erro padrão. Análise estatística por ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett ou teste t não pareado. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Outro processo de memória influenciado pelo sistema eCB é a extinção de memórias aversivas, que é facilitada por agonistas canabinóides (61, 62). Logo, foi de nosso interesse analisar a extinção de memórias aversivas nos camundongos 5-LO^{-/-} a fim de investigar o papel da LXA₄ nesse processo. Os animais foram treinados no teste de esQUIVA inibitória com choque de alta intensidade (1 mA por 2 s) para assegurar que todos os animais estivessem adequadamente condicionados à tarefa. Doze dias após o condicionamento, os animais foram expostos à tarefa novamente em quatro eventos, porém na ausência de choque. Os animais 5-LO^{+/+} reduziram o tempo de latência para descer da plataforma a partir da segunda exposição, enquanto os 5-LO^{-/-} não foram capazes de reduzir significativamente o tempo de latência em nenhuma das quatro exposições (Figura 4.6). Esses resultados indicam um possível papel da LXA₄ na extinção de memórias aversivas, provavelmente através de sua ação em receptores CB1, embora não tenhamos evidências experimentais que confirmem essa hipótese.

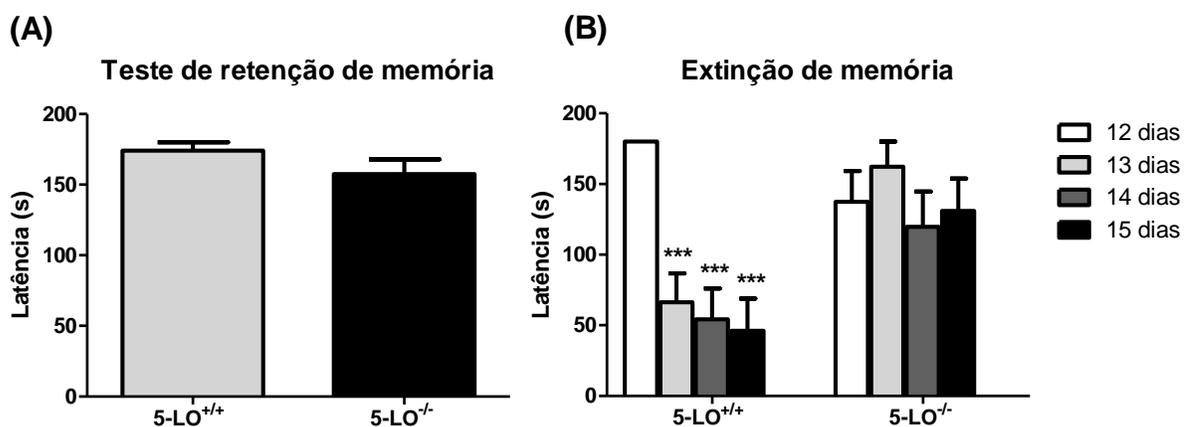


Figura 4.6 Disfunção na extinção de memória em camundongos 5-LO^{-/-} adultos. (A) Após o condicionamento com choque de alta intensidade, todos os animais apresentaram tempo de latência semelhante ($p=0,38$; $n=10$). (B) Teste de extinção em quatro exposições diárias; animais 5-LO^{+/+} apresentaram redução do tempo de latência de 13 a 15 dias ($p<0,0001$; $n=10$), porém 5-LO^{-/-} não tiveram sucesso na extinção de memória ($p>0,05$; $n=10$). Dados exibidos como média \pm erro padrão. Análise estatística realizada por teste t não pareado ou ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni, respectivamente.

Os camundongos 5-LO^{-/-} apresentaram uma disfunção tanto em memória de curto prazo como na extinção de memória. Ambas essas funções são moduladas pelo sistema eCB. Já foi demonstrado que a inibição da degradação de AEA facilita a aquisição de memória (69, 70). Da mesma forma, infusão intrahipocampal de AM251,

um antagonista do receptor CB1, tem um efeito amnésico (53, 54). Ainda, a sinalização por receptores CB1 facilita a extinção de memórias aversivas (57). O aprendizado de memórias aversivas e a sua extinção são processos que compartilham muitas semelhanças. A extinção é, na verdade, considerada uma forma de aprendizado, em que um novo traço de memória conflitante inibe a expressão do anterior, causando redução da expressão de medo (74). De fato, a aquisição e a extinção de memória podem ativar as mesmas vias de sinalização, uma vez que ambos esses processos induzem o influxo de Ca^{2+} por receptores NMDA ou canais de Ca^{2+} do tipo L e ativam a via da PI3K/Akt (165). Além de regular a liberação de glutamato de forma direta em sinapses glutamatérgicas e indireta em sinapses GABAérgicas de interneurônios inibitórios no hipocampo (15), a sinalização por CB1 também é capaz de ativar a via de sinalização da PI3K/Akt (166). Portanto, é possível que o receptor CB1 participe da facilitação do aprendizado por meio desses mecanismos. Os resultados que observamos para memória de curto prazo e extinção de memória podem estar conectados, representando um dano cognitivo relacionado ao aprendizado, no qual há envolvimento de derivados da 5-LO. Nós propomos que a LXA₄ potencializa a sinalização da AEA em receptores CB1, exercendo uma modulação refinada e possivelmente localizada da atividade sináptica que atua facilitando o aprendizado.

4.1.5 Expressão do receptor CB1 em camundongos 5-LO^{-/-}

A exposição crônica a níveis muito baixos de um agonista durante o desenvolvimento pode gerar alterações na expressão do seu receptor. Tendo este fato em vista, decidimos avaliar se a deleção genética da 5-LO, conseqüentemente reduzindo os níveis de LXA₄, pode alterar o conteúdo de receptores CB1 no SNC. Sendo confirmada, esta alteração poderia sustentar as diferenças comportamentais e cognitivas observadas. Portanto, a expressão de receptores CB1 foi avaliada em diferentes regiões do cérebro de camundongos 5-LO^{-/-} por métodos de bioquímica. Amostras de hipocampo, córtex e cerebelo foram obtidas e processadas para ensaio de WB. Nenhuma alteração significativa no conteúdo de CB1 foi observada entre animais 5-LO^{+/+} e 5-LO^{-/-} em qualquer das regiões cerebrais analisadas (Figura 4.7).

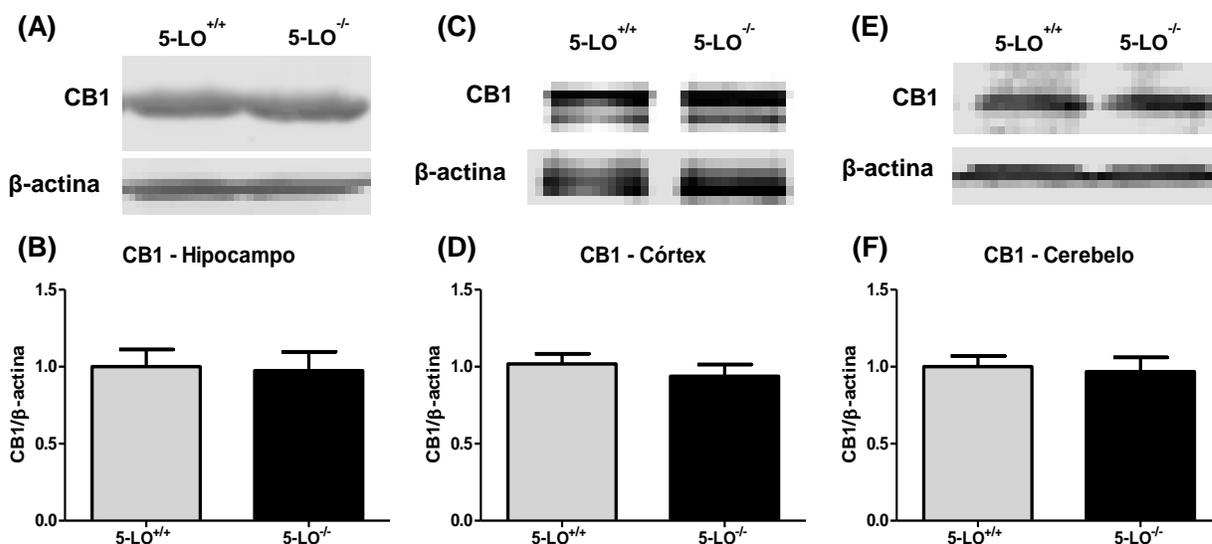


Figura 4.7 Expressão de CB1 no cérebro de camundongos $5\text{-LO}^{-/-}$ avaliada por WB. (A) Conteúdo de CB1 no hipocampo inalterado entre os genótipos ($p=0,88$; $n=6$). (B) Ausência de alteração na expressão de CB1 no córtex de animais $5\text{-LO}^{-/-}$ ($p=0,44$; $n=7$). (C) Nenhuma alteração no conteúdo de CB1 no cerebelo de $5\text{-LO}^{-/-}$ ($p=0,78$; $n=8$). Dados apresentados como média \pm erro padrão. Análise estatística por teste t não pareado.

