

Pedro Augusto Lopes Tito

Respostas inflamatórias e comportamentais ao uso de canabidiol em um modelo de *sickness behavior* induzido por lipopolissacáride

Belo Horizonte - MG

2016

Pedro Augusto Lopes Tito

Respostas inflamatórias e comportamentais ao uso de canabidiol em um modelo de *sickness behavior* induzido por lipopolissacáride

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Helton José dos Reis

Co-orientador: Prof. Antônio Carlos Pinheiro Oliveira

Belo Horizonte – MG

2016

Tito, Pedro Augusto Lopes.

043 Respostas inflamatórias e comportamentais ao uso de canabidiol em um modelo de sickness behavior induzido por lipopolissacáride [manuscrito] / Pedro Augusto Lopes Tito. - 2016.

96 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Helton José dos Reis. Co-orientador: Prof. Antônio Carlos Pinheiro Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Transtorno depressivo maior. 2. Comportamento de doença. 3. Canabidiol.
4. Neurociências - Teses. I. Reis, Helton José dos. II. Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8

Agradecimentos

Ao Professor Helton José Reis pelo incentivo, paciência, confiança depositada e, principalmente, pela amizade durante esses anos de convivência.

Ao Professor Antônio Carlos de Oliveira pelo suporte, orientação e pelas (muitas) sugestões dadas durante toda a execução desse trabalho.

Aos Professores Fabrício Moreira, Fabíola Ribeiro e Luciene pelo suporte técnico/teórico e pela boa convivência.

Aos meus pais pelas excelentes oportunidades que se esforçaram para me dar e pelo apoio e incentivo durante a realização dos meus sonhos. Em especial, agradeço à minha mãe pela enorme ajuda na organização da biblioteca de referências.

Ao grande amigo e colega de laboratório e profissão Túlio C. S. Bernardino pelos anos de convivência vividos (e pelos que virão) e pelo imensurável apoio no planejamento e execução de vários experimentos do presente estudo.

À minha namorada e colega de laboratório Toniana Carvalho pelo enorme carinho, apoio, compreensão e, também, pelas discussões de resultados e sugestões dadas no presente trabalho.

Às amigas e doutoras Érica Vieira, Natália Rocha e Aline Miranda, pela disponibilidade e excepcional auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos colegas de laboratório e colaboradores, principalmente Paula, Isabel, Tadeu e Fátima, pela boa convivência e auxílios e, em especial, aos não só colegas mas companheiros de projeto Larissa Ribeiro, Gabriel Vinícius e Sara Ribeiro pela grande colaboração na realização desse trabalho.

Aos colegas do RNAi e Neurobioquímica, que sempre me receberam com gosto (no trabalho e nas comemorações) e auxiliaram no uso dos equipamentos.

Aos colegas do CEBIO pela extensa colaboração.

A UFMG e ICB pelo ensino de excelente qualidade, na graduação e na pós-graduação, que viabilizou a realização desse trabalho e para todos os outros que eu não tenha citado, mas que contribuíram de alguma forma nessa caminhada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias intracelulares envolvidas na sinalização dos receptores para citocinas no SNC. Adaptado de McCusker et al.(Mccusker e Kelley, 2013)	28
Figura 2: Desenho experimental do teste Burrowing.....	41
Figura 3: Desenho experimental do Teste do Nado Forçado.....	42
Figura 4: Padronização do Burrowing..	47
Figura 5: Curva dose-resposta no teste Burrowing do canabidiol..	48
Figura 6: Desempenho no Burrowing do modelo SB com o tratamento com canabidiol em diferentes doses..	48
Figura 7: Expressão de IL-1 β no modelo de SB com LPS 0,11 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD.....	51
Figura 8: Padronização do modelo SB para o teste do nado forçado.	52
Figura 9: Padronização do modelo SB para o teste do nado forçado com 10 dias de isolamento prévios à injeção de LPS..	53
Figura 10: Curva dose-resposta no FST do canabidiol no teste do nado forçado.....	54
Figura 11: Efeito do tratamento com CBD 30mg/kg sobre o modelo de SB no teste do nado forçado.	55
Figura 12: Efeito do tratamento com CBD 30mg/kg sobre o modelo de SB no teste de campo aberto.	56
Figura 13: Expressão de IL-1 β no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD.....	59
Figura 14: Expressão de IFN γ no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD.....	60
Figura 15: Expressão de IL-2 no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD.....	61
Figura 16: Expressão de IL-4 no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD.....	62
Figura 17: Expressão de IL-6 no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD.....	63
Figura 18: Expressão de IL-10 no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD.....	64

Figura 19: Expressão de TNF no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD.....	65
Figura 20: Expressão de NGF e BDNF no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Curva dose-resposta do CBD sobre IL-1 β no HT, CPF, HC e EST.....	49
Tabela 2: Curva dose-resposta do CBD sobre as citocinas no HT, CPF, HC e EST.	57
Tabela 3: Curva dose-resposta do CBD sobre BDNF e NGF no CPF e HC.	66

LISTA DE SIGLAS

2-AG: 2-aracnodoil glicerol

5-HT: serotonina

5-HTT: transportador de serotonina

Δ -9-THC: Δ -9-tetraidrocanabinol

AEA: anandamida

APC: células apresentadoras e antígeno

AQr: ácido quinureninico

AQl: ácido quinolínico

BCG: bacilo de Calmette-Guérin

BHE: barreira hemato-encefálica

BUR: *burrowing*

BDNF: *brain derived neurotrophic factor*

CB: canabinóides

CB1r: receptores canabinóides tipo 1

CB2r: receptores canabinóides tipo 2

CBD: canabidiol

CEBIO: centro de bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas

CEUA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

COX-2: ciclooxigenase 2

CREB: *cAMP Response Element-Binding*

DA: dopamina

DSMV: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th Edition*

ECb: endocanabinóide

ECL: estresse crônico leve

FAAH: *Fatty Acid Amine Hidrolase*

FST: teste do nado forçado

GPR55: receptor acoplado a proteína G 55

HIV: *Human Immunodeficiency Virus*

HPA: hipotálamo-pituitária-adrenal

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IDO: indolamina 2,3 dioxigenase

IFN: interferon

IL: interleucina

IL-1r1: receptores de IL-1B tipo 1

IL-1ra: antagonista de receptor IL-1B

ISRNS: inibidores seletivos de recaptação de serotonina-noradrenalina

ISRS: inibidores seletivos de recaptação de serotonina

KO: *knockout*

LPS: lipopolissacáride

LTP: *long term potential*

MAGL: monoacilglicerol lipase

NA: noradrenalina

NAPE-PLD: *N-acyl phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D*

NAT: N-acetiltransferase

NFkB: Fator nuclear kappa B

NGF: *nerve growth factor*

NMDAr: N-metil D-aspartato receptor

NO: óxido nítrico

PCR: proteína C reativa

QA: quinurenina

RNAm: RNA mensageiro

SB: *Sickness behavior*

SNC: sistema nervoso central

TDM: transtorno depressivo maior

TLR: *toll like receptors*

TNF: *tumor necrosis factor*.

TNFr1: receptor tipo 1 de TNF

TNFr2: receptor tipo 2 de TNF

TST: teste da suspensão pela cauda

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE SOLUÇÕES E REAGENTES

Soluções utilizadas no ELISA E CBA

TAMPÃO FOSFATO

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,89 g

Ajustar para 1 L de H₂O destilada

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO DE CITOCINAS

CONSTITUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO FINAL
NaCl	0,4 M
Tween 20	0,05%
BSA bovino	0,5%
Cloreto de benzetônio	0,1 mM
Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF)	0,1 mM

Ajustar para 100 mL de solução EDTA (10mM; 20UI de aprotinina) preparada a partir do tampão fosfato

PBS

CONSTITUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO FINAL
KH ₂ PO ₄	1,5mM
KCl	2,7mM
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	8,1 mM
NaCl	137mM

Ajustar para 1,5 L de solução com H₂O destilada e pH para 7,4

COATING BUFFER

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
--------------	------------

NaHCO ₃	8,4 g
SDS	5,8 g

Ajustar para 1 L de solução com H₂O destilada e pH para 9,6

TAMPÃO DE LAVAGEM

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
PBS	1,0L
Tween 20	0,1%

TAMPÃO DE BLOQUEIO

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
PBS	20 mL
BSA	200 mg

DILUENTE DAS AMOSTRAS

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
PBS	40 mL
BSA	40 mg

TAMPÃO CITRATO

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
NaH ₂ PO ₄	13,41 g
Ácido Cítrico	5,19 g

Ajustar para 1 L com H₂O destilada e pH para 5,0

SOLUÇÃO SUBSTRATO

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
Tampão Citrato	10 mL

OPD	4 mg
H2O2 (30v/v)	3 µL

SOLUÇÃO STOP

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
HCl	1 M

Sumário

ABSTRACT	15
RESUMO	16
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR	15
1.1.1 <i>Inflamação e depressão</i>	18
1.2 SICKNESS BEHAVIOR	22
1.2.1 <i>Sickness Behavior: alterações comportamentais</i>	22
1.2.2 <i>Sickness Behavior: fisiopatologia</i>	23
1.2.3 <i>Sickness Behavior: citocinas e neurotransmissão serotoninérgica</i>	28
1.2.4 <i>Sickness Behavior: citocinas, serotonina e neuroplasticidade</i>	30
1.3 O SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E OS CANABINÓIDES EXÓGENOS	32
1.3.1 <i>O Sistema ECb e os Transtornos Depressivos</i>	34
1.3.2 <i>O Canabidiol</i>	35
2. OBJETIVOS	38
2.1. GERAL.....	38
2.2. ESPECÍFICOS	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. MATERIAL E MÉTODOS DOS TESTES COMPORTAMENTAIS	39
3.1.1. <i>C57BL/6</i>	39
3.1.2. <i>Drogas e lipopolissacáride</i>	39
3.1.3 <i>Teste Burrowing</i>	40
3.1.4 <i>Teste do Nado Forçado</i>	41
3.1.5 <i>Teste do Campo Aberto</i>	43
3.1 MÉTODOS BIOQUÍMICOS	44
3.1.1 <i>ELISA</i>	44
3.1.2 <i>Cytometric Bread Array® (CBA)</i>	45
3.1.1 <i>Análise estatística</i>	46
4 RESULTADOS	47
4.1 BURROWING	47
4.1.1 <i>CBD 3 mg/kg diminuiu a expressão de IL-1β no córtex pré-frontal</i>	49
4.1.2 <i>CBD não alterou a expressão de IL-1β no modelo de SB com 0,11 mg/kg de LPS</i>	49
4.2 TESTE DO NADO FORÇADO (FST)	52
4.2.1 <i>Curva dose-resposta do CBD sobre as citocinas inflamatórias</i>	56

4.2.2	<i>CBD 30 mg/kg reduziu os níveis de IL-1β do modelo de SB no hipocampo e aumentou no estriado</i>	58
4.2.3	<i>Não houve diferença na expressão de IFNγ pelo modelo SB ou no tratamento com CBD.....</i>	59
4.2.4	<i>Não houve diferença na expressão de IL-2 pelo modelo SB ou no tratamento com CBD.....</i>	61
4.2.5	<i>Não houve diferença na expressão de IL-4 pelo modelo SB ou no tratamento com CBD.....</i>	62
4.2.6	<i>O modelo SB aumentou a expressão de IL-6 que foi revertida pelo tratamento com CBD.....</i>	63
4.2.7	<i>O modelo SB reduziu a expressão de IL-10 no CPF</i>	64
4.2.8	<i>CBD 30 mg/kg reduziu os níveis de TNF do modelo de SB no hipocampo</i>	65
4.2.9	<i>Curva dose-resposta do CBD sobre a síntese de NGF e BDNF.....</i>	66
4.2.10	<i>O modelo de SB aumentou a expressão de fatores neurotróficos no hipocampo e o tratamento com CBD reverteu essa alteração.</i>	66
5	DISCUSSÃO	68
5.1	<i>O MODELO SICKNESS BEHAVIOR E OS TESTES COMPORTAMENTAIS</i>	68
5.2	<i>O MODELO SICKNESS BEHAVIOR E A ALTERAÇÃO NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS</i>	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.2	<i>O CANABIDIOL COMO CANDIDATO ANTIDEPRESSIVO.....</i>	76
5.3	<i>O ENVOLVIMENTO DOS FATORES NEUROTRÓFICOS COM O SICKNESS BEHAVIOR</i>	78
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
7	REFERÊNCIAS	82

Abstract

The Major Depressive Disorder (TDM) affects millions of peoples worldwide, with an annual prevalence estimated between 5 e 9%. Nevertheless, treatment options available has a relative low efficacy, which can be comprehended by the restrict knowledge over the physiopathology of the disease. Recently, several evidences have arisen concerning the role of the immune signaling over the development of TDM. Different animal models are employed in order to reproduce distinct aspects of the disorder, such as Sickness Behavior (SB) model induced by lipopolysaccharide (LPS). Simultaneously, development of new drugs tries to take benefit from these new physiopathology propositions and the endocannabinoid system modulators are an example. Recently discovered and described, this system is active in several brain areas and it is implicated in many intracellular pathways in order to modulate neurotransmission. In this context, we intend to reproduce the SB model and its behavioral features and evaluate the response of the model to a cannabidiol trial. Using LPS, two models of sickness behavior were generated: one with a lower dose (0.11 mg/kg) and another with a higher dose (0.83 mg/kg). Although the lower dose model had a decreased burrow behavior in the burrowing test, the treatment with cannabidiol (CBD) have not restored this behavior to baseline. On the other hand, CBD was able restore the alteration in the forced swimming test (FST) in the later. In this model, IL-6 levels in hypothalamus (HT), pre-frontal cortex (CPF) and hippocampus (HC) were increased in SB and were restored to baseline in CPF and HC. We have also shown a decreased IL-1 β and TNF production in CBD treated mice in HC. Although animal models are useful tools to human diseases study, it is hard to reproduce all the disease characteristics. The FST has a good predictive validity, making it useful to foresee antidepressants candidates. Applying the SB as an immune model of TDM, increases the specificity of the analysis, restricting the therapeutic effects within the set of alterations defined by the model.