Para confirmar os dados obtidos na técnica de WB, utilizamos outro método para avaliar a expressão de CB1 no cérebro de animais $5\text{-LO}^{-/-}$. Seções do cérebro de $5\text{-LO}^{-/-}$ abrangendo a região do hipocampo foram avaliadas por imunohistoquímica (Figura 4.8). As regiões CA1 e CA3 do hipocampo foram analisadas. A quantificação da densitometria óptica foi realizada nas imagens obtidas por microscopia de fluorescência nas regiões descritas em que se obtém a mais alta detecção de receptores CB1 no hipocampo, *stratum pyramidale* e *stratum radiatum* (162). Não foi possível detectar qualquer variação na marcação de CB1 na região CA1 ou na região CA3 do hipocampo entre animais $5\text{-LO}^{-/-}$ e $5\text{-LO}^{+/+}$. Esses dados indicam que as alterações comportamentais em funções reguladas pelo sistema eCB encontradas em camundongos $5\text{-LO}^{-/-}$ não podem ser explicadas por aumento ou redução do conteúdo de receptores CB1 e, portanto, deve ser produto da ausência de um ou mais dos eicosanoides derivados da 5-LO. No entanto, devido ao método utilizado não foi possível realizar uma comparação entre a expressão do receptor em diferentes compartimentos subcelulares. Seria interessante estabelecer se uma maior proporção de receptores encontra-se na membrana, regulando o potencial de membrana e a liberação de neurotransmissores, em mitocôndrias, regulando a respiração mitocondrial, ou no interior das células e inativo.

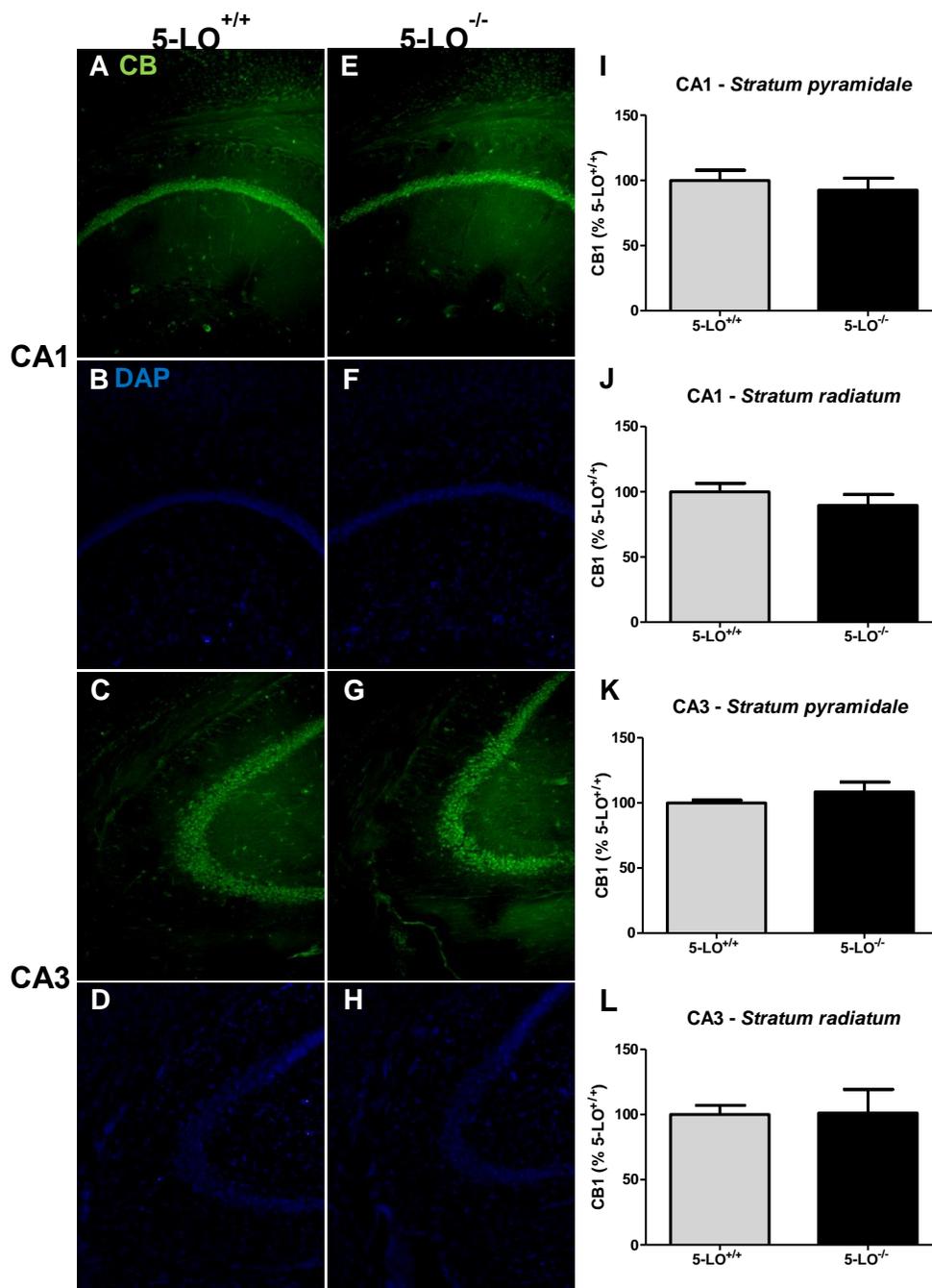


Figura 4.8 Expressão de CB1 no hipocampo de camundongos 5-LO^{-/-} analisada por imunohistoquímica. (A-D) Conteúdo de CB1 no hipocampo de animais 5-LO^{+/+} em região (A-B) CA1 e (C-D) CA3. (E-H) Conteúdo de CB1 no hipocampo de animais 5-LO^{-/-} em regiões (E-F) CA1 e (G-H) CA3. (I) Nenhuma alteração na expressão de CB1 entre os genótipos no *stratum pyramidale* da região CA1 ($p=0,35$; $n=5$). (J) Nenhuma alteração na expressão de CB1 entre os genótipos no *stratum radiatum* da região CA1 ($p=0,55$; $n=5$). (K) Nenhuma alteração na expressão de CB1 entre os genótipos no *stratum pyramidale* da região CA3 ($p=0,31$; $n=5$). (L) Nenhuma alteração na expressão de CB1 entre os genótipos no *stratum radiatum* da região CA3 ($p=0,95$; $n=5$). Dados expressos como média \pm erro padrão. Análise estatística por teste t não pareado.

4.2 LXA₄ e aprendizado em animais idosos

O estudo do declínio cognitivo que ocorre com o envelhecimento é até hoje extensivamente abordado, especialmente no que diz respeito à neurodegeneração. Este processo é associado, dentre outros fatores, ao aumento na expressão de 5-LO no cérebro de indivíduos idosos (167). No cérebro de camundongos já foi demonstrado que a expressão de 5-LO aumenta de forma específica no hipocampo durante o envelhecimento (168), estrutura altamente relacionada aos processos de memória. Acredita-se que isso ocorra devido a alterações hormonais, especificamente o aumento da liberação de glicocorticoides e redução na liberação de melatonina, que influenciam o promotor do gene responsável pela expressão de 5-LO (169). No entanto, os estudos até agora tiveram como foco a influência da produção de leucotrienos. O estado da produção de LXA₄ no envelhecimento ainda não foi abordado, nem seu papel sobre o declínio cognitivo em indivíduos idosos.

A fim de responder a esse questionamento, camundongos *Swiss Webster* idosos, de 12 meses, foram utilizados neste estudo. Nós investigamos a memória de curto prazo desses animais na tarefa de esQUIVA inibitória. O teste foi realizado 30 minutos após o condicionamento. Quando comparado a camundongos jovens, de 3 meses, os animais idosos apresentaram uma redução na latência para descer da plataforma (Figura 4.9G). Em seguida, investigamos a produção de LXA₄ e de CysLTs no plasma e no cérebro de animais jovens e idosos. Apesar de apresentarem um aumento na expressão de 5-LO (168), camundongos idosos têm uma redução na produção de LXA₄ e um aumento na produção de CysLTs, culminando numa alteração da razão entre LXA₄ e CysLTs (Figura 4.9A-F).