Keywords: C57BL/6; Sickness Behavior; forced swimming test; burrowing; cannabidiol; cytokines; neurotrophic factors.

Resumo

O transtorno depressivo maior (TDM) acomete milhões de pessoas em todo o mundo, com uma prevalência anual média estimada entre 5 e 9%. No entanto, os tratamentos disponíveis possuem uma eficácia relativamente baixa, o que pode ser explicado pelo restrito conhecimento acerca dos processos fisiopatológicos envolvidos. Recentemente, várias evidências têm apontado distúrbios da sinalização imune como contribuidores do quadro. Modelos animais são empregados como tentativas de reproduzir diferentes aspectos do transtorno e, dentre esses, o *Sickness Behavior* (SB) induzido por lipopolissacáride (LPS) destaca-se no âmbito inflamatório. Paralelamente, o desenvolvimento de novos alvos fármacos tentam se beneficiar das recentes descobertas sobre a fisiopatologia da doença, dentre as quais estão os moduladores do sistema endocanabinóide (SeCB). Recentemente descrito, o SeCB é expresso em diversas regiões do SNC e interage com várias vias de sinalização intracelulares, com finalidade principalmente moduladora sobre a expressão de neurotransmissores. Nesse contexto, nos propusemos a reproduzir um modelo de SB e suas características comportamentais e avaliar a resposta desse ao canabidiol (CBD). Dois modelos de SB foram gerados utilizando LPS: o modelo de baixa dose (0,11mg/kg) e o de alta dose (0,83 mg/kg). Apesar da redução na quantidade de ração escavada no teste *Burrowing*, o tratamento com CBD não reverteu essa alteração. Por outro lado, no teste do nado forçado (FST) o tratamento com CBD foi eficaz em restaurar a alteração induzida pelo SB. Nesse último, um aumento da expressão de IL-6 no hipotálamo, córtex pré-frontal e hipocampo foi percebida com a indução do SB e o tratamento com CBD reverteu os níveis para a linha de base no córtex pré-frontal e hipocampo. Adicionalmente, o CBD reduziu a expressão de IL-1 β and TNF no hipocampo no modelo de alta dose. Apesar de modelos animais serem ferramentas úteis para o estudo de doenças humanas, reproduzir todas as características da doença é uma tarefa árdua. O FST possui uma boa validade preditiva, tornando-o útil na previsão de candidatos a drogas antidepressivas. O emprego de um modelo de TDM aumenta a especificidade dos achados, restringindo os efeitos terapêuticos a um conjunto de alterações já estabelecidas pelo modelo.

Palavras-chave: C57BL/6; Sickness Behavior; teste do nado forçado; burrowing; canabidiol; citocinas; fatores neurotróficos.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtorno Depressivo Maior

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é um dos mais frequentes transtornos psiquiátricos na população geral, com uma prevalência ao longo da vida estimada em 17% e a prevalência anual variando entre 5-9% (Mrazek *et al.*, 2014), afetando aproximadamente 121 milhões de pessoas ao redor do mundo (Prins *et al.*, 2011). Segundo a OMS (Greden, 2001; Global Burden of Hepatitis, 2004), o TDM é uma das doenças mais danosas a sociedade devido a diminuição da qualidade de vida imposta, a maior utilização dos serviços de saúde e aos custos diretos e indiretos associados. O diagnóstico do transtorno já constitui uma barreira inicial importante, uma vez que cerca de 50% dos casos podem não ser diagnosticados por médicos não especialistas (Mitchell *et al.*, 2009). Adicionalmente, cerca de metade dos pacientes não atingem remissão completa com o tratamento inicial instituído e desses cerca de 30-50% não respondem ao mesmo (Greden, 2001; Nierenberg e Dececco, 2001; Fava *et al.*, 2006; Nemeroff, 2007; Bares *et al.*, 2008). Esses pacientes resistentes ao tratamento, definidos pela não melhora após um ou mais ciclos terapêuticos de 6 meses com doses adequadas, são responsáveis pela maior parte do ônus estimado para a doença (Mrazek *et al.*, 2014).

Apesar dos grandes impactos sanitários e socioeconômicos associados a essa morbidade, pouco se compreende sobre a sua fisiopatologia (Nestler *et al.*, 2002; Krishnan e Nestler, 2008; Kohler *et al.*, 2016). Atualmente são descritos vários fatores de risco para o desenvolvimento dessa morbidade. Kendler e colaboradores (Kendler *et al.*, 2002; 2006), baseados na análise de 18 parâmetros em gêmeos monozigóticos, levantaram como principais fatores de risco diretos para o desenvolvimento de TDM os fatores genéticos, neuroticismo, transtornos de ansiedade antes dos 18 anos, transtornos de conduta durante a infância/puberdade, história pregressa de transtorno depressivo, problemas conjugais e eventos estressantes (pessoais ou de pessoas próximas) no último ano. Alguns parâmetros, embora não contribuam diretamente, predispõem a ocorrência dos fatores de risco, como abuso ou dependência de substâncias químicas, abuso sexual na infância ou óbito parental.

Para o diagnóstico, além do levantamento dos fatores de risco, são utilizados os critérios diagnóstico do TDM definidos pelo *Diagnostic and Statistical Manual of*

Mental Disorders V (DSM-V). Segundo esses critérios, a presença de humor deprimido e/ou anedonia aliada a pelo menos quatro sintomas adicionais de depressão por pelo menos 2 semanas define o diagnóstico (DSMV). Relativamente conservado em relação à edição anterior do DSM, o diagnóstico da doença depende fortemente de um conjunto de sintomas extremamente variável e não é alicerçado por evidências neurobiológicas objetivas (Nestler *et al.*, 2002). Alguns autores (Horwath *et al.*, 1992; Lamers *et al.*, 2010; Gold, 2015) adotam uma divisão da manifestação da doença em dois subtipos clinicamente distintos: o melancólico e o atípico. O TDM melancólico é representado pela perda do apetite e do peso, insônia e agitação psicomotora enquanto o TDM atípico é caracterizado pelo aumento do apetite, ganho ponderal, fadiga, hipersonia e retardo psicomotor. Além dos sintomas, outras manifestações comuns ao subtipo melancólico incluem ansiedade, hiposensibilidade a estímulos externos, aumento da atividade simpática e hiperativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Prins *et al.*, 2011). Em relação ao subtipo atípico, se associam o aumento da sensibilidade ao ambiente, a menor ativação simpática e a inibição do eixo HHA, esse último implicando aumento da atividade imunológica (Prins *et al.*, 2011).

Atualmente, várias classes de drogas são utilizadas na terapêutica dos transtornos depressivos. Geralmente, a abordagem se baseia na utilização dos Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS) e Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina-Noradrenalina (ISRSN) (Bentley *et al.*, 2014). No entanto, os primeiros fármacos antidepressivos não foram desenvolvidos com essa proposta terapêutica e esse efeito foi uma descoberta casual da iproniazida e da imipramina na década de 50 (Kohler *et al.*, 2016). Desde a então, o envolvimento dos circuitos neurais serotoninérgicos e das monoaminas assumiu papel central na etiopatogênese da depressão, o que culminou com o desenvolvimento e lançamento dos primeiros ISRS na década de 80. Embora inicialmente promissores pela maior seletividade de atuação e menor taxa de efeitos colaterais a eficácia terapêutica não se alterou muito em relação aos tricíclicos. Os recentes ISRS e ISRSN e os clássicos antidepressivos tricíclicos possuem a mesma eficácia, com uma taxa de resposta (melhora superior a 50% dos sintomas) em torno de 60-70% entre os pacientes com TDM, com melhor evidência nos mais gravemente enfermos (Bentley *et al.*, 2014).

Face a eficácia relativamente baixa do tratamento do transtorno associado à gravidade das consequências sociais e individuais, o levantamento dos processos etiológicos e fisiopatológicos adquire importância. Apesar de mal compreendida, sabe-se que a etiologia do quadro é multifatorial, e sua fisiopatologia envolve fatores de risco genéticos e alterações nos circuitos de vários neurotransmissores, na expressão de mediadores inflamatórios e na síntese de fatores neurotróficos. O envolvimento de muitos fatores de risco externos, vários mecanismos fisiopatológicos e critérios diagnósticos essencialmente clínicos dificultam a elaboração de uma hipótese fisiopatológica única.

1.1.1 Inflamação e os transtornos depressivos.

Durante os anos 80 evidências colocaram em cheque o paradigma de que o cérebro seria um órgão imunoprivilegiado, ao apontar interações entre os sistemas nervoso, imune e endócrino (Schiepers *et al.*, 2005). Em seguida, vários estudos começaram a apontar alterações desta interação tríplice também em processos patológicos, como nos transtornos do estresse pós-traumático, bipolar e depressivos (Jones e Thomsen, 2013). Maes, em 1999 (Maes *et al.*, 1999), propôs o “Modelo da Resposta do Sistema Inflamatório na Depressão”, que considerou o transtorno depressivo uma morbidade psiconeuroimunológica, responsabilizando os mediadores inflamatórios por várias alterações comportamentais, neuroendócrinas e neuroquímicas descritas no TDM. Em seguida, vários autores associaram o fenômeno inflamatório aos transtornos depressivos embasados, principalmente, nos seguintes grupos de evidências: (1) níveis aumentados de marcadores inflamatórios em pacientes com TDM sem comorbidades; (2) a depressão sendo uma comorbidade de paciente com doenças inflamatórias crônicas e (3) tratamentos com base em citocinas aumentam o risco de desenvolvimento de transtornos depressivos (Krishnadas e Cavanagh, 2012; Patel, 2013).

Vários mediadores inflamatórios foram apontados como possíveis marcadores para depressão maior, tais como a proteína C reativa (PCR), as interleucinas (IL) IL-1 β , IL-2, IL-6, e as citocinas interferon γ (INF- γ) e o fator de necrose tumoral (TNF) (Muller *et al.*, 2011; Jones e Thomsen, 2013). Os níveis séricos de PCR encontram-se aumentados nesses pacientes e estão correlacionados com a severidade do transtorno de humor (Hafner *et al.*, 2008; Muller *et al.*, 2011). A PCR mostrou-se, também, como marcador para alterações cognitivas da depressão (Muller *et al.*, 2011). De maneira semelhante, as concentrações séricas de TNF e IL-6 apresentaram-se aumentadas nos pacientes diagnosticados com TDM em comparação com indivíduos controle em duas meta análises (Dowlati *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012) e correlacionaram-se positivamente com a severidade do quadro (Muller *et al.*, 2011). A IL-6 mostrou-se ainda associada à resistência ao tratamento com antidepressivos (Yoshimura *et al.*, 2009). Além disso, na meta-análise publicada por Hannestad e colaboradores comparando os efeitos do tratamento com antidepressivos entre respondedores e não respondedores clínicos, demonstrou redução na concentração

sérica de IL-6 e TNF nos pacientes submetidos a ISRS. (Hannestad *et al.*, 2011). Esses resultados sugerem que a alteração nos níveis dessas citocinas não são uma consequência do quadro psiquiátrico e podem atuar na etiopatogênese do quadro (Hannestad *et al.*, 2011). Embora as concentrações séricas de IL-1 β apresentem resultados conflitantes em meta-análises (Howren *et al.*, 2009; Dowlati *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012), é aceito por alguns autores que a mesma esteja aumentada, uma vez que sua dosagem possui limitações pela geralmente baixa concentração sérica encontrada, visto que sua ação é principalmente pela via parácrina (Howren *et al.*, 2009; Jones e Thomsen, 2013). Ainda assim, o tratamento com antidepressivos foi capaz de reduzir os níveis séricos periféricos dessa interleucina, independente da categoria da droga empregada (Hannestad *et al.*, 2011). A maioria dos estudos não aponta diferenças entre pacientes com TDM e controles em relação à concentração sérica de IFN- γ . (Dowlati *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). No entanto, ao dividir os pacientes baseado nos subtipos melancólicos e não melancólicos, houve menor produção de IFN γ no grupo melancólico, que diferiu significativamente do controle e do grupo atípico num estudo longitudinal com 43 pacientes (Rothermundt *et al.*, 2001; Dowlati *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). Poucos estudos compararam a produção de IL-10, uma interleucina anti-inflamatória, e não foram encontradas diferenças nos acometidos por TDM de maneira geral (Dowlati *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012), embora os pacientes melancólicos exibissem menores concentrações de IL-10 quando comparados com os quadros atípicos e os indivíduos controle.(Rothermundt *et al.*, 2001).

As alterações produzidas pelo tratamento farmacológico da depressão reforçam o envolvimento desses marcadores inflamatórios na fisiopatologia dessa doença. Vários grupos (Sluzewska *et al.*, 1995; Frommberger *et al.*, 1997; Tuglu *et al.*, 2003) demonstraram redução das concentrações séricas de IL-6 e TNF em pacientes com diagnóstico de depressão tratados com ISRS. Além disso, mais recentemente foi demonstrado melhor resposta clínica com o uso simultâneo de inibidores seletivos de ciclooxigenase-2 (COX-2) e reboxetina, um inibidor seletivo da receptação de noradrenalina, reforçando o envolvimento inflamatório na fisiopatologia do TDM (Muller *et al.*, 2006).

Pacientes portadores de condições médicas crônicas possuem incidência de transtornos depressivos de 5 a 10 vezes maior que na população geral, exercendo

grande impacto no prognóstico desses pacientes. Os portadores de condições autoimunes são ainda mais afligidos, alcançando incidência de 50% para TDM em esclerose múltipla, por exemplo, cujas taxas de tentativas de autoextermínio alcançam 15% (Lo Fermo *et al.*, 2010). Um grande estudo longitudinal conduzido na Dinamarca (Benros *et al.*, 2013), com cerca de 27.000 pacientes portadores de doenças autoimunes sem outras comorbidades, apontou um aumento da incidência de transtorno depressivo de 1,45 vezes em relação aos controles não portadores. Algumas condições estão associadas a um aumento ainda maior, como hepatite autoimune (IRR 2,28), lúpus eritematoso sistêmico (IRR 2,16) e anemia hemolítica autoimune (2,53). A presença de comorbidade infecciosa a qualquer portador de doença autoimune associava-se a um risco ainda maior (IRR 1,62) (Benros *et al.*, 2013). Essa associação com depressão ocorre mesmo em condições cuja inflamação não desempenha um papel primário na fisiopatologia, tais como câncer, doença coronariana, acidentes vasculares encefálicos e epilepsia (Krishnadas e Cavanagh, 2012).

O emprego de citocinas como INF ou de IL-2 na imunoterapia de doenças, como hepatite C, HIV, melanoma e carcinoma hepatocelular, está relacionado com um aumento da prevalência de TDM nesses pacientes quando comparados com controles em outras modalidade de tratamento (Krishnadas e Cavanagh, 2012; Jones e Thomsen, 2013), variando entre 23-45% nos estudos prospectivos (Asnis e De La Garza, 2006; Lucaciu e Dumitrascu, 2015). Em termos clínicos, a administração de INF- α , IL-2 ou TNF está associada a humor deprimido, perda de peso, insônia, retardo psicomotor, redução da concentração e confusão (Meyers, 1999) e geralmente melhoram pouco tempo após o término da administração. Esse estado depressivo induzido por INF α responde ao tratamento com antidepressivos tradicionais (Raison *et al.*, 2006). O emprego de INF- α , induz a síntese de outras citocinas inflamatórias, tais como IL-6, TNF e IL-1 β , que também se encontram em níveis aumentados em pacientes deprimidos, como demonstrado anteriormente (Asnis e De La Garza, 2006). Assim como no tratamento com citocinas pró inflamatórias, a administração de lipopolissacáride (LPS), um componente da parede celular de bactérias e importante ativador da resposta imune inata, em voluntários sadios induzia a um humor deprimido associado a períodos de ansiedade e déficits de memória (Yirmiya *et al.*, 2000;

Schedlowski *et al.*, 2014). Esses efeitos indicaram um modelo potencial para estudo dessa interação inflamação-transtornos depressivos.

1.2 *Sickness Behavior*

Definido como o conjunto de alterações psicológicas e comportamentais associadas a uma resposta febril e neuroendócrina frente a um desafio infeccioso (Dantzer, 2006; Maes *et al.*, 2012), o *Sickness Behavior* (SB) guarda grandes semelhanças com as alterações vistas no transtorno depressivo (Maes *et al.*, 2012). Essa estratégia adaptativa é caracterizada por alterações comportamentais compartilhadas com o TDM (melancólico, principalmente) como letargia, perda da concentração, desinteresse social, anedonia, sonolência, anorexia e perda de peso ao mesmo passo que possui alterações não completamente compartilhadas como hiperalgesia e pirexia (Maes *et al.*, 2012).

1.2.1 *Sickness Behavior*: alterações comportamentais

O SB pode ser induzido através da administração isolada de algumas citocinas, como IL-1 β ou TNF, ou através de indutores de resposta imune, como o LPS, o bacilo de Calmette-Guérin (BCG), *Salmonella typhi* (Capuron e Miller, 2011) ou o Poly:1C (Gibney *et al.*, 2013). Em animais, alguns testes comportamentais podem ser empregados para aferir essas alterações, e alguns desses muito se assemelham com o comportamento deprimido (Frenois *et al.*, 2007). Dentre esses testes, podemos citar o teste do consumo de sacarose (De La Garza, 2005), o nado forçado (FST) ou a suspensão pela cauda (TST), conforme revisado por Dantzer e Capuron (Dantzer *et al.*, 2008; Capuron e Miller, 2011). Outros comportamentos menos frequentemente avaliados incluem o interesse social dos animais, o consumo de alimentos (Dantzer *et al.*, 1998) e a atividade locomotora (Kent *et al.*, 1992).

Descrito em 1977 por Porsolt e colaboradores (Porsolt *et al.*, 1977), o FST é um dos parâmetros mais utilizados no mundo para a avaliação de comportamento depressivo-símile (Micale *et al.*, 2013). O baixo custo, facilidade de interpretação, alta taxa de reprodutibilidade e boa validade preditiva justificam seu amplo uso. Durante uma sessão, são quantificados os tempos de tentativa de escalada, nado e imobilidade, estando os dois primeiros relacionados com a atividade noradrenérgica e serotoninérgica, respectivamente, enquanto o último está associado com o comportamento tipo depressão (Micale *et al.*, 2013). Em relação ao modelo SB, as

alterações comportamentais surgem entre 2 e 6 horas após a administração do indutor, com resolução gradual a partir de então (Frenois *et al.*, 2007). A reversão do aumento do tempo de imobilidade ocorre, principalmente, com o tratamento crônico com antidepressivos (Yirmiya, 1996), aumentando a validade preditiva do mesmo.

Mais recentemente descrito (Deacon, 2006), o *burrowing* (BUR) é um teste comportamental alicerçado sobre o comportamento natural de algumas espécies de roedores de remover (escavar) itens dispostos dentro de tubos em seu ambiente. Conservado pelos animais de laboratório, esse comportamento é usado como teste para vários modelos, como na avaliação de lesões hipocâmpais e pré-frontais, de doenças neurodegenerativas e no monitoramento de SB. Vários grupos (Cunningham *et al.*, 2009; Puntener *et al.*, 2012) demonstraram alterações na capacidade de escavação dos animais após baixas doses de LPS, cujas alterações se mantiveram por até 24-48 horas. O tratamento com drogas anti-inflamatórias é capaz de reverter a alteração (Teeling *et al.*, 2010). No entanto, o grande leque de condições capazes de alterar o desempenho reduz sua especificidade e limita o seu uso isolado (Jirkof, 2014).

1.2.2 Sickness Behavior: fisiopatologia

A ativação dos receptores da família *toll like receptors* (TLR) pelas moléculas indicadoras de perigo (DAMP) ou associadas a patógenos (PAMP), como o LPS, desencadeia a produção de citocinas na periferia a partir de células do sistema imune inato que estão implicadas nas alterações acima descritas. Assim como no TDM, as principais citocinas produzidas e que estão envolvidas na gênese no SB são IL-1 β , IL-6, TNF e IFN γ e também há alteração na síntese de marcadores de fase aguda, como a PCR e haptoglobina. A detecção do LPS pelas células apresentadoras de antígeno (APC) através do complexo CD14-TLR-4 é seguida do desencadeamento de cascatas intracelulares pela via da MyD88 que culminam com a produção de promotores, como NF κ B, e esses induzirão à síntese de TNF, IL-1 β , IL-6 e IFN γ nas APC's (Mcaleer e Vella, 2008). A apresentação desse antígeno às células T, ocasionando a diferenciação dessas em populações Th1 (principalmente) e Th2, causa a ativação de monócitos/macrófagos por parte dos linfócitos T ativados, amplificando a via de

sinalização das citocinas anteriormente citadas. Posteriormente, células T também sofrem diferenciação para populações como Treg e Th3, responsáveis pelo controle da resposta gerada, sintetizando citocinas como IL-10 (Maes *et al.*, 2012). Apesar das semelhanças em relação às alterações sistêmicas e séricas vistas no transtorno depressivo, as alterações sistêmicas induzidas pelo LPS são temporárias e as concentrações de mediadores inflamatórios são bem superiores àquelas vistas no transtorno depressivo (Roman *et al.*, 2013).

Assumindo a semelhança entre o modelo de SB e a hipótese inflamatória do TDM, esses sinalizadores inflamatórios periféricos, para exercer seus efeitos no SNC, precisam atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE). No entanto, esses mediadores são, em sua maioria, grandes e hidrofílicas moléculas, cuja passagem pela BHE pode ocorrer pelas vias (1) humoral, (2) neural ou (3) celular. Algumas condições crônicas, como esclerose múltipla e outras doenças neurodegenerativas tornam a BHE menos seletiva, permitindo a difusão simples desses mediadores (Schiepers *et al.*, 2005). Em algumas regiões específicas, como os órgãos circumventriculares e plexo coroide, a BHE é substituída pela barreira hematoliquórica, que permite o trânsito dessas substâncias (Schiepers *et al.*, 2005), como já demonstrado para TNF e IL-1 β em altas concentrações (Schiepers *et al.*, 2005). Além disso, a própria presença de citocinas pró-inflamatórias são capazes de alterar a permeabilidade do endotélio capilar, favorecendo a difusão dessas substâncias (Chandler *et al.*, 1997). Outra maneira de transporte humoral seria através dos transportadores ativos específicos nas células endoteliais como já foram vistos para IL-1 β , IL-6 e TNF, os quais podem ter sua expressão aumentada em condições não fisiológicas (Young *et al.*, 2014). A via neural ocorre pelo nervo vago ou trigêmeo, que podem atuar como intermediários nessa sinalização. Já foi demonstrado a presença de células dendríticas e macrófagos nas proximidades dos paragânglios, uma estrutura não neuronal próxima às terminações nervosas vagais e que pode intermediar a sinalização inflamatória (Goehler *et al.*, 1997; Banks, 2005; Young *et al.*, 2014). Há ainda aumento da expressão de *c-Fos*, marcador de ativação neural, nas projeções primárias e secundárias do nervo vago em resposta a um estímulo com LPS intraperitoneal (IP) (Goehler *et al.*, 1997). Em roedores, a vagotomia provocou atenuação da resposta comportamental induzida por LPS, embora não tenha afetado a síntese periférica de citocinas nem a resposta febril induzida pela injeção IP de IL-

1 β ou LPS (Luheshi *et al.*, 2000; Capuron e Miller, 2011). Em humanos, a estimulação elétrica do nervo vago por 12 meses provocou resposta em 30% dos casos altamente refratários ao tratamento antidepressivo (Young *et al.*, 2014). Por outro lado, se a injeção de citocinas/LPS ocorre nos vasos sanguíneos ou no tecido subcutâneo, a vagotomia não afeta a indução de SB (Bluthe *et al.*, 1996). Finalmente, essa sinalização periférica poderia alcançar o cérebro pela via celular através da entrada de monócitos previamente ativados (Capuron e Miller, 2011) ou pelo endotélio, onde também estão presentes receptores para citocinas, que podem induzir a síntese de mensageiros secundários, como óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, que intermediariam a sinalização inflamatória e suas ações (Schiepers *et al.*, 2005).

A sinalização IL-1 β pode ocorrer no SNC através das vias humorais, neurais ou pelo endotélio. As alterações comportamentais induzidas por IL-1 β são mediadas pelos receptores IL-1r1, que ativa cascatas intracelulares através da MyD88 e NF κ B (semelhante ao que ocorre com TLR) (Mccusker e Kelley, 2013), ao passo que o IL-1r2 é um receptor inativo (*decoy receptor*). O IL-1r1 está presente em vários tipos celulares, como células da glia, endoteliais e neurônios. Estudos com animais *knock-out* (KO) para IL-1r1 demonstraram que esse receptor está envolvido nas alterações das respostas sociais, na perda de peso e na redução de apetite/anedonia no modelo de SB por IL-1 β , abolindo essas alterações comportamentais nesses animais. Por outro lado, ao induzir o SB com TNF ou LPS, os animais KO exibem o modelo completo (Bluthe *et al.*, 2000). Além disso, o uso de IL-1ra (IL-1r1 solúvel, atuando como antagonista de IL-1 β) causa diminuição do SB induzido por TNF (Bluthe *et al.*, 1994). Esses dados sugeriram a necessidade de ao menos uma dessas citocinas estarem presentes para o desenvolvimento do SB, além de um possível papel do IL-1 β como amplificador de sinal (Mccusker e Kelley, 2013). Em monócitos, micróglia e astrócitos, a ativação do receptor IL-1r1, com consequente aumento da expressão de NF κ B, culmina com aumento da produção de citocinas e ativação de dessas células. Nos neurônios há ativação preferencial das vias da MAPK e de SRC dependente de MyD88 (figura 1) pelo IL-1r1, implicando inibição de potenciais de longa duração no hipocampo e aumento da excitação NMDAR mediada pela modulação via ceramida, respectivamente (Srinivasan *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2006; Viviani *et al.*, 2007; Schafers e Sorkin, 2008). Embora não existam evidências de que esses fenômenos

sejam responsáveis pelas alterações comportamentais induzidas por IL-1 β , esses dados demonstram que essa interleucina pode alterar diretamente a função neural.