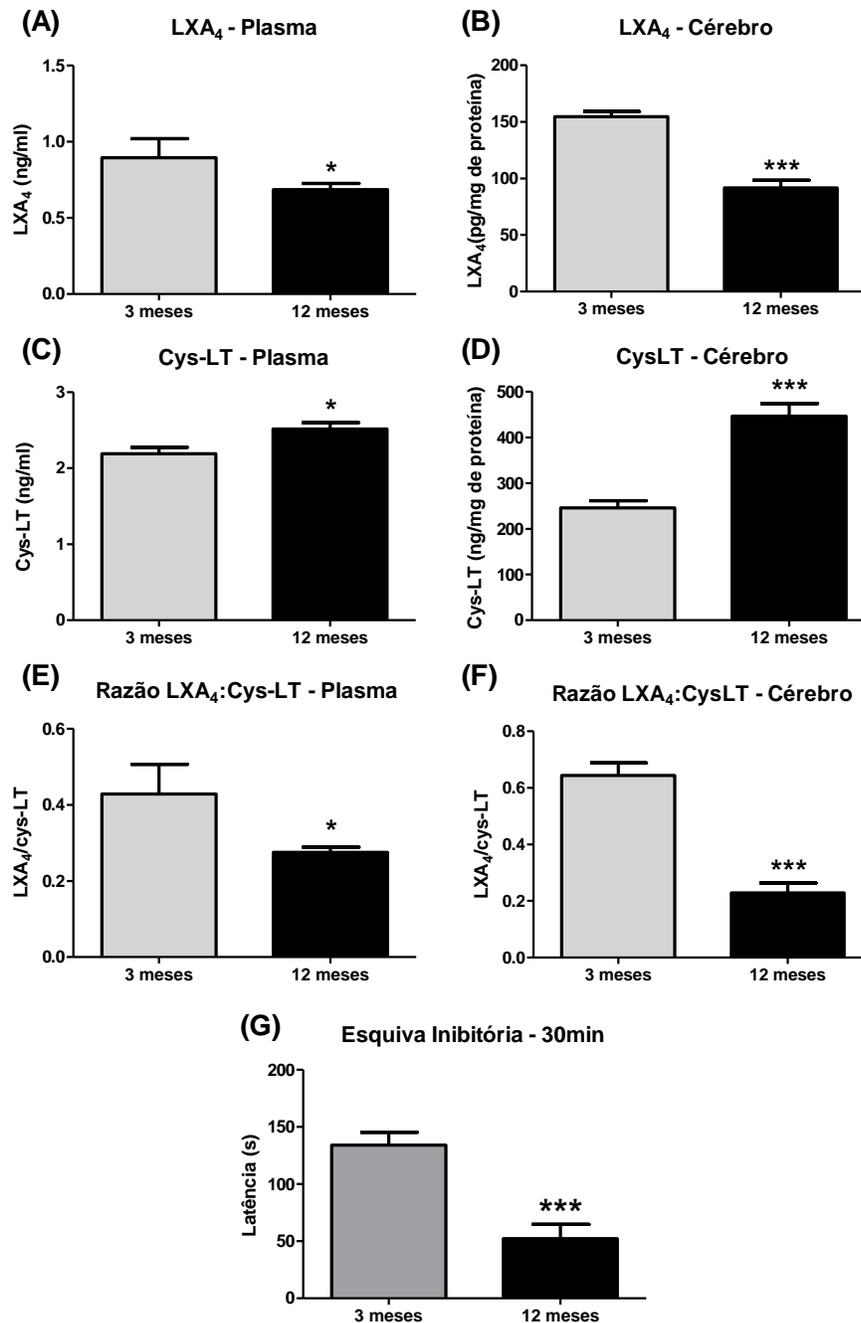


Figura 4.9 Animais *Swiss Webster* idosos (12 meses) têm redução da razão LXA₄/CysLTs acompanhada de disfunção cognitiva. (A) Níveis plasmáticos de LXA₄ estão reduzidos em animais idosos ($p=0,048$; $n=12-15$). (B) Níveis plasmáticos de CysLTs estão aumentados em animais idosos ($p=0,008$; $n=12-15$). (C) Redução na razão LXA₄/CysLTs em animais de 12 meses ($p=0,02$; $n=12-15$). (D) Níveis de LXA₄ no cérebro estão reduzidos em animais idosos ($p<0,0001$; $n=7-15$). (E) Níveis de CysLTs no cérebro estão reduzidos em animais idosos ($p=0,0001$; $n=7-15$). (F) Redução da razão LXA₄/CysLT no cérebro de animais de 12 meses ($p<0,0001$; $n=7-15$). (G) Dano cognitivo em memória de curto prazo (30 minutos) em animais de 12 meses ($p<0,0001$; $n=20-15$). Dados apresentados como média \pm erro padrão. Análise estatística realizada por teste t não pareado. * $p<0,05$; *** $p<0,001$

Esses resultados demonstram que no envelhecimento existe um desequilíbrio na produção de eicosanoides provenientes do metabolismo da 5-LO, favorecendo a liberação de CysLTs em detrimento da LXA₄. Ainda, essa alteração é acompanhada pelo desenvolvimento de disfunção cognitiva em memória de curto prazo, similar ao observado em animais 5-LO^{-/-}. Se a limitação na disponibilidade de LXA₄ tem um efeito direto sobre o aprendizado ou se o tratamento com LXA₄ exógena seria capaz de beneficiar a função cognitiva nos animais idosos ainda está sujeito a questionamento. No entanto, os dados aqui apresentados mostram outro modelo em que a redução de LXA₄ está relacionada à disfunção cognitiva, fornecendo evidências que corroboram nossa hipótese de que a LXA₄ endógena está envolvida em processos de aprendizado.

4.3 Neuroinflamação e dano cognitivo

4.3.1 Efeito da LXA₄ sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias em modelo de sepse por injeção de LPS

O processo de inflamação sistêmica provocada por LPS induz a produção de uma série de citocinas pró-inflamatórias, entre elas IL-1 β e IL-6 (110). Estas citocinas são fortemente relacionadas com a indução de dano cognitivo (104-107), portanto a análise de sua produção após o tratamento com LXA₄ pode auxiliar na previsão do efeito desta sobre o dano cognitivo. De fato, já foi demonstrado que a LXA₄ é capaz de reduzir a expressão de TNF α , IL-1 β e IL-6 em modelo de lesão cerebral traumática (136). Para analisar se também ocorre redução dessas citocinas mediante tratamento com LXA₄ em nosso modelo de inflamação sistêmica, a produção de IL-1 β e IL-6 foram quantificadas por ELISA no plasma e cérebro de camundongos 4h após injeção i.p. de LPS. Já foi mostrado que nesse período temporal há aumento significativo da produção de citocinas pró-inflamatórias tanto no plasma como no cérebro de camundongos (110). Observamos que o tratamento com LXA₄ (1 pmol/2 μ l icv) uma hora após a injeção de LPS 0,3 mg/kg i.p. foi capaz de reduzir o aumento da produção de IL-6 e IL-1 β no plasma e no cérebro de camundongos (Figura 4.10). Levando em conta o envolvimento dessas citocinas na produção de dano cognitivo (104-107), esses dados apontam para um potencial da LXA₄ também na prevenção do dano cognitivo presente no modelo de sepse por injeção de LPS.

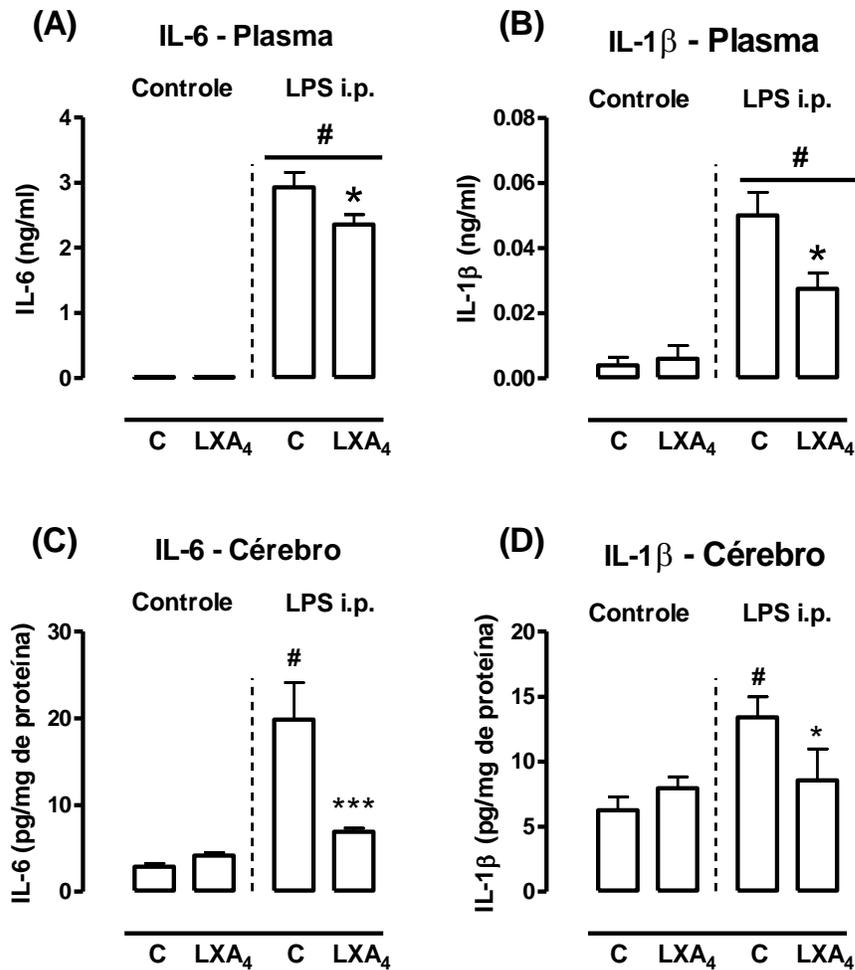


Figura 4.10 Supressão da produção de IL-6 e IL-1 β induzida por LPS após tratamento com LXA₄. Quantificação por ELISA de IL-6 e IL-1 β no plasma (A e B) e cérebro (C e D) de camundongos 4h após indução de inflamação por LPS (n=4-5). Dados expressos como média \pm erro padrão. Análise estatística realizada por ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls. C: controle. #p<0,001 vs controle; *p<0,05 vs LPS + controle; ***p<0,001 vs LPS + controle.