Em relação ao TNF, a entrada no SNC ocorre pela via neural ou celular (Bluthe *et al.*, 2002; Marquette *et al.*, 2003; Churchill *et al.*, 2006). A administração de TNF na periferia ou no SNC causa todo o espectro de alterações do SB (Bluthe *et al.*, 1994). O TNF também possui 2 receptores (TNFr1 e TNFr2), sendo o primeiro expresso majoritariamente em neurônios e o segundo em células da glia (Capuron e Miller, 2011). Embora ambos sejam capazes de induzir o SB, apenas os animais KO para o TNFr1 foram poupados da alteração comportamental, indicando um papel secundário para o TNFr2 (Bluthe *et al.*, 1994; Macewan, 2002). Ambos os receptores induzem a síntese de citocinas pela ativação de MAPK (figura 1), no entanto, apenas o TNFr1 (localizado preferencialmente em neurônios) é capaz de ativar a síntese de ceramida, modulando a ativação neuronal via NMDAR, sugerindo possível implicação dessa via no SB induzido por TNF (Macewan, 2002). Não obstante, o bloqueio de um intermediário da via da MAPK foi suficiente para impedir o SB induzido por TNF, sugerindo que ambas as vias estão envolvidas na alteração comportamental e que possivelmente a amplificação do sinal do TNF através da síntese de outras citocinas seja necessária (Palin *et al.*, 2008).

Apesar de estar fortemente associada ao TDM, algumas evidências indicam que a administração isolada de IL-6 não é capaz de gerar uma resposta comportamental tipo SB, viabilizando apenas a manifestação de febre e ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Lenczowski *et al.*, 1999; Dantzer *et al.*, 2008). No entanto, animais KO para IL-6 exibem um SB “deficiente”, com redução da imobilidade no FST e TST, e menor alteração no teste da sacarose (Chourbaji *et al.*, 2006). Em termos farmacológicos, administração prévia de um inibidor de sinalização do receptor de IL-6 diminui a síntese de IL-6 e TNF após estímulo com LPS, mas não de IL-1 β (Dantzer *et al.*, 2008; Burton *et al.*, 2011). Como inexiste evidências de modulação da síntese de ceramida pela ativação de receptores para IL-6 (figura 1), é possível que apenas a atuação via amplificação de produção de citocinas seja insuficiente para produzir um SB completo (Mccusker e Kelley, 2013).

Conforme revisado por Deczkowska e colaboradores, os IFN são uma família de citocinas, constituída de IFN β , IFN γ , IFN ϵ , IFN κ , IFN θ , IFN ω e 13 tipos de IFN α com receptores distribuídos em praticamente todas as células do corpo (Deczkowska *et*

al., 2016). Como já citado, em humanos o emprego de INF α é capaz de induzir um SB logo no início do tratamento e também aumenta a incidência do TDM após terapia contínua (Capuron *et al.*, 2005; Mccusker e Kelley, 2013). No entanto, o emprego de animais KO para receptor de IFN γ em um modelo de SB usando Bacilos de Calmette-Guérin (BCG) mostrou que a alteração comportamental pode ser invocada mesmo na ausência desses receptores, embora exista produção de IFN γ (O'connor *et al.*, 2009). Em outro modelo, utilizando Poly I:C, a produção de IFN γ estava aumentada embora o tratamento com anticorpos neutralizantes não foi capaz de reverter a alteração comportamental (Mccusker e Kelley, 2013). Além disso, o tratamento de roedores com IFN α ou IFN γ não foram capazes de desencadear SB (Kentner *et al.*, 2006; Loftis *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). Dessa maneira, na presença de uma ativação imune prévia (como hepatite C em humanos) IFN α é capaz de gerar uma resposta comportamental assim como o tratamento prolongado. É possível que isso derive da amplificação da sinalização através de outras citocinas (Mccusker e Kelley, 2013). Assim como para IL-6, a ativação de vias intracelulares pelos receptores de IFN aparentemente não afetam a via das ceramidas (figura 1), uma possível justificativa para a ausência de SB com o tratamento exclusivo com IFN γ .

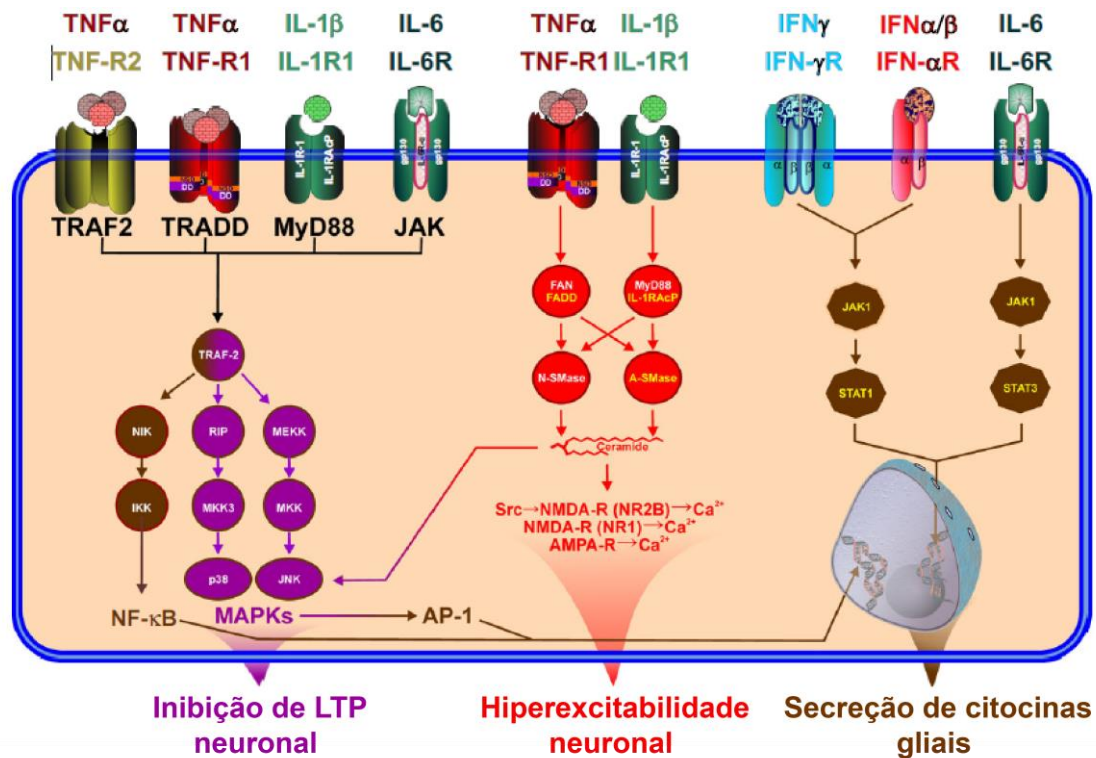


Figura 1: Vias intracelulares envolvidas na sinalização dos receptores para citocinas no SNC. Adaptado de McCusker et al. (McCusker e Kelley, 2013)

1.2.3 Sickness Behavior: citocinas e neurotransmissão serotoninérgica

Conforme exposto, as citocinas, isoladamente ou em conjunto, são capazes de ativar várias vias de sinalização intracelular, e provocar alterações comportamentais diversas. A metabolização do aminoácido triptofano pela via da quinurenina (QA) apresenta-se como um ponto de convergência da alteração imunomediada da neurotransmissão serotoninérgica, que está classicamente associada na fisiopatologia do TDM. O triptofano, um precursor da síntese de 5-HT, pode ser metabolizado para QA através da enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) no SNC, ou por sua equivalente (triptofano dioxigenase) no fígado (Muller e Schwarz, 2007). A atividade dessa enzima é amplamente modulada por citocinas, estando aumentada na exposição a IFN α , IFN γ , TNF e IL-1 β e diminuída por IL-4 e IL-10, por exemplo. Dessas, conforme demonstrado por O'Connor e colaboradores, TNF e IFN γ são as principais citocinas envolvidas na modulação da atividade de IDO, agindo de maneira sinérgica para o desvio do metabolismo de triptofano (O'Connor *et al.*, 2009). Conforme revisado por Dantzer (Dantzer, 2009) e Muller (Muller e Schwarz, 2007), QA pode ser

metabolizado para ácido quinureninico (AQR) ou para 3-hidroxiquinurenina, precursor de ácido quinolínico (AQI) e gerador de espécies reativas de oxigênio. A metabolização do AQ para AQI é executada exclusivamente por células microgliais ou monócitos no SNC pois apenas células com origem mesodérmica possuem o aparato enzimático necessário para essa via (Saito *et al.*, 1993), enquanto a síntese de AQR é realizada majoritariamente pelos astrócitos. Esses dois metabólitos exercem funções antagônicas no SNC, uma vez que o AQI é um agonista NMDAr e o AQR é um antagonista desse receptor. Vários autores demonstraram (Trullas e Skolnick, 1990; Tokarski *et al.*, 2008) e revisaram (Krishnan e Nestler, 2008; Prins *et al.*, 2011; Gerhard *et al.*, 2016) a associação dos transtornos depressivos com alterações na neurotransmissão glutamatérgica NMDAr mediada, que tem como principal aplicação a rápida atividade antidepressiva da quetamina, um antagonista de NMDAr. Adicionalmente, o aumento de AQI está associado a algumas características do TDM, como lentidão do tempo de resposta, déficits cognitivos, e dificuldades no aprendizado (Muller e Schwarz, 2007). Em pacientes em tratamento com IFN α , houve associação entre o surgimento de sintomas depressivos e o aumento da razão QA/QAr, que sugere favorecimento da via de formação de QAI (Capuron *et al.*, 2002). Finalmente, também são vistos aumento da neurotransmissão glutamatérgica por redução da recaptação e por liberação de glutamato por células gliais (Pitt *et al.*, 2003; Volterra e Meldolesi, 2005; Tilleux e Hermans, 2007). Essa liberação excessiva de glutamato pode ocasionar excitotoxicidade e diminuição da expressão de fatores neurotróficos, através da ligação com NMDAr extra sinápticos (Hardingham *et al.*, 2002; Haydon e Carmignoto, 2006).

Paralelamente a esse aumento da neurotransmissão glutamatérgica, a síntese de 5-HT pode estar afetada devido depleção dos estoques de triptofano (Muller e Schwarz, 2007). Essa hipótese é sugerida pela observação de níveis séricos reduzidos de triptofano em pacientes após 3 semanas tratamento com IFN, período no qual coincidiu piora dos sintomas depressivos (Capuron *et al.*, 2002). No entanto, a depleção isolada de triptofano está associada a piora do humor apenas em populações de risco, como pacientes com história familiar de depressão ou em remissão pós retirada da terapêutica. Conjuntamente, esses dados reforçam a participação glutamatérgica no TDM, que pode atuar como um gatilho para que outras alterações possam desencadear o quadro (Muller *et al.*, 2011).

Além do mecanismo da IDO, as citocinas podem alterar a neurotransmissão serotoninérgica de diversas formas. *In vitro*, através do tratamento prolongado com IL-1 β , TNF e IL-6, e *in vivo*, com LPS, a ativação da sinalização de p38 resultou na alteração da expressão de RNA mensageiro (RNAm) e da atividade do transportador de serotonina (5-HTT) em astrócitos e micróglia (Zhu *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2010). Além disso, a administração de LPS em camundongos aumentou a expressão do receptor pré-sináptico 5-HT_{2A} no mesencéfalo enquanto diminui a expressão dos pós sináptico 5-HT_{1A} no córtex (Maes *et al.*, 2012).

1.2.4 *Sickness Behavior*: citocinas, serotonina e neuroplasticidade

A neurotransmissão serotoninérgica desempenha um papel central na fisiopatologia do SB e do TDM uma vez que participa como um importante elo entre as alterações neuroinflamatórias e fenômenos neuroplásticos e neurodegenerativos. Por exemplo, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), cuja redução é apontada como uma possível causa para a neurodegeneração no TDM (Pittenger e Duman, 2008; Krishnan e Nestler, 2010), possui expressão mediada pelo CREB (*cAMP Response Element-Binding*), um fator de transcrição gênica. A ativação do CREB é consequência de receptores acoplados a adenilato ciclase, dentre os quais estão os receptores 5-HT_{1a} e 5-HT₄ (Ivy *et al.*, 2003; Kim e Leem, 2014). Em modelos animais, o tratamento com agonista de 5-HT_{1a} aumentou a resiliência desses animais a modelos de depressão por estresse crônico e esse efeito se correlacionou com aumento dos níveis de RNAm para BDNF no hipocampo. Além disso, conforme revisado por Haase e Brown (Haase e Brown, 2015), a depleção de 5-HT ocasionaria menor ativação dos seus receptores, reduzindo a expressão de BDNF. O BDNF, por sua vez, também exerce modulação sobre a atividade dos 5-HTT, aumentando a recaptação de 5-HT e, conseqüentemente, diminuindo a ativação de 5-HT₄. Assim, tem-se um mecanismo de regulação recíproca entre 5-HT e BDNF, mantendo a homeostase neuronal. Sob condições pró-inflamatórias, o aumento da atividade do 5-HTT ou a depleção de 5-HT causada pelo consumo do triptofano pela via da IDO, alteraria essa via de regulação, ocasionando menor ativação de 5HT₄ de maneira

independente da síntese de BDNF. O resultado final seria uma menor expressão desse fator neurotrófico, um dos mecanismos neurodegenerativos.