No entanto, o mecanismo de ação da LXA₄ neste caso ainda precisa ser elucidado. Apesar de o efeito ter sido observado tanto no SNC como na periferia, ainda não é claro se foi mediado por sinalização em receptores CB1 ou receptores ALX. O tratamento com antagonistas específicos desses dois receptores em animais que receberam a aplicação de LXA₄ pode esclarecer essa questão. Além disso, o mecanismo que leva o tratamento local com LXA₄ icv, ou seja, diretamente no SNC, a afetar os níveis de citocinas no plasma ainda não é claro. A dose administrada por via icv é muito mais baixa do que a dose administrada por via ip e provavelmente o extravasamento para a periferia da LXA₄ injetada, se este ocorre, culmina em níveis

séricos negligenciáveis. Portanto, é improvável que o tratamento com LXA₄ icv seja diretamente responsável pelo efeito anti-inflamatório sistêmico. Outra alternativa que pode explicar os dados obtidos seria a ação da LXA₄ sobre a via anti-inflamatória colinérgica. Através desta, drogas administradas por via icv em baixas doses podem gerar um efeito anti-inflamatório indireto (170). Estímulos elétricos ou farmacológicos podem ativar o nervo vago, que envia sinais dependentes da ação de receptores colinérgicos até seus alvos neurais. Este sinal é propagado, provavelmente por via não neural até o baço, suprimindo a produção de TNF α por macrófagos (170). Não há estudos na literatura que investiguem o envolvimento do sistema eCB, do receptor ALX ou da LXA₄ na via anti-inflamatória colinérgica, porém a ação do tratamento com LXA₄ icv sobre a produção sistêmica de citocinas inflamatórias pode ser explicado por estímulo desta via.

4.3.2 Efeito da LXA₄ no dano cognitivo em modelo de sepse por injeção de LPS

Para caracterizar o dano cognitivo presente no nosso modelo de sepse por injeção sistêmica aguda de LPS, estabelecemos como objetivo inicial investigar o impacto da inflamação em diferentes fases dos processos de memória. Após a aquisição da memória, esta se encontra em um estado lábil enquanto passa por um processo de consolidação, que ocorre em até 24 h após o estímulo (171). Quando o estímulo é apresentado novamente, o indivíduo deve se lembrar do que aprendeu previamente sobre aquele estímulo, este processo é chamado de reativação ou evocação de memória (171).

O teste comportamental de condicionamento aversivo contextual foi utilizado como instrumento para avaliar essas fases da memória. A fim de observar o efeito da inflamação sobre o processo de consolidação, camundongos *Swiss Webster* adultos jovens receberam uma injeção i.p. de LPS imediatamente após o condicionamento em doses diversas (0,3 mg/kg, 1 mg/kg ou 3 mg/kg). Após sete dias, os animais foram testados por reexposição à caixa de condicionamento e o tempo de congelamento, expresso por períodos de imobilidade, foi contabilizado (Figura 4.11). Observamos que as três doses de LPS testadas produziram uma redução significativa no tempo de congelamento. Dessa forma, é possível constatar que uma dose de 0,3 mg/kg já é

capaz de induzir prejuízo na consolidação de memória, portanto essa dose foi utilizada nos demais experimentos conduzidos.

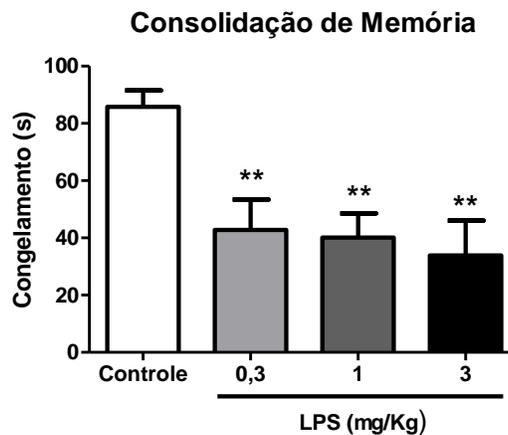


Figura 4.11 Consolidação de memória em modelo de sepse por injeção de LPS. Tempo de congelamento em segundos contabilizado como parâmetro da retenção de memória. Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Análise estatística por ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls (** $p < 0,01$ vs. Controle; $n = 10$).

Em seguida, analisamos a evocação de memórias já consolidadas no modelo de sepse por injeção aguda de LPS em baixa dose (0,3 mg/kg). Os camundongos foram submetidos ao teste comportamental de condicionamento aversivo contextual e receberam uma injeção de LPS somente 24 h após o condicionamento, ou seja, após a memória já ter se consolidado. O teste foi realizado sete dias após o condicionamento e o tempo de congelamento foi registrado como índice de memória (Figura 4.12). Não foi encontrada diferença significativa na resposta de medo entre o grupo de animais que recebeu LPS e o que recebeu somente veículo. Estes resultados indicam que, no nosso modelo, a neuroinflamação não tem efeito sobre a evocação de memória, perturbando somente a fase de consolidação. É possível que doses mais altas de LPS – de até 10 mg/kg, por exemplo – impactem também a evocação de memória (172), no entanto essa avaliação está fora do escopo deste estudo, que foi identificar o dano cognitivo decorrente da administração de baixas doses de LPS. Uma das justificativas para o uso de baixas doses é a intenção de observar os efeitos da neuroinflamação sem que os animais apresentem comportamentos típicos de animais doentes (*sickness behavior*), como acontece somente na fase aguda de uma doença

inflamatória generalizada. Nosso objetivo foi mimetizar as perturbações cognitivas de origem inflamatória que sucedem a sepse em sua fase mais tardia. A caracterização dos processos de memória afetados em nosso modelo de sepse serviu como base para avaliar o possível efeito do tratamento com LXA₄ na reversão dessas alterações comportamentais.

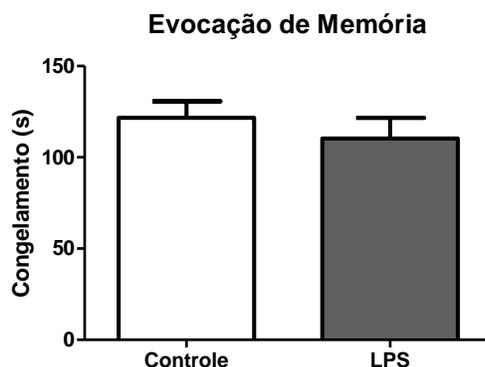


Figura 4.12 Evocação de memórias já consolidadas em modelo de sepse por injeção de LPS (0,3 mg/kg i.p.). Tempo de congelamento em segundos contabilizado como parâmetro da evocação de memória. Dados apresentados como média \pm erro padrão. Análise estatística por teste t não pareado ($p=0,22$; $n=9-10$).

A administração de LXA₄ (1 pmol/2 μ l icv) uma hora após estímulo com LPS reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias no SNC e na periferia. Portanto, nós avaliamos se o mesmo protocolo de tratamento seria capaz de prevenir o dano em consolidação de memória observado com uma dose de LPS (0,3 mg/kg i.p.) administrada após o condicionamento. A infusão de LXA₄ no cérebro de camundongos na ausência de estímulo inflamatório não alterou a consolidação de memória. Ainda, obtivemos sucesso em resgatar a níveis próximos do controle a expressão da resposta de medo em animais com inflamação sistêmica induzida por LPS, mediante tratamento com LXA₄ (Figura 4.13). A partir deste dado, formulamos a hipótese de que a LXA₄ age sobre receptores ALX para promover resolução da inflamação e sobre receptores CB1 para induzir neuroproteção, inibindo, dessa forma, o desenvolvimento de dano cognitivo em modelos de sepse. O quanto esse efeito é dependente de ALX ou de CB1 permanece em aberto e poderá ser abordado através de pré-tratamento com baixas doses de antagonistas específicos para ambos receptores. Não obstante, esses dados corroboram nossos resultados anteriores ao demonstrar mais uma evidência do efeito

benéfico da LXA₄ em processos de formação de memória, além de revelar o seu potencial no tratamento da EAS e na prevenção do dano cognitivo que a acompanha.