Dessa forma, dada a multiplicidade de fenômenos biológicos implicados no TDM e em seus modelos, a elaboração de uma terapêutica mais eficaz deve considerar a manipulação de alvos farmacológicos variados, que possam modular os aspectos neuroinflamatórios, plásticos e de neurotransmissão.

1.3 O Sistema Endocanabinóide e os canabinóides exógenos

Apesar de milenar, a manipulação exógena do sistema canabinóide só começou a ser compreendida na década de 60 do século XX, com a descrição química dos dois principais constituintes farmacologicamente ativos da planta *Cannabis sativa*, o Δ -9-tetraidrocanabinol (Δ -9-THC) e o canabidiol (CBD) (Michoulam e Shvo, 1963). Com o isolamento dos compostos exógenos, nos anos 80 foram propostas hipóteses de ação através de receptores próprios e, em 1986, Howlett e colaboradores descreveram os receptores pré-sinápticos canabinóides CBR1, expressos principalmente no SNC (Howlett, 2002). Pouco tempo depois, outro grupo apontou a existência de um outro receptor, o CBR2, inicialmente descoberto em células do sistema imune no baço e depois evidenciado no SNC, com destaque para as células da glia (Munro *et al.*, 1993). Ambos os receptores são acoplados a proteína Gi, (Bayewitch *et al.*, 1995), e exercem sua sinalização intracelular através das vias da adenilato ciclase, MAPK e regulação intracelular de cálcio (Howlett, 2002). Após a descrição dos receptores, na década de 90 houve a identificação dos ligantes endógenos, endocanabinóides (ECb), suas fórmulas químicas e vias de síntese e de degradação. Atualmente, existem pelo menos 15 moléculas endógenas com capacidade de ligação ortostérica ou alostérica aos receptores canabinóides e duas são consideradas os principais moduladores: a n-aracnodoiletanolamina (ou anandamida – AEA) e o 2-aracnodoil glicerol (2-AG).

Ao contrário de outros transmissores, a AEA e o 2-AG não são estocados em vesículas sinápticas antes de serem liberados na fenda sináptica e são produzidos sob demanda pelo neurônio pós-sináptico em resposta ao aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} (Howlett, 2002). Cada um dos ECb possuem um aparato enzimático específico responsável pela síntese e degradação. A AEA é sintetizada a partir de um precursor fosfolípide por uma dupla enzimática: N-acetiltransferase (NAT) e *N-acyl phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D* (NAPE-PLD) conforme revisado por Fonseca e colaboradores (Fonseca *et al.*, 2013). O 2-AG, por sua vez, é sintetizado a partir da hidrólise de fosfolípidos de membrana através da fosfolipase C e convertido para 2-AG em seguida pela enzima 2-DAGL (Fonseca *et al.*, 2013). Após a síntese, os endocanabinóides são liberados para a fenda sináptica por difusão ou exercem seus efeitos sobre receptores CBR1/CBR2 citoplasmáticos (Fonseca *et al.*, 2013). A reabsorção dos ECb ocorre por vários

mecanismos, como difusão simples dependente da concentração intracelular (Glaser *et al.*, 2003) ou do sequestro por proteínas citoplasmáticas (Hillard e Jarrahan, 2003), acúmulo em adipossomos (Oddi *et al.*, 2008), endocitose (Mcfarland *et al.*, 2004) ou por transportadores específicos (Beltramo *et al.*, 1997; Hillard *et al.*, 1997). A degradação dos ECb segue por aparatos enzimáticos independentes. Para a AEA, a principal enzima é a FAAH (Deutsch e Chin, 1993) e do 2-AG a enzima MAGL (Blankman *et al.*, 2007). No entanto ambas moléculas podem sofrer degradação a partir de outras enzimas, como ciclooxigenase 2 (COX-2) e várias lipoxigenases (Fonseca *et al.*, 2013). Os receptores, situados no neurônio pré-sináptico, desencadearão um controle retrógrado, diminuindo a liberação de neurotransmissores, dentre outras funções (Katona e Freund, 2012).

Os receptores CBR1 são altamente conservados entre humanos e outras espécies (100% de homologia com primatas e 97% com ratos e camundongos). Em modelos animais, esses receptores são responsáveis pela tétrade de efeitos dos canabinóides: antinocicepção, hipotermia, redução da mobilidade e catalepsia (Howlett, 2002). Adicionalmente, são atribuídos ao CBR1 os efeitos deletérios sobre o aprendizado e memória uma vez que o emprego de antagonistas seletivos para CBR1 reverte o quadro (Howlett, 2002). Além do SNC, o CBR1 é expresso em glândulas endócrinas, nos leucócitos, baço, coração e trato reprodutivo (Grotenhermen, 2004). No encéfalo, o receptor pré-sináptico CBR1 é expresso principalmente nos núcleos da base, substância nigra, globo pálido, cerebelo e hipocampo e estão envolvidos com neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos (Howlett, 2002). Sua ativação ocasiona redução nos níveis de cAMP e aumento da atividade da MAPK através da ativação da proteína Gi.

Por outro lado, os receptores CBR2 são principalmente expressos pelas células sistema imune periférico em vários órgãos (baço, tonsilas, medula óssea, entre outros) e, no SNC, pela micróglia e neurônios, embora, em níveis inferiores ao do CBR1 (Stella, 2010), e sua manipulação através de agonistas/antagonistas não está associada a sintomas psicoativos. Detém apenas 44% de homologia com o receptor CBR1, embora compartilhe vários ligantes com esse dada a grande semelhança do sítio de ligação (68%). A sua ativação no sistema imune periférico está associada alteração no processamento de antígenos de APC derivados de monócitos implicados na ativação de células T (Howlett, 2002), como inibição da síntese de IFN γ , IL-1 β

induzida pela infecção por *Legionella pneumophila* em um modelo animal (Howlett, 2002). Suas ações também são mediadas pela ativação de proteína Gi. Uma vez que a ativação de CBR2 não está associado efeitos psicotrópicos, recebe destaque como um potencial alvo farmacológico (Mechoulam e Parker, 2013).

1.3.1 O Sistema Endocanabinóide e os Transtornos Depressivos

Conjuntamente, os receptores CBR1 e CBR2, os endocanabinoides, os transportadores e as enzimas envolvidas nas vias de síntese e degradação constituem o Sistema Endocanabinoide (Di Marzo, 2009). A modulação desse sistema pela *Cannabis* está associada a controversos efeitos sobre o humor. Apesar de 69% dos participantes afirmarem uso de cannabis quando estavam “desanimados/deprimidos (Hillard e Liu, 2014), estudos com questionários validados apontaram aumento de sintomas depressivos, agressividade e tristeza enquanto utilizavam *Cannabis* (Hillard e Liu, 2014), que foi considerado preditor de suicídio em adolescentes, mesmo após melhora dos sintomas depressivos com terapêutica adequada. Dessa forma, é possível que o uso momentâneo de cannabis cause melhora do humor, mas seu uso prolongado predisponha o surgimento de sintomas depressivos, possivelmente devido à regulação na expressão de CBR1 (Hillard e Liu, 2014).

Por outro lado, o sistema ECb é apontado como outro foco de alterações no transtornos depressivos uma vez que pacientes deprimidos apresentaram níveis séricos diminuídos de ECb e aumento da expressão de CBR1 no córtex pré-frontal em estudos pós-morte (Hillard e Liu, 2014). Em modelos animais, apesar de alguns resultados conflitantes, o emprego de Δ -9-THC agudamente ou em 5 dias de tratamento provocou redução da imobilidade em teste de nado forçado sem alteração da atividade locomotora (El-Alfy *et al.*, 2010; Bambico *et al.*, 2012; Micale *et al.*, 2013) e animais KO para CBR1 apresentam aumento da imobilidade no FST. Adicionalmente, deleção de CBR1 é capaz de diminuir a resiliência a um estresse crônico leve (ECL), exibindo anedonia precocemente e reduziu a expressão de BDNF no hipocampo (Marco *et al.*, 2011). Além disso, conforme revisado por Micale (Micale *et al.*, 2013), o emprego de AEA, agonistas não seletivos CBR1/CBR2 (WIN55,12-2 e CP55940) e de um agonista CBR1 seletivo (araquidonoil 2'-cloroetilamina) reverteram

o comportamento semelhante a depressão em roedores através da atuação em receptores CBR1, serotoninérgicos e noradrenérgicos. De maneira semelhante, animais KO CBR2 apresentaram maior vulnerabilidade a um ECL, com aumento de imobilidade no TST e alterações indicativas de ansiedade no labirinto em cruz elevada. Em corroboração, animais com maior expressão de CBR2 demonstravam maior resiliência ao ECL associada a um aumento da expressão de BDNF (Marco *et al.*, 2011).

O CBD, assim como outros ligantes exógenos, constitui um modulador desse sistema além de exercer efeitos sobre outros receptores e vias, as quais serão mais detalhadas a seguir.

1.3.2 O Canabidiol

Isolado na década de 30 do século passado, mas com a estrutura revelada apenas 30 anos depois, o canabidiol inicialmente perdeu importância devido ao isolamento do Δ -9-THC e da associação desse com os efeitos psicoativos, conforme revisado por Burstein (Burstein, 2015). No entanto, a pesquisa pela palavra “cannabidiol” na biblioteca do PubMed em fevereiro de 2016 retorna 1477 trabalhos desde 1970, sendo 877 apenas na última década, demonstrando o crescente interesse científico nessa droga. O CBD é uma mistura dos enantiômeros (+)-CBD com propriedades farmacológicas distintas, sendo o (-)-CBD naturalmente presente na *Cannabis sativa*. Por exemplo, a falta de afinidade do (-)-CBD para receptores CBR1 ou CBR2 contrasta com a afinidade em escala nanomolar do (+)-CBD. Além desses enantiômeros, são descritos cerca de 10 homólogos estruturais com afinidades extremamente variáveis para os receptores ECb (Burstein, 2015).

Em relação ao sistema ECb, o (-)-CBD possui baixa afinidade ao sítio agonista do CBR1, o que é refletido com a falha em evocar a clássica tétrade de resposta aos agonistas CBR1 (Long *et al.*, 2010). Possui maior afinidade ao sítio antagonista, mas é incapaz de reproduzir as alterações induzidas por antagonistas seletivos, como o rimonabanto (Mcpartland *et al.*, 2015). Além disso, recentemente foi demonstrada sua capacidade de atuar também como modulador alostérico negativo, reduzindo a ligação de agonistas como Δ -9-THC ou 2-AG (Laprairie *et al.*, 2015). Quanto ao receptor CBR2, o CBD apresenta-se como um agonista inverso de baixa afinidade,

sendo esse mecanismo pouco relevante farmacologicamente (Mcpartland *et al.*, 2015). Por outro lado, recentemente foi demonstrada a possibilidade dos receptores CBR2 formarem heterodímeros com os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1a}, que, ao ligar com CBD, resultou na expressão reduzida de IL-1 β em um modelo isquêmico em porcos recém-nascidos. Anteriormente, já havia sido demonstrado que o CBD atua como agonista do receptor 5-HT_{1a} (Russo *et al.*, 2005), mais recentemente descritos efeitos antidepressivos demonstrados no FST mediados por esse receptor (Sartim *et al.*, 2016). Além desses, o CBD ainda atua como antagonista do receptor órfão acoplado a proteína G 55 (GPR55), modulador alostérico dos receptores opióides mi e delta, agonista dos receptores transitórios da subfamília V de canais de cátions (TRPV1) (Bisogno *et al.*, 2001), agonista do receptor gama proliferador de peroxissomo ativado (PPAR γ) (Campos *et al.*, 2012). Finalmente, o CBD exerce ainda modulação da neurotransmissão por AEA, uma vez que é inibidor do transportador de AEA e da enzima FAAH (Bisogno *et al.*, 2001), e por adenosina, pois inibe a recaptação desse neurotransmissor.

Apesar de um corpo de evidências relativamente grande em relação aos transtornos de ansiedade, conforme revisado por Marco (Marco *et al.*, 2011), ainda há pouco estudo com o uso de CBD em pacientes com TDM ou em modelos animais. Em relação aos modelos de depressão, a primeira evidência foi a reversão de imobilidade no FST com a administração de 30mg/kg de CBD a camundongos SWISS, cujo efeito foi mediado pelo receptor 5-HT_{1a} (Zanelati *et al.*, 2010).

Em relação aos efeitos inflamatórios, o CBD reduziu a síntese *in vivo* de IFN γ nos linfonodos de animais tratados e reduziu a concentração sérica de TNF em animais expostos a LPS na dose de 1mg/kg de CBD (Burstein, 2015). Em um modelo hipóxico-isquêmico, altas concentrações de CBD, através da modulação de receptores para adenosina A_{2A}, produziram reduções significativas de IL-6, TNF, bem como redução da expressão de COX-2 e iNOS (Castillo *et al.*, 2010). Tanto no modelo induzido por LPS quanto no isquêmico, as alterações foram mediadas pelos receptores de adenosina A_{2A} uma vez que o tratamento com antagonista ou o uso de animais KO para A_{2A} reverteu as alterações induzidas por CBD. A modulação do receptor TRPV1 induzida por CBD está envolvida em um modelo de inflamação hepática induzido por concanavalina, uma vez que o tratamento com 25mg/kg de CBD

diminuiu a expressão das citocinas IL-2, TNF, IFN γ , IL-6, IL-1 β , IL-17, MCP1 e CCL11 (Hegde *et al.*, 2011).

Dada a importância do fenômeno inflamatório sobre o TDM, a semelhança comportamental e bioquímica desse transtorno com o modelo de SB e o envolvimento do Sistema ECb, tanto com os transtornos de humor quanto com a sinalização inflamatória, assume relevância a investigação do envolvimento dessas variáveis. O CBD, por sua vez, modula a atividade de diversos receptores, transportadores de membrana e de FAAH com implicações na sinalização intracelular e na neurotransmissão. A averiguação do envolvimento do CBD com o SB pode apresentar-se como uma nova abordagem para a compreensão dessa entidade, e, conseqüentemente, do TDM.

2. Objetivos

2.1. Geral

O tratamento com canabidiol é capaz de reverter as alterações comportamentais e bioquímicas envolvidas no SB induzido pela injeção IP de LPS?

2.2. Específicos

- Padronizar o modelo de SB induzido pela injeção de LPS em camundongos C57BL/6 utilizando os testes BUR e FST;
- Analisar as alterações comportamentais no teste BUR, FST e OF dos animais C57BL/6 submetidos ao protocolo de SB e avaliar a capacidade de reversão dessas com o tratamento com CBD;
- Comparar os níveis das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IFN γ , TNF, IL-10 em hipotálamo (HT), córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e estriado (ST) dos animais C57BL/6 submetidos ao protocolo de SB com aqueles submetidos ao tratamento com CBD previamente;
- Comparar os níveis do fator neurotrófico BDNF e NGF no CPF e HC em animais C57BL/6 submetidos ao protocolo de SB com aqueles submetidos ao tratamento com CBD previamente;

3. Material e Métodos

3.1. Material e métodos dos testes comportamentais

3.1.1. C57BL/6

Camundongos machos da linhagem C57BL/6 com idade entre 8 e 12 semanas pesando entre 20-28 gramas criados no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no biotério do Laboratório de Neurofarmacologia do ICB foram utilizados para todos os experimentos comportamentais.

Os animais foram mantidos isolados de fêmeas em caixas com 18-22 animais com livre acesso à água e ração, ciclo de claro/escuro com duração de 12 horas cada, iniciando às 7 horas da manhã. A temperatura do biotério era mantida em 25°C. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos ditados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

3.1.2. Drogas e lipopolissacáride

A dexametasona utilizada (Sulfato de dexametasona 4 mg/ml Farmace® LDX14F039) foi diluída no dia do experimento em solução fisiológica de NaCl (0,9%) para as doses de 3mg/kg e 6mg/kg. O canabidiol, também preparado no dia do experimento, (THC Pharma, Frankfurt) foi homogeneizado em Tween® 80 por 5 minutos seguido de diluição em solução de NaCl 0,9%, gerando uma solução 5% de Tween® 80 e com dose de CBD de 100mg/kg. Em seguida era feita a diluição seriada para as doses de 30, 10 e 3 mg/kg.

O LPS (Sigma, E. coli 0111:B4) era preparado imediatamente antes da administração a partir de uma solução estoque de 5mg/ml. Era diluído então para as concentrações de 0,11, 0,33 e 0,83mg/kg em solução fisiológica de NaCl.

3.1.3 Teste *Burrowing*

Conforme descrito por Deacon (Deacon, 2006), foram utilizados 15 cilindros de PVC com 200mm de profundidade e diâmetro de 68mm. Os tubos foram completamente pintados em preto e uma das extremidades ocluída por uma tampa de alumínio, também pintada em preto. Foram instalados suportes próximo à extremidade livre do tubo, de maneira que sua entrada permanecesse 30mm distante do solo. O material utilizado para medir a função de BUR foi a ração padrão dos animais, que era descartada após cada sessão de treino ou experimento propriamente dito. Para cada tubo eram pesados entre 150-151g de ração para camundongo.

O desenho experimental encontra-se na figura 2. Após alcançar a idade entre 10 a 12 semanas, os animais eram separados em grupos de 10 – 12 animais e eram expostos a uma sessão de treino coletivo com 3 aparatos de BUR preenchidos com ração. Todas as sessões de treino e experimento eram realizadas no mesmo ambiente do biotério do laboratório. Essa sessão tinha duração aproximada de 16 horas com início às 17 horas. Os aparatos eram então retirados e os animais permaneciam em alojamento conjunto por 32 horas aproximadamente até a realização do primeiro treino individual. Para esse treino, os animais eram divididos em caixas individuais, identificados numericamente, e reexpostos a aparatos limpos com 150 – 151 gramas de ração durante 2 horas (16:00 – 18:00 horas). Nesse período o acesso a água era restrito e a única ração disponível era aquela contida no tubo. Após o treino, a ração era retirada e pesada a quantidade remanescente dentro e fora do tubo. Os animais recebiam um recipiente de água limpo e identificado para cada animal bem como uma porção nova de ração. Eram aguardadas mais 48 horas até a realização do segundo treino individual, que consistia da leitura basal para o experimento. O segundo treino era realizado aos moldes do primeiro, com ração nova, e cada animal recebia exatamente o mesmo aparato utilizado no teste anterior. Após a aferição da quantidade de ração retirada, eram considerados animais bons escavadores (ABE) aqueles que retiravam ao menos 50g. Os ABE prosseguiram para o experimento, realizado 24 horas depois do segundo teste individual. Os demais animais foram utilizados para outros protocolos no laboratório Neurofar. Os ABE eram randomizados para cada grupo, mantendo uniformidade entre as leituras basais entre grupos.

Conforme demonstrado na figura 2, os animais recebiam 2 injeções IP (1ª na fossa ilíaca esquerda e a 2ª na direita), separadas por um período de 1 hora, e o teste comportamental era realizado 6 horas depois da 2ª injeção. A primeira injeção continha veículo ou droga e a segunda salina 0,9% ou LPS diluído em salina na dose de 0,11 e 0,33 mg/Kg. Para a padronização foi utilizada dexametasona 3mg/kg e nos experimentos com CBD as doses foram de 3, 10, 30 e 100 mg/kg. A quantidade máxima administrada IP não ultrapassou 300 µL. Após 6 horas de injeção de LPS, os animais foram expostos ao aparato de BUR conforme descrito anteriormente e retirados às 18:00. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e, então, dissecados imediatamente o hipotálamo, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. As estruturas eram armazenadas sob refrigeração (-70°C) para posterior processamento e análise.

Desenho experimental: *burrowing*

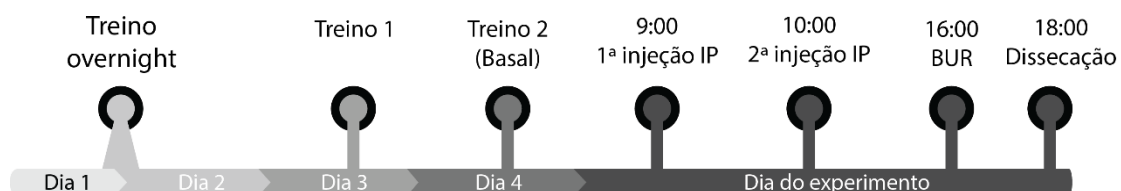


Figura 2: Desenho experimental do teste *Burrowing*.

3.1.4 Teste do Nado Forçado

Para FST foram utilizados béqueres com 400mm de altura e diâmetro de 180mm. Durante o teste, o béquer era completado até que a altura da coluna de água alcançasse 150mm, conforme descrito por Porsolt (Porsolt *et al.*, 1977). A água utilizada era mantida a temperatura de 25°C, assim como a sala de experimentação. Os experimentos foram filmados utilizando uma câmera Sony® DCR SR20 para análise por um experimentador cego aos grupos atribuídos a cada animal 1 semana

após a realização dos mesmos. Todas as análises foram feitas pelo mesmo experimentador.

Inicialmente, a indução de SB foi realizada apenas com a injeção de veículo e LPS no dia do experimento, como foi feito para o teste BUR. No entanto, como será demonstrado em Resultados, nesse modelo o FST não mostrou-se suficientemente sensível para evidenciar alterações. Em seguida, foi realizado o protocolo como demonstrado na figura 3, que foi utilizado para os testes subsequentes com o canabidiol. Após alcançar 8 – 10 semanas, 10 – 12 animais eram separados de caixas conjuntas para individuais e identificados numericamente. Os animais permaneciam isolados por 10 dias e eram manipulados durante o período. Após o isolamento, os animais recebiam 2 injeções IP (1ª na fossa ilíaca esquerda e a 2ª na direita), separadas por um período de 1 hora, e o teste comportamental era realizado 6 horas depois da 2ª injeção. A primeira injeção continha veículo ou droga e a segunda salina 0,9% ou LPS diluído em salina na dose de 0,11, 0,33, 0,83 mg/Kg. Para a padronização foi utilizada dexametasona 3mg/kg e nos experimentos com CBD as doses foram de 3, 10, 30 e 100 mg/kg. A quantidade máxima administrada IP não ultrapassou 300 µL. O teste era realizado em uma sala separada, à qual os animais eram habituados durante as 6 horas que precediam o teste. Foram realizadas filmagens com duração de 6 minutos e analisados os 4 minutos finais do teste e quantificado o tempo de imobilidade. Após o término do nado de cada animal, esses foram sacrificados por deslocamento cervical e, então, dissecados imediatamente o hipotálamo, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. As estruturas eram armazenadas sob refrigeração (-70°C) para posterior processamento e análise.

Desenho experimental: teste do nado forçado

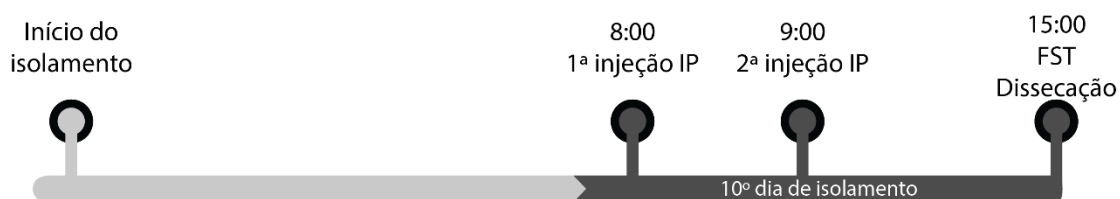


Figura 3: Desenho experimental do Teste do Nado Forçado.

3.1.5 Teste do Campo Aberto

Para os testes do campo aberto (OF), foram utilizadas uma arena cilíndrica de acrílico transparente medindo 30x50 cm de diâmetro. Os experimentos foram filmados utilizando uma câmera Microsoft LifeCam[®], ancorada 2,0 metros de distância para posterior análise por um experimentador cego aos grupos atribuídos a cada animal. Todas as análises foram feitas pelo mesmo experimentador.

Após alcançar 8 – 10 semanas, 10 – 12 animais eram separados de caixas conjuntas para individuais e identificados numericamente. Os animais permaneciam isolados por 10 dias e eram manipulados durante o período. Após o isolamento, os animais recebiam 2 injeções IP (1^a na fossa ilíaca esquerda e a 2^a na direita), separadas por um período de 1 hora, e o teste comportamental era realizado 6 horas depois da 2^a injeção. A primeira injeção continha veículo ou droga e a segunda salina 0,9% ou LPS na dose já padronizada pelo teste FST. A quantidade máxima administrada IP não ultrapassou 300 µL. O teste era realizado em uma sala separada, à qual os animais eram habituados durante as 6 horas que precediam o teste. Foram realizadas filmagens com duração de 5 minutos e a distância percorrida de cada animal quantificada através do software AnyMaze[®].

3.1 Métodos bioquímicos

3.1.1 ELISA

As amostras foram processadas em tampão de extração de citocinas conforme dados da lista de soluções usando um microprocessador. Após centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi aspirado e armazenado sob refrigeração (-70°C) até o momento do uso para ELISA.

Os *kits* de ELISA da R&D Systems (DuoSet) foram utilizados para detecção de IL-1 β , NGF e BDNF em conformidade com os procedimentos descritos pelo fabricante, modificado por Bernardino et al (De Souza Bernardino *et al.*, 2015).

As concentrações das citocinas e do BDNF foram avaliadas no sobrenadante do homogenato das regiões cerebrais em diluição 1:3 em tampão fosfato:albumina bovina 1%.

Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100uL de solução contendo PBS 1x e concentração adequada do anticorpo captura específico, que permaneceu em contato com a placa durante 18 horas a 4°C. Posteriormente procedeu-se a lavagem em 4 vezes com tampão de lavagem em um lavador de placas (BioTek™ ELx50™ Microplate Strip Washer).