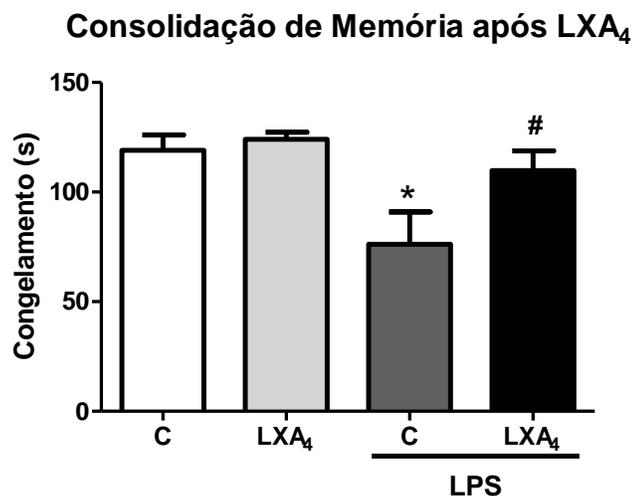


Figura 4.13 Tratamento com LXA₄ recupera dano cognitivo após injeção de LPS. Indução de inflamação sistêmica por LPS após condicionamento reduz a consolidação de memória no teste de condicionamento aversivo contextual. Esse efeito é bloqueado pelo tratamento com LXA₄ (1pmol/2µl icv) uma hora após injeção de LPS (0,3mg/kg i.p.) (n=7-11). Dados expressos como média ± erro padrão. Análise estatística realizada por ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls. *p<0,05 vs controle; #p<0,05 vs controle + LPS.

5. Conclusões

Este estudo fornece novas evidências que apoiam a participação da LXA₄ endógena em uma série de comportamentos regulados pelo sistema eCB. Em síntese, a LXA₄ tem um efeito ansiolítico relevante principalmente durante o envelhecimento, efeito antinociceptivo e na facilitação do aprendizado de memórias aversivas. A terapia com canabinóides já foi proposta para pacientes com transtornos de ansiedade (173) e para alívio da dor (174). Levando em conta o poder da LXA₄ na promoção de efeito ansiolítico e antinociceptivo, é possível que esta seja também benéfica para o tratamento de transtornos de ansiedade e de alívio da dor. O impacto da LXA₄ em memória e aprendizado também pode ter aplicação clínica em tratamentos que envolvem a extinção de memórias aversivas em alguns transtornos de ansiedade, como no caso da terapia para estresse pós-traumático (175). Por ser um ligante alostérico e não um agonista ortostérico, a LXA₄ tem vantagens em relação a outros compostos que estimulam o sistema eCB, que são a ausência de efeitos psicotrópicos e a ação localizada somente em eventos que induzem o aumento da liberação de eCBs, como a exposição a estresse físico ou psicológico (176).

Além disso, o tratamento com LXA₄ também pode ser benéfico no tratamento da EAS, pois, no nosso modelo de sepse por injeção de LPS, a aplicação de LXA₄ apresentou efeito anti-inflamatório no SNC e na periferia, além de ser capaz de prevenir o dano cognitivo observado em consolidação de memória. No tratamento da EAS, tanto a resolução da inflamação como a neuroproteção são fatores importantes para o resgate de dano cognitivo, portanto a ação conjunta em receptores CB1 no SNC e ALX na periferia pode explicar o efeito da LXA₄ após injeção de LPS. É possível que a LXA₄ seja também eficaz no tratamento de EAS causada por outros modelos de sepse consideradas mais próximas da patologia observada em humanos, tal como CLP.

Neste estudo, nós demonstramos o impacto da LXA₄ em diversas funções do SNC em condições fisiológicas e em resposta a estímulo inflamatório, expandindo o conhecimento do seu papel no SNC. O mecanismo de ação da LXA₄ nas funções pesquisadas ainda não é totalmente claro, porém o sistema eCB é um bom candidato devido ao seu bem descrito envolvimento nas condições estudadas. A modulação alostérica dos receptores canabinóides é um tema em ampla ascensão em nível

internacional, pois foi muito pouco explorado, e a LXA₄ parece ser um modulador endógeno particularmente potente deste sítio. Desta maneira, o esforço para elucidar a fisiologia da LXA₄ no SNC é de grande importância, uma vez que pode impactar estudos futuros sobre o papel do sistema eCB na homeostase e inflamação.

6. Referências Bibliográficas

1. Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Sep;81(17):5335-9.
2. Romano M, Serhan CN. Lipoxin generation by permeabilized human platelets. *Biochemistry*. 1992 Sep 8;31(35):8269-77.
3. Serhan CN. Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? *Prostaglandins*. 1997 Feb; 53(2):107-37.
4. Abramovitz M, Wong E, Cox ME, Richardson CD, Li C, Vickers PJ. 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur J Biochem*. 1993 Jul 1;215(1):105-11.
5. Werz O. 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2002 Mar;1(1):23-44.
6. Chiang N, Serhan CN, Dahlén SE, Drazen JM, Hay DW, Rovati GE, et al. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacol Rev*. 2006 Sep;58(3):463-87.
7. Hu S, Mao-Ying QL, Wang J, Wang ZF, Mi WL, Wang XW, et al. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin alleviate bone cancer pain in association with suppressing expression of spinal proinflammatory cytokines. *J Neuroinflammation*. 2012 Dec 26;9:278.
8. Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:101-37.
9. Romano M, Recchia I, Recchiuti A. Lipoxin Receptors. *ScientificWorldJournal*. 2007 Sep 1;7:1393-412.
10. Sri Kantha S, Matsumura H, Kubo E, Kawase K, Takahata R, Serhan CN, et al. Effects of prostaglandin D2, lipoxins and leukotrienes on sleep and brain temperature of rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1994 Aug;51(2):87-93.
11. Shearman MS, Naor Z, Sekiguchi K, Kishimoto A, Nishizuka Y. Selective activation of the gamma-subspecies of protein kinase C from bovine cerebellum by

- arachidonic acid and its lipoxygenase metabolites. *FEBS Lett.* 1989 Jan 30;243(2):177-82.
12. Pamplona FA, Ferreira J, Menezes de Lima O Jr, Duarte FS, Bento AF, Forner S, et al. Anti-inflammatory lipoxin A4 is an endogenous allosteric enhancer of CB1 cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Dec 18;109(51):21134-9.
 13. 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 Jun;54(2):161-202.
 14. 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 Dec 18;258(5090):1946-9.
 15. Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature.* 1997 Aug 21;388(6644):773-8.
 16. Wilson RI, Nicoll RA. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature.* 2001 Mar 29;410(6828):588-92.
 17. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. *Principles of Neural Science.* 5ª edição. Nova Iorque: McGraw-Hill; 2013.
 18. Pamplona FA, Takahashi RN. Psychopharmacology of the endocannabinoids: far beyond anandamide. *J Psychopharmacol.* 2012 Jan;26(1):7-22.
 19. Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology.* 2004;47 Suppl 1:345-58.
 20. McLaughlin RJ, Gobbi G. Cannabinoids and emotionality: a neuroanatomical perspective. *Neuroscience.* 2012 Mar 1;204:134-44.
 21. Bortolato M, Campolongo P, Mangieri RA, Scattoni ML, Frau R, Trezza V, et al. Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. *Neuropsychopharmacology.* 2006 Dec;31(12):2652-9.
 22. Patel S, Hillard CJ. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Jul;318(1):304-11.
 23. Moreira FA, Kaiser N, Monory K, Lutz B. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme

- fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. *Neuropharmacology*. 2008 Jan;54(1):141-50.
24. Rubino T, Guidali C, Vigano D, Realini N, Valenti M, Massi P, et al. CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour. *Neuropharmacology*. 2008 Jan;54(1):151-60.
 25. Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol*. 2002 Jun;136(4):550-7.
 26. Jamshidi N, Taylor DA. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol*. 2001 Nov;134(6):1151-4.
 27. Colombo G, Agabio R, Diaz G, Lobina C, Reali R, Gessa GL. Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci*. 1998;63(8):PL113-7.
 28. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Járjai Z, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*. 2001 Apr 12;410(6830):822-5.
 29. Huang H, Acuna-Goycolea C, Li Y, Cheng HM, Obrietan K, van den Pol AN. Cannabinoids excite hypothalamic melanin-concentrating hormone but inhibit hypocretin/orexin neurons: implications for cannabinoid actions on food intake and cognitive arousal. *J Neurosci*. 2007 May 2;27(18):4870-81.
 30. Koch M, Varela L, Kim JG, Kim JD, Hernández-Nuño F, Simonds SE, et al. Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature*. 2015 Mar 5;519(7541):45-50.
 31. Ruginsk SG, Vechiato FM, Elias LL, Antunes-Rodrigues J. The endocannabinoid system and the neuroendocrine control of hydromineral balance. *J Neuroendocrinol*. 2014 Jun;26(6):370-6.
 32. Kettunen P1, Kyriakatos A, Hallén K, El Manira A. Neuromodulation via conditional release of endocannabinoids in the spinal locomotor network. *Neuron*. 2005 Jan 6;45(1):95-104.
 33. Marcaggi P. Cerebellar endocannabinoids: retrograde signaling from purkinje cells. *Cerebellum*. 2015 Jun;14(3):341-53.

34. El Manira A, Kyriakatos A. The role of endocannabinoid signaling in motor control. *Physiology (Bethesda)*. 2010 Aug;25(4):230-8.
35. Morera-Herreras T, Miguelez C, Aristieta A, Ruiz-Ortega JÁ, Ugedo L. Endocannabinoid modulation of dopaminergic motor circuits. *Front Pharmacol*. 2012 Jun 12;3:110.
36. Järbe TU1, Andrzejewski ME, DiPatrizio NV. Interactions between the CB1 receptor agonist Delta 9-THC and the CB1 receptor antagonist SR-141716 in rats: open-field revisited. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002 Nov;73(4):911-9.
37. Sano K, Mishima K, Koushi E, Orito K, Egashira N, Irie K, et al. Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced catalepsy-like immobilization is mediated by decreased 5-HT neurotransmission in the nucleus accumbens due to the action of glutamate-containing neurons. *Neuroscience*. 2008 Jan 24;151(2):320-8.
38. McLaughlin PJ1, Thakur GA, Vemuri VK, McClure ED, Brown CM, Winston KM, et al. Behavioral effects of the novel potent cannabinoid CB1 agonist AM 4054. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013 Aug;109:16-22.
39. Walker JM, Huang SM. Cannabinoid analgesia. *Pharmacology & Therapeutics* 2002, 95(2):127-35.
40. Ständer S, Schmelz M, Metzke D, Luger T, Rukwied R. Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *J Dermatol Sci*. 2005 Jun;38(3):177-88.
41. Woodhams SG, Sagar DR, Burston JJ, Chapman V. The role of the endocannabinoid system in pain. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;227:119-43.
42. Zogopoulos P, Vasileiou I, Patsouris E, Theocharis SE. The role of endocannabinoids in pain modulation. *Fundam Clin Pharmacol*. 2013 Feb;27(1):64-80.
43. Maren, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:897-931.
44. Maren, S. Seeking a spotless mind: extinction, deconsolidation, and erasure of fear memory. *Neuron*. 2011 Jun 9;70(5):830-45.
45. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957 Feb;20(1):11-21.

46. Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH. Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci*. 1999 Jun 15;19(12):5034-43.
47. Bannerman DM1, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, et al. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004 May;28(3):273-83.
48. Tannenholz L, Jimenez JC, Kheirbek MA. Local and regional heterogeneity underlying hippocampal modulation of cognition and mood. *Front Behav Neurosci*. 2014 May 6;8:147.
49. Orsini CA, Maren S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012 Aug;36(7):1773-802.
50. Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci*. 2001 Sep 1;21(17):6889-96.
51. McHugh TJ, Tonegawa S. CA3 NMDA receptors are required for the rapid formation of a salient contextual representation. *Hippocampus*. 2009 Dec;19(12):1153-8.
52. Remaud J, Ceccom J, Carponcy J, Dugué L, Menchon G, Pech S, et al. Anisomycin injection in area CA3 of the hippocampus impairs both short-term and long-term memories of contextual fear. *Learn Mem*. 2014 May 15;21(6):311-5.
53. De Oliveira Alvares L, de Oliveira LF, Camboim C, Diehl F, Genro BP, Lanzotti VB, et al. Amnestic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2005 Mar;83(2):119-24
54. De Oliveira Alvares L, Genro BP, Vaz Breda R, Pedroso MF, Da Costa JC, Quillfeldt JA. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res*. 2006 Feb 23;1075(1):60-7.
55. De Oliveira Alvares L, Genro BP, Diehl F, Quillfeldt JA. Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiol Learn Mem*. 2008 Jul;90(1):1-9.

56. Takahashi RN, Pamplona FA, Fernandes MS. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neurosci Lett.* 2005 Jun 3;380(3):270-5.
57. Pamplona FA, Prediger RD, Pandolfo P, Takahashi RN. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2006 Nov;188(4):641-9.
58. Deadwyler SA, Goonawardena AV, Hampson RE. Short-term memory is modulated by the spontaneous release of endocannabinoids: evidence from hippocampal population codes. *Behav Pharmacol.* 2007 Sep;18(5-6):571-80.
59. De Oliveira Alvares L, Pasqualini Genro B, Diehl F, Molina VA, Quilfeldt JA. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience.* 2008 Jul 17;154(4):1648-55.
60. De Bitencourt RM, Pamplona FA, Takahashi RN. A current overview of cannabinoids and glucocorticoids in facilitating extinction of aversive memories: potential extinction enhancers. *Neuropharmacology.* 2013 Jan;64:389-95.
61. Katona I, Urbán GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, et al. Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci.* 2006 May 24;26(21):5628-37.
62. Takahashi KA, Castillo PE. The CB1 cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus. *Neuroscience.* 2006;139(3):795-802.
63. Tsou K, Mackie K, Sañudo-Peña MC, Walker JM. Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience.* 1999;93(3):969-75.
64. Marsicano G, Lutz B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci.* 1999 Dec;11(12):4213-25.
65. Katona I, Rancz EA, Acsady L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, Freund TF. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci.* 2001 Dec 1;21(23):9506-18.
66. Amal H, Fridman-Rozevich L, Senn R, Strelnikov A, Gafni M, Keren O, et al. Long-term consequences of a single treatment of mice with an ultra-low dose of Delta9-tetrahydrocannabinol (THC). *Behav Brain Res.* 2010 Jan 20;206(2):245-53.

67. Baek Jh, Zheng Y, Darlington CL, Smith PF. The CB1 receptor agonist, WIN 55,212-2, dose-dependently disrupts object recognition memory in adult rats. *Neurosci Lett*. 2009 Oct 16;464(1):71-3.
68. Kuhnert S, Meyer C, Koch M. Involvement of cannabinoid receptors in the amygdala and prefrontal cortex of rats in fear learning, consolidation, retrieval and extinction. *Behav Brain Res*. 2013 Aug 1;250:274-84.
69. Varvel SA, Wise LE, Niyuhire F, Cravatt BF, Lichtman AH. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase accelerates acquisition and extinction rates in a spatial memory task. *Neuropsychopharmacology*. 2007 May;32(5):1032-41.
70. Wise LE, Harloe JP, Lichtman AH. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) knockout mice exhibit enhanced acquisition of an aversive, but not of an appetitive, Barnes maze task. *Neurobiol Learn Mem*. 2009 Nov;92(4):597-601.
71. Tan H, Lauzon NM, Bishop SF, Chi N, Bechard M, Laviolette SR. Cannabinoid transmission in the basolateral amygdala modulates fear memory formation via functional inputs to the prelimbic cortex. *J Neurosci*. 2011 Apr 6;31(14):5300-12.
72. Alberini CM, Ledoux JE. Memory reconsolidation. *Curr Biol*. 2013 Sep 9;23(17):R746-50.
73. Baldi E, Bucherelli C. Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015 Jun;53:160-190.
74. Furini C, Myskiw J, Izquierdo I. The learning of fear extinction. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014 Nov;47:670-83.
75. Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, et al. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*. 2002 Aug 1;418(6897):530-4.
76. Pamplona FA, Prediger RD, Pandolfo P, Takahashi RN. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006 Nov;188(4):641-9.
77. Lin HC, Mao SC, Su CL, Gean PW. The role of prefrontal cortex CB1 receptors in the modulation of fear memory. *Cereb Cortex*. 2009 Jan;19(1):165-75.
78. Varvel SA, Wise LE, Niyuhire F, Cravatt BF, Lichtman AH. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase accelerates acquisition and extinction rates in a spatial memory task. *Neuropsychopharmacology*. 2007 May;32(5):1032-41.

79. Najjar S, Pearlman DM, Alper K, Najjar A, Devinsky O. Neuroinflammation and psychiatric illness. *J Neuroinflammation*. 2013 Apr 1;10:43.
80. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):918-34.
81. Hein AM, O'Banion MK. Neuroinflammation and memory: the role of prostaglandins. *Mol Neurobiol*. 2009 Aug;40(1):15-32.
82. Lee M. Neurotransmitters and microglial-mediated neuroinflammation. *Curr Protein Pept Sci*. 2013 Feb;14(1):21-32.
83. Pytel P, Alexander JJ. Pathogenesis of septic encephalopathy. *Curr Opin Neurol*. 2009 Jun;22(3):283-7.
84. Papadopoulos MC, Davies DC, Moss RF, Tighe D, Bennett ED. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit Care Med*. 2000 Aug;28(8):3019-24.
85. Gofton TE, Young GB. Sepsis-associated encephalopathy. *Nat Rev Neurol*. 2012 Oct;8(10):557-66
86. Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, et al. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*. 2005 Jan;33(1):221-3; discussion 262-3.
87. Noh H, Jeon J, Seo H. Systemic injection of LPS induces region-specific neuroinflammation and mitochondrial dysfunction in normal mouse brain. *Neurochem Int*. 2014 Apr;69:35-40.
88. Rivest S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun*. 2003 Feb;17(1):13-9.
89. Sonnevile R, Verdonk F, Rauturier C, Klein IF, Wolff M, Annane D, et al. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Ann Intensive Care*. 2013 May 29;3(1):15.
90. Michels M, Vieira AS, Vuolo F, Zapelini HG, Mendonça B, Mina F, et al. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. *Brain Behav Immun*. 2015 Jan;43:54-9.
91. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*. 2010 Oct 27;304(16):1787-94.