Logo após a fase de captura, procedeu-se o bloqueio da reação, por 2 horas, com 200 μ L de solução de bloqueio PBS-BSA 1%. Posteriormente foram adicionados os padrões de citocinas em concentrações conhecidas e as amostras, que permaneceram incubados por mais 18h a 4°C.

Mais uma série de lavagem foi realizada e logo após foram adicionados 100uL da solução de anticorpo de detecção que permaneceu incubada por mais 2 horas.

Após, nova série de lavagens e foi adicionada à placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada e foi adicionado o tampão substrato contendo orto-fenilenodiamina (OPD – Sigma) e H₂O₂ (Merck).

A reação foi interrompida com 50 μ L de ácido clorídrico na concentração de 1M. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em leitor de placas de ELISA no comprimento de onda de 490nm (BioTek™ ELx 800™ Absorbance Reader).

3.1.2 *Cytometric Bread Array*[®] (CBA)

As amostras foram processadas em tampão de extração de citocinas conforme dados da lista de soluções usando um microprocessador. Após centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi aspirado e armazenado sob refrigeração (-70°C) até o momento do uso para CBA.

O kit de CBA *mouse* Th1/Th2/Th17 de citocinas foi utilizado conforme manual de instruções fornecido pela BD[®] e protocolo empregado por Barbosa e colaboradores (Barbosa *et al.*, 2014). De maneira resumida, após preparo das esferas de captura utilizando os reagentes do kit, 25 µL do sobrenadante das amostras preparadas foram adicionadas a 25 µL de solução contendo as esferas de captura em uma placa de 96 poços e incubadas protegidas da luz por 2 horas. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 200g e seu sobrenadante aspirado e descartado. Foi adicionado 100 µL de tampão de lavagem e submetido a um ciclo de centrifugação 5 minutos a 200g, processo esse realizado num total de 2 vezes. Após a última lavagem, foram adicionados 100 µL tampão de lavagem e misturados por 2 minutos a 1.100 rpm. Esse conteúdo foi transferido para tubos cônicos de polipropileno de 15ml para leitura pelo citômetro BD FACSCanto[®] com capacidade de leitura de laser para faixas de 488, 532 633 ou 635 nm e capaz de distinguir fluorescências entre 576, 660 e >680 nm.

3.1.1 Análise estatística

O programa *Graph Pad PRISM* (versão 6.01 *Graph Pad Software Inc.*) foi utilizado para as análises estatísticas. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância de uma via (ANOVA). Quando o valor de F foi significativo, comparações *post hoc* foram feitas pelo teste de *Newman-Keuls*. Diferença entre grupos individuais foi avaliada com teste t de *Student*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 Resultados

4.1 Burrowing

Inicialmente foi verificado se o nosso protocolo de BUR reproduziria as alterações vistas por outros grupos com baixas doses de LPS. Conforme demonstrado na figura 4, não há diferença entre os grupos na leitura basal. No entanto, após indução do modelo de SB, houve diferença estatística entre o grupo que recebeu veículo e salina (V+S) e o grupo que recebeu veículo e LPS 0,11mg/kg (V+L 0,11) em relação à quantidade de ração escavada, sendo menor nesse último. O tratamento com dexametasona 3mg/kg provocou atenuação da alteração comportamental no grupo (D3+LPS 0,11), padronizando o modelo de SB de baixa dose (SB com LPS 0,11 mg/kg).

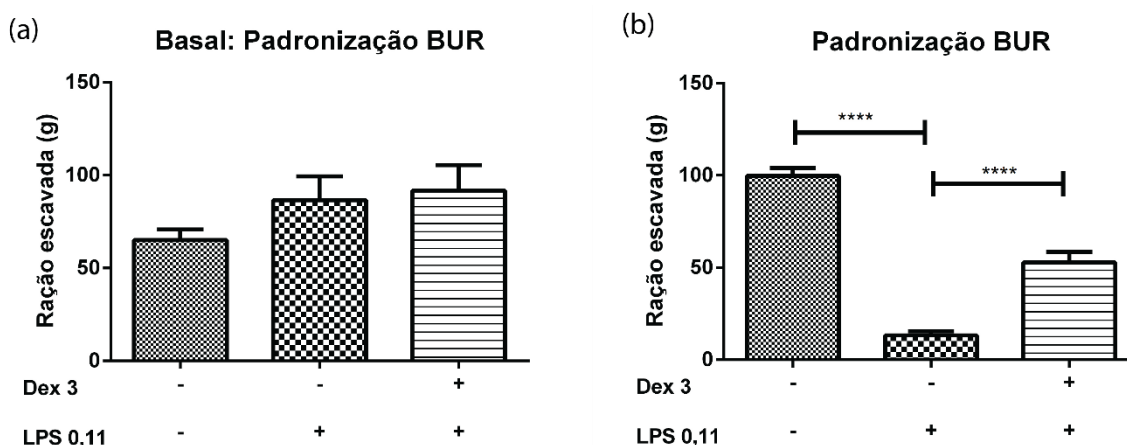


Figura 4: Padronização do Burrowing. Resultados expressos em gramas (g) de ração retirada de dentro do aparato (n=5). Não houve diferença entre a capacidade escavatória basal dos grupos distintos (a). O modelo SB com dose de 0,11 mg/kg de LPS reduziu significativamente o comportamento de escavação em relação ao controle (**p<0,0005, ANOVA seguido de Newman-Keuls). Essa alteração é revertida pela dexametasona 3 mg/kg (b, **p<0,005). Dex 3=dexametasona 3 mg/kg; LPS 0,11=LPS na dose 0,11 mg/kg.

Em seguida, foi testado o efeito do pré-tratamento com CBD nos animais C57BL/6 sem a indução de SB com LPS 0,11 mg/kg por LPS (CBX + S, sendo X a dose de CBD em mg/kg). Dentre os grupos, apenas o CBD na dose de 30mg/kg foi capaz de reduzir o desempenho desses animais no teste BUR (figura 5).

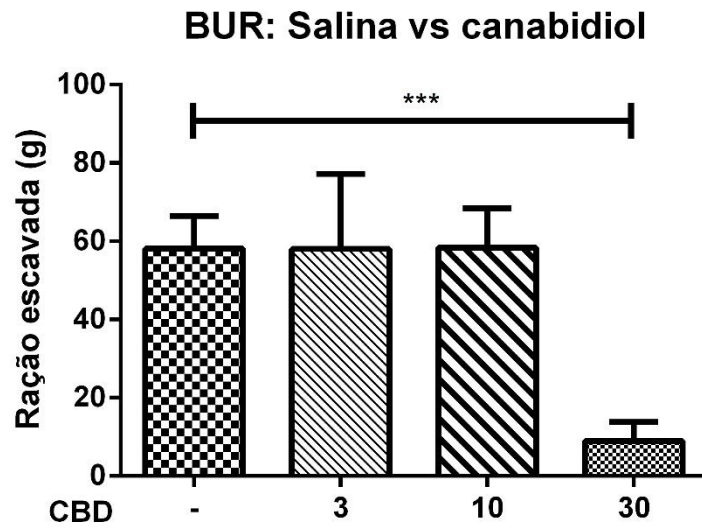


Figura 5: Curva dose-resposta no teste Burrowing do canabidiol. Resultados expressos em gramas (g) de ração retirada de dentro do aparato (n=4-8). As menores doses de canabidiol não alteraram o desempenho no teste. A dose de 30 mg/kg reduziu a quantidade de ração retirada do aparato (* $p < 0,05$, ANOVA seguido de Newman-keuls). CBD x=canabidiol na dose "x" mg/kg; LPS 0,11=LPS na dose 0,11 mg/kg.

Finalmente, o CBD foi testado no modelo de SB com dose de LPS de 0,11mg/kg. O CBD não foi capaz de reverter a alteração no BUR causada por SB com LPS 0,11 mg/kg em nenhuma das doses testadas (figura 6).

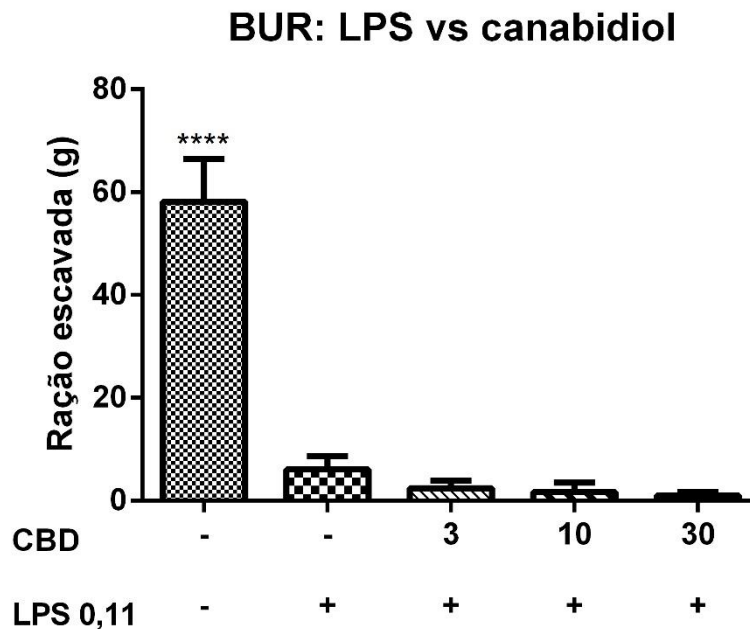


Figura 6: Desempenho no Burrowing do modelo SB com o tratamento com canabidiol em diferentes doses. Resultados expressos em gramas (g) de ração retirada de dentro do aparato (n=4-8, ANOVA seguido de Newman-keuls). Nenhuma das doses testadas foram capazes de reverter as alterações comportamentais do modelo SB com LPS 0,11 mg/kg ($p > 0,05$, ANOVA seguido de Newman-keuls). CBD x=canabidiol na dose "x" mg/kg; LPS 0,11=LPS na dose 0,11 mg/kg.

4.1.1 CBD 3 mg/kg diminuiu a expressão de IL-1 β no córtex pré-frontal

A quantificação dos níveis da citocina IL-1 β (tabela 1) foi realizada nas regiões do HT, CPF, HC e EST. O tratamento com CBD foi comparado ao controle (V+S). Na dose de 3mg/kg, o CBD diminuiu significativamente a expressão de IL-1 β no CPF. Esse efeito não foi demonstrado em outras regiões. As doses de 10 e 30 mg/kg não foram eficazes para alterar os níveis dessa citocina em nenhuma das regiões analisadas (tabela 1).

Tabela 1: Curva dose-resposta do CBD sobre IL-1 β no HT, CPF, HC e EST.

Regiões	Concentração de IL-1 β (pg/mg de tecido)			
	V+S	CBD 3+S	CBD 10+S	CBD 30+S
HT	38,15 \pm 6,78	20,75 \pm 7,17*	56,38 \pm 21,48	48,57 \pm 13,76
CPF	26,60 \pm 3,25	6,03 \pm 2,72*	13,99 \pm 3,02	23,67 \pm 4,94
HC	21,46 \pm 6,42	12,38 \pm 2,32	18,73 \pm 9,03	21,50 \pm 6,59
EST	29,33 \pm 12,40	14,75 \pm 6,96	29,09 \pm 16,12	29,32 \pm 4,74