92. Semmler A, Widmann CN, Okulla T, Urbach H, Kaiser M, Widman G, et al. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013 Jan;84(1):62-9.
93. Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, et al. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol*. 2007 Apr;204(2):733-40.
94. Weberpals M, Hermes M, Hermann S, Kummer MP, Terwel D, Semmler A, et al. NOS2 gene deficiency protects from sepsis-induced long-term cognitive deficits. *J Neurosci*. 2009 Nov 11;29(45):14177-84.
95. Biff D, Petronilho F, Constantino L, Vuolo F, Zamora-Berridi GJ, Dall'Igna DM, et al. Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats. *Shock*. 2013 Jul;40(1):45-8.
96. Anderson ST, Commins S, Moynagh PN, Coogan AN. Lipopolysaccharide-induced sepsis induces long-lasting affective changes in the mouse. *Brain Behav Immun*. 2015 Jan;43:98-109.
97. Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, et al. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*. 2005 Jan;33(1):221-3.
98. Barichello T, Martins MR, Reinke A, Constantino LS, Machado RA, Valvassori SS, Dal-Pizzol F. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 40 (6) (2007), pp. 831–837.
99. Comim CM, Pereira JG, Steckert A, Petronilho F, Barichello T, Quevedo J, et al. Rivastigmine reverses habituation memory impairment observed in sepsis survivor rats. *Shock*. 2009 Sep;32(3):270-1.
100. Comim CM, Constantino LS, Petronilho F, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Aversive memory in sepsis survivor rats. *J Neural Transm*. 2011 Feb;118(2):213-7.
101. Comim CM, Constantino LC, Barichello T, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive impairment in the septic brain. *Curr Neurovasc Res*. 2009 Aug;6(3):194-203.
102. Schwalm MT, Pasquali M, Miguel SP, Dos Santos JP, Vuolo F, Comim CM, et al. Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive

- deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats. *Mol Neurobiol.* 2014 Feb;49(1):380-5.
103. Hernandez MS, D'Avila JC, Trevelin SC, Reis PA, Kinjo ER, Lopes LR, et al. The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis. *J Neuroinflammation.* 2014 Feb 27;11:36.
104. Moraes CA, Santos G, Spohr TC, D'Avila JC, Lima FR, Benjamim CF, et al. Activated Microglia-Induced Deficits in Excitatory Synapses Through IL-1 β : Implications for Cognitive Impairment in Sepsis. *Mol Neurobiol.* 2014 Sep 27.
105. Mina F, Comim CM, Dominguni D, Cassol-Jr OJ, Dall Igna DM, Ferreira GK, et al. IL-1 β involvement in cognitive impairment after sepsis. *Mol Neurobiol.* 2014 Apr;49(2):1069-76.
106. Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, Kraus T, Haack M, Morag A, et al. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry.* 2001 May;58(5):445-52.
107. Krabbe KS, Reichenberg A, Yirmiya R, Smed A, Pedersen BK, Bruunsgaard H. Low-dose endotoxemia and human neuropsychological functions. *Brain Behav Immun.* 2005 Sep;19(5):453-60.
108. Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 2011 Feb;25(2):181-213
109. Imamura Y, Wang H, Matsumoto N, Muroya T, Shimazaki J, Ogura H, et al. Interleukin-1 β causes long-term potentiation deficiency in a mouse model of septic encephalopathy. *Neuroscience.* 2011 Jul 28;187:63-9.
110. Erickson MA, Banks WA. Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: multiplex quantification with path analysis. *Brain Behav Immun.* 2011 Nov;25(8):1637-48.
111. Ye L, Huang Y, Zhao L, Li Y, Sun L, Zhou Y, et al. IL-1 β and TNF- α induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *J Neurochem.* 2013 Jun;125(6):897-908.
112. Yan X, Yadav R, Gao M, Weng HR. Interleukin-1 beta enhances endocytosis of glial glutamate transporters in the spinal dorsal horn through activating protein kinase C. *Glia.* 2014 Jul;62(7):1093-109.

113. Tan H, Cao J, Zhang J, Zuo Z. Critical role of inflammatory cytokines in impairing biochemical processes for learning and memory after surgery in rats. *J Neuroinflammation*. 2014 May 22;11:93.
114. Mishra A, Kim HJ, Shin AH, Thayer SA. Synapse loss induced by interleukin-1 β requires pre- and post-synaptic mechanisms. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012 Sep;7(3):571-8.
115. Gonzalez P, Machado I, Vilcaes A, Caruso C, Roth GA, Schiöth H, et al. Molecular mechanisms involved in interleukin 1-beta (IL-1 β)-induced memory impairment. Modulation by alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH). *Brain Behav Immun*. 2013 Nov;34:141-50.
116. Dugan LL, Ali SS, Shekhtman G, Roberts AJ, Lucero J, Quick KL, et al. IL-6 mediated degeneration of forebrain GABAergic interneurons and cognitive impairment in aged mice through activation of neuronal NADPH oxidase. *PLoS One*. 2009;4(5):e5518.
117. Sparkman NL, Buchanan JB, Heyen JR, Chen J, Beverly JL, Johnson RW. Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers. *J Neurosci*. 2006 Oct 18;26(42):10709-16.
118. Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, et al. Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur J Pharmacol*, 396 (2–3) (2000), pp. 141–149
119. Kaplan BL. The role of CB1 in immune modulation by cannabinoids. *Pharmacol Ther*. 2013 Mar;137(3):365-74.
120. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*. 2014 Jun 3;11:98. doi: 10.1186/1742-2094-11-98.
121. Mecha M, Feliú A, Carrillo-Salinas FJ, Rueda-Zubiaurre A, Ortega-Gutiérrez S, García de Sola R, et al. Endocannabinoids drive the acquisition of an alternative phenotype in microglia. *Brain Behav Immun*. 2015 Jun 15. pii: S0889-1591(15)00153-1.
122. Jacob A, Brorson JR, Alexander JJ. Septic encephalopathy: inflammation in man and mouse. *Neurochem Int*. 2011 Mar;58(4):472-6.

123. Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C, Rothwell NJ. Role of CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocyte cultures. *J Neurosci Res.* 2002 Mar 15;67(6):829-36.
124. Sheng WS, Hu S, Min X, Cabral GA, Lokensgard JR, Peterson PK. Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Glia.* 2005 Jan 15;49(2):211-9.
125. Cassol-Jr OJ, Comim CM, Silva BR, Hermani FV, Constantino LS, Felisberto F, et al. Treatment with cannabidiol reverses oxidative stress parameters, cognitive impairment and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. *Brain Res.* 2010 Aug 12;1348:128-38.
126. Fishbein-Kaminietsky M, Gafni M, Sarne Y. Ultralow doses of cannabinoid drugs protect the mouse brain from inflammation-induced cognitive damage. *J Neurosci Res.* 2014 Dec;92(12):1669-77.
127. Roche M, Kelly JP, O'Driscoll M, Finn DP. Augmentation of endogenous cannabinoid tone modulates lipopolysaccharide-induced alterations in circulating cytokine levels in rats. *Immunology.* 2008 Oct;125(2):263-71.
128. Roche M, Diamond M, Kelly JP, Finn DP. In vivo modulation of LPS-induced alterations in brain and peripheral cytokines and HPA axis activity by cannabinoids. *J Neuroimmunol.* 2006 Dec;181(1-2):57-67.
129. Hu H, Ho W, Mackie K, Pittman QJ, Sharkey KA. Brain CB₁ receptor expression following lipopolysaccharide-induced inflammation. *Neuroscience.* 2012 Dec 27;227:211-22.
130. Xu JY, Chen C. Endocannabinoids in synaptic plasticity and neuroprotection. *Neuroscientist.* 2015 Apr;21(2):152-68.
131. Walker J, Dichter E, Lacorte G, Kerner D, Spur B, Rodriguez A, et al. Lipoxin a4 increases survival by decreasing systemic inflammation and bacterial load in sepsis. *Shock.* 2011 Oct;36(4):410-6.
132. Wu B, Walker JA, Temmermand D, Mian K, Spur B, Rodriguez A, et al. Lipoxin A(4) promotes more complete inflammation resolution in sepsis compared to stable lipoxin A(4) analog. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013 Jul;89(1):47-53.

133. Wu Y, Wang YP, Guo P, Ye XH, Wang J, Yuan SY, et al. A lipoxin A4 analog ameliorates blood-brain barrier dysfunction and reduces MMP-9 expression in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *J Mol Neurosci*. 2012 Mar;46(3):483-91.
134. Ye XH, Wu Y, Guo PP, Wang J, Yuan SY, Shang Y, et al. Lipoxin A4 analogue protects brain and reduces inflammation in a rat model of focal cerebral ischemia reperfusion. *Brain Res*. 2010 Apr 6;1323:174-83.
135. Jin W, Jia Y, Huang L, Wang T, Wang H, Dong Y, et al. Lipoxin A4 methyl ester ameliorates cognitive deficits induced by chronic cerebral hypoperfusion through activating ERK/Nrf2 signaling pathway in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014 Sep;124:145-52.
136. Luo CL, Li QQ, Chen XP, Zhang XM, Li LL, Li BX, et al. Lipoxin A4 attenuates brain damage and downregulates the production of pro-inflammatory cytokines and phosphorylated mitogen-activated protein kinases in a mouse model of traumatic brain injury. *Brain Res*. 2013 Mar 28;1502:1-10.
137. Wu J, Wang A, Min Z, Xiong Y, Yan Q, Zhang J, et al. Lipoxin A4 inhibits the production of proinflammatory cytokines induced by β -amyloid in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 May 13;408(3):382-7.
138. Pamplona FA, Menezes-de-Lima O Jr, Takahashi RN. Aspirin-triggered lipoxin induces CB1-dependent catalepsy in mice. *Neurosci Lett*. 2010 Feb 5;470(1):33-7.
139. Medeiros R, Kitazawa M, Passos GF, Baglietto-Vargas D, Cheng D, Cribbs DH, et al. Aspirin-triggered lipoxin A4 stimulates alternative activation of microglia and reduces Alzheimer disease-like pathology in mice. *Am J Pathol*. 2013 May;182(5):1780-9.
140. Wang YP, Wu Y, Li LY, Zheng J, Liu RG, Zhou JP, et al. Aspirin-triggered lipoxin A4 attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses by inhibiting activation of NF- κ B and MAPKs in BV-2 microglial cells. *J Neuroinflammation*. 2011 Aug 10;8:95.
141. Wu Y, Zhai H, Wang Y, Li L, Wu J, Wang F, et al. Aspirin-triggered lipoxin A₄ attenuates lipopolysaccharide-induced intracellular ROS in BV2 microglia cells by inhibiting the function of NADPH oxidase. *Neurochem Res*. 2012 Aug;37(8):1690-6.

142. Yao C, Yang D, Wan Z, Wang Z, Liu R, Wu Y, et al. Aspirin-triggered lipoxin A4 attenuates lipopolysaccharide induced inflammatory response in primary astrocytes. *Int Immunopharmacol*. 2014 Jan;18(1):85-9.
143. Yu SY, Zhang XY, Wang XR, Xu DM, Chen L, Zhang LH, et al. Cysteinyl leukotriene receptor 1 mediates LTD4-induced activation of mouse microglial cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin*. 2014 Jan;35(1):33-40.
144. Zhang XY, Chen L, Yang Y, Xu DM, Zhang SR, Li CT, et al. Regulation of rotenone-induced microglial activation by 5-lipoxygenase and cysteinyl leukotriene receptor 1. *Brain Res*. 2014 Jul 14;1572:59-71.
145. Corser-Jensen CE, Goodell DJ, Freund RK, Serbedzija P, Murphy RC, Farias SE, et al. Blocking leukotriene synthesis attenuates the pathophysiology of traumatic brain injury and associated cognitive deficits. *Exp Neurol*. 2014 Jun;256:7-16.
146. Tang SS, Wang XY, Hong H, Long Y, Li YQ, Xiang GQ, et al. Leukotriene D4 induces cognitive impairment through enhancement of CysLT₁ R-mediated amyloid- β generation in mice. *Neuropharmacology*. 2013 Feb;65:182-92.
147. Nemzek JA, Hugunin KM, Opp MR. Modeling Sepsis in the Laboratory: Merging Sound Science with Animal Well-Being. *Comparative Medicine*. 2008;58(2):120-128.
148. Haley TJ, McCormick WG. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Br J Pharmacol Chemother*. 1957 Mar;12(1):12-5.
149. Laursen SE, Belknap JK. Intracerebroventricular injections in mice: Some methodological refinements. *J Pharmacol Methods*. 1986 Dec;16(4): 355–357.
150. Leo LM, Pamplona FA. Elevated Plus Maze Test to Assess Anxiety-like Behavior in the Mouse. *Bio-protocol*. 2014 Aug;4(16): e1211.
151. Rodgers RJ, Evans PM, Murphy A. Anxiogenic profile of AM-251, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in plus-maze-naïve and plus-maze-experienced mice. *Behav Pharmacol*. 2005 Sep;16(5-6):405-13.
152. Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*. 1990;46(3):321-40.
153. Czech DA. A simple integrated circuit device for measuring distances traveled and determining speed in open-field environments. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002 May;72(1-2):73-5.

154. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003 Feb 28;463(1-3):3-33.
155. Pamplona FA, Pandolfo P, Duarte FS, Takahashi RN, Prediger RD. Altered emotionality leads to increased pain tolerance in amyloid beta (Abeta1-40) peptide-treated mice. *Behav Brain Res*. 2010 Sep 1;212(1):96-102.
156. Crocker AD, Russell RW. The up-and-down method for the determination of nociceptive thresholds in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1984 Jul;21(1):133-6.
157. Bluthé RM, Walter V, Parnet P, Layé S, Lestage J, Verrier D, et al. Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *C R Acad Sci III*. 1994 Jun;317(6):499-503.
158. Martel G, Jaffard R, Guillou JL. Identification of hippocampus-dependent and hippocampus independent memory components in step-down inhibitory avoidance tasks. *Behav Brain Res*. 2010 Feb 11;207(1):138-43.
159. Cammarota M, Bevilacqua LR, Kerr D, Medina JH, Izquierdo I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. *J Neurosci*. 2003 Feb 1;23(3):737-41.
160. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76-85.
161. Silva JM, McMahon M. The fastest Western in town: a contemporary twist on the classic Western blot analysis. *J Vis Exp*. 2014 Feb 5;(84):e51149.
162. Rivera P, Arrabal S, Cifuentes M, Grondona JM, Pérez-Martín M, Rubio L, et al. Localization of the cannabinoid CB1 receptor and the 2-AG synthesizing (DAGL α) and degrading (MAGL, FAAH) enzymes in cells expressing the Ca(2+)-binding proteins calbindin, calretinin, and parvalbumin in the adult rat hippocampus. *Front Neuroanat*. 2014 Jun 27;8:56.
163. Svensson CI, Zattoni M, Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin inhibit inflammatory pain processing. *J Exp Med*. 2007 Feb 19;204(2):245-52.
164. Sun T, Yu E, Yu L, Luo J, Li H, Fu Z. LipoxinA(4) induced antinociception and decreased expression of NF- κ B and pro-inflammatory cytokines after chronic dorsal root ganglia compression in rats. *Eur J Pain*. 2012 Jan;16(1):18-27.

165. Lin CH, Yeh SH, Lu HY, Gean PW. The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. *J Neurosci*. 2003 Sep 10;23(23):8310-7.
166. Ozaita A, Puighermanal E, Maldonado R. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J Neurochem*. 2007 Aug;102(4):1105-14.
167. Chu J, Praticò D. The 5-lipoxygenase as a common pathway for pathological brain and vascular aging. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2009;2009:174657.
168. Chinnici CM, Yao Y, Praticò D. The 5-lipoxygenase enzymatic pathway in the mouse brain: young versus old. *Neurobiol Aging*. 2007 Sep;28(9):1457-62.
169. Manev H, Uz T, Sugaya K, Qu T. Putative role of neuronal 5-lipoxygenase in an aging brain. *FASEB J*. 2000 Jul;14(10):1464-9.
170. Martelli D, McKinley MJ, McAllen RM. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a critical review. *Auton Neurosci*. 2014 May;182:65-9.
171. Abel T, Lattal KM. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol*. 2001 Apr;11(2):180-7.
172. Bian Y, Zhao X, Li M, Zeng S, Zhao B. Various roles of astrocytes during recovery from repeated exposure to different doses of lipopolysaccharide. *Behav Brain Res*. 2013 Sep 15;253:253-61.
173. Bergamaschi MM, Queiroz RH, Chagas MH, de Oliveira DC, De Martinis BS, Kapczinski F, et al. Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naïve social phobia patients. *Neuropsychopharmacology*. 2011 May;36(6):1219-26.
174. Lee MC, Ploner M, Wiech K, Bingel U, Wanigasekera V, Brooks J. et al. Amygdala activity contributes to the dissociative effect of cannabis on pain perception. *Pain*. 2013 Jan;154(1):124-34.
175. Roitman P, Mechoulam R, Cooper-Kazaz R, Shalev A. Preliminary, open-label, pilot study of add-on oral Δ^9 -tetrahydrocannabinol in chronic post-traumatic stress disorder. *Clin Drug Investig*. 2014 Aug;34(8):587-91.
176. Moreira FA, Lutz B. The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol*. 2008 Jun;13(2):196-212.