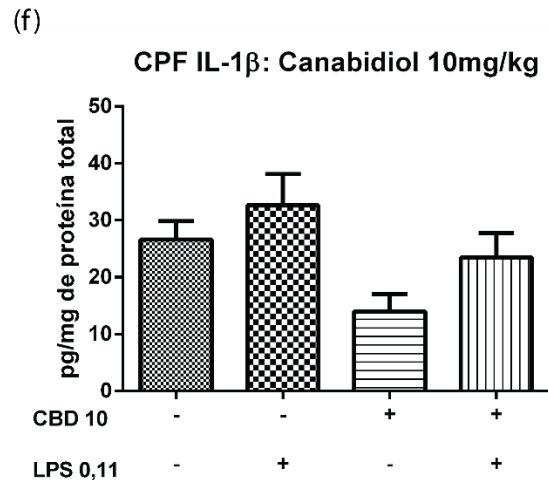
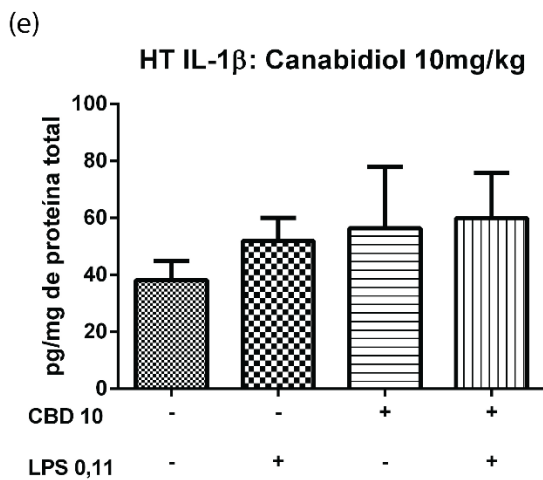
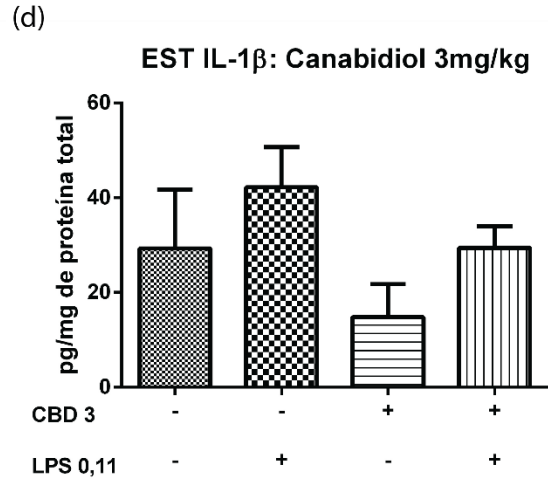
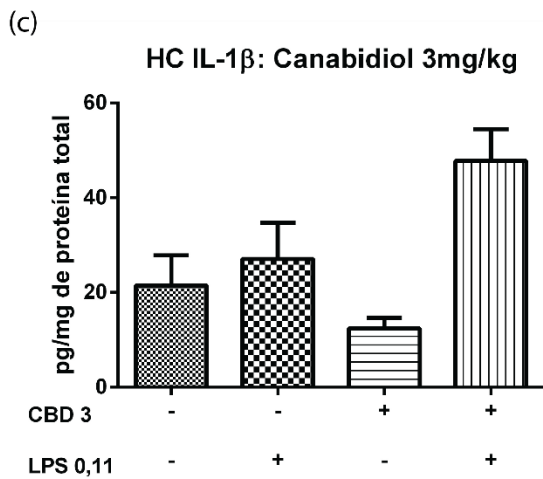
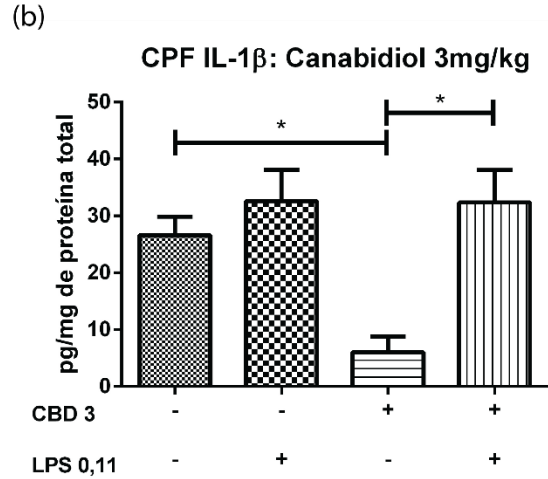
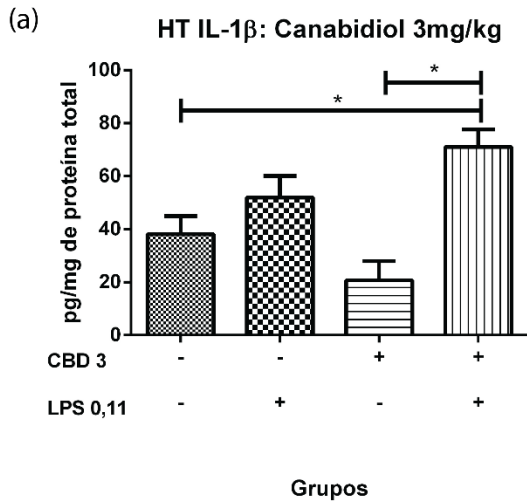
*p<0,05, ANOVA seguido de Newman-keuls

HT=hipotálamo; CPF=córtex pré-frontal; HC=hipocampo; EST=estriado; CBD x=canabidiol na dose "x" mg/kg; S=salina; V=veículo.

4.1.2 CBD não alterou a expressão de IL-1 β no modelo de SB com 0,11 mg/kg de LPS

Em seguida, foram testados os efeitos do modelo de SB com LPS na dose de 0,11 mg/kg sobre a expressão de IL-1 β e a modulação desses pelo CBD nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg. No grupo SB com LPS 0,11 mg/kg não houve diferença nos níveis de IL-1 β em relação ao controle, em nenhuma das regiões analisadas. O tratamento com cada uma das doses não provocou redução na expressão de IL-1 β em nenhuma das regiões analisadas. No entanto, no hipotálamo a associação de CBD 3mg/kg e 30mg/kg com LPS aumentou a expressão de IL-1 β em comparação com o controle salina e com o controle CBD (figura 7a). No CPF houve aumento dos níveis de IL-1 β

no grupo que recebeu a associação CBD 3mg/kg + LPS em comparação com o controle com CBD, que demonstrou redução desses índices em relação ao controle salina (figura 7b).



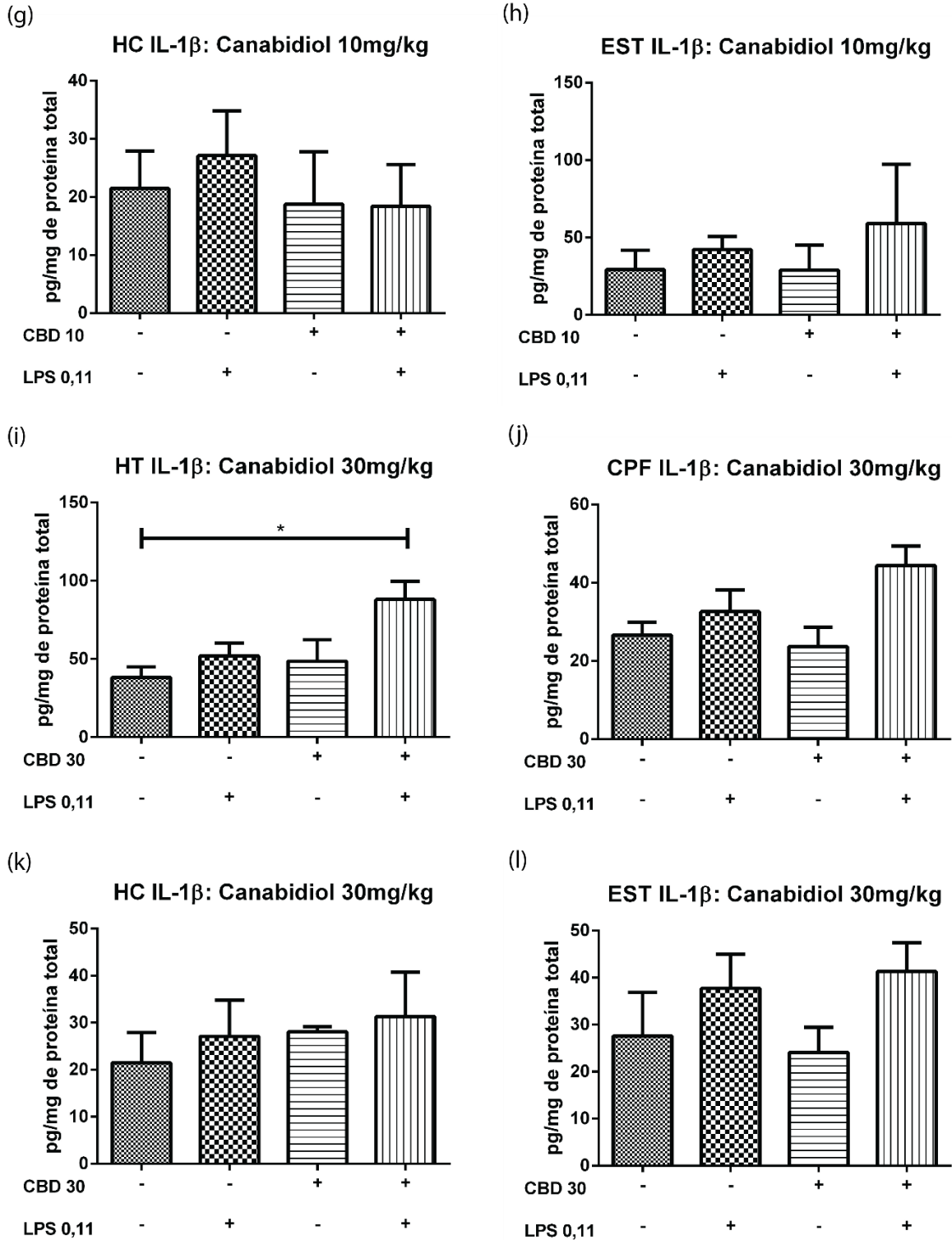


Figura 7: Expressão de IL-1β no modelo de SB com LPS 0,11 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD. Resultados expressos em pg de IL-1β/mg de proteínas no tecido (pg/mg, n=4-8). A associação CBD+LPS aumentou a expressão de IL-1β em comparação com o controle CBD na dose de 3mg/kg no HT e CPF ($p < 0,05$, ANOVA seguido de Newman-keuls) e apresentou tendência para aumento no HC (a, b c). Não houve alteração na expressão de IL-1β nas demais regiões ($p > 0,05$, ANOVA seguido de Newman-keuls). CBD x=canabidiol na dose "x" mg/kg; LPS 0,11=lipopolissacáride na dose de 0,11 mg/kg.

4.2 Teste do Nado Forçado (FST)

De maneira semelhante ao BUR, foi tentada padronização do modelo de SB para o teste de FST. Apenas a aplicação de LPS, em diferentes concentrações, sem os 10 dias de isolamento prévio, não induziu alterações na resposta dos animais (figura 8).

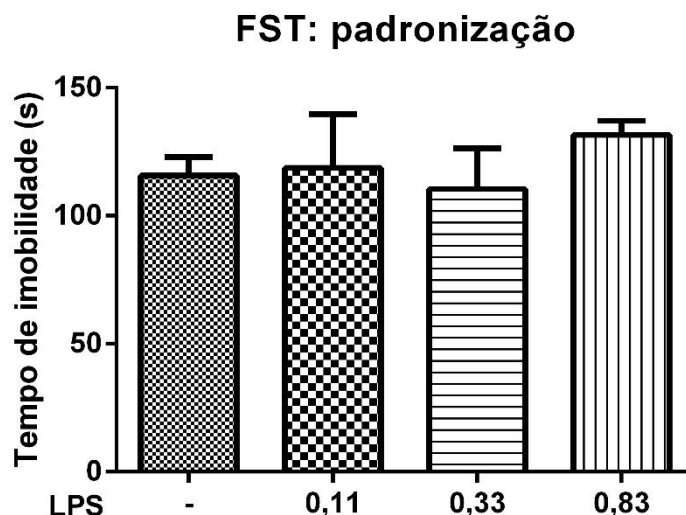


Figura 8: Padronização do modelo SB para o teste do nado forçado. Resultado expresso em tempo absoluto de imobilidade em segundos (s) durante os 4 minutos finais do teste (n=8). O emprego de diferentes doses de LPS não induziu diferença comportamental no FST quando comparadas ao controle com salina ($p>0,05$, ANOVA seguido de Newman-keuls). LPS x=LPS na dose de "x" mg/kg.

Em seguida, nova padronização foi tentada com o isolamento de 10 dias (10di), conforme explicado em Métodos. Houve diferença estatística entre o grupo veículo + salina (V+S) e veículo + LPS 0,83mg/kg (V+LPS 0,83). Além disso, o tratamento com dexametasona 6mg/kg (D6+LPS 0,83) foi suficiente para reversão da alteração no FST induzida pelo SB (figura 9), padronizando o modelo de SB para esse teste.

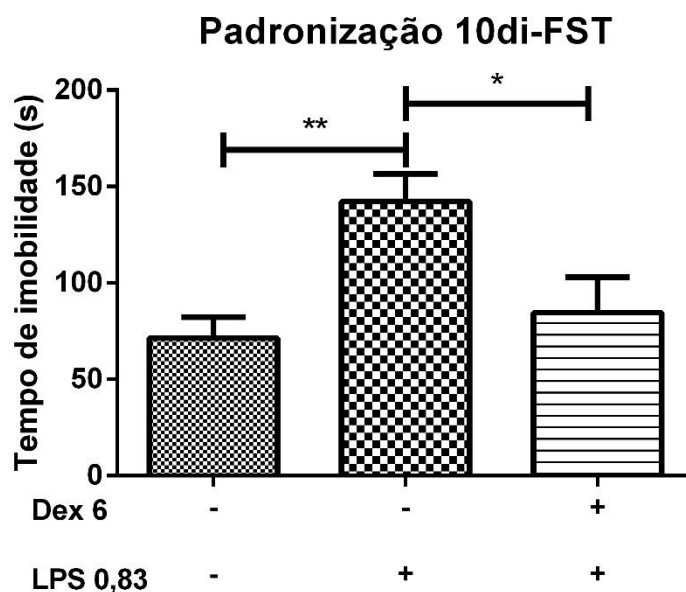


Figura 9: Padronização do modelo SB para o teste do nado forçado com 10 dias de isolamento prévios à injeção de LPS. Resultado expresso em tempo absoluto de imobilidade em segundos (s) durante os 4 minutos finais do teste (n=8). A administração de LPS aumentou significativamente o tempo de imobilidade do grupo modelo SB com LPS 0,83 mg/kg (** $p < 0,005$, ANOVA seguido de Newman-Keuls) e o tratamento com dexametasona 6 mg/kg reverteu a alteração comportamental (* $p < 0,05$). 10di=10 dias de isolamento; Dex 6=dexametasona 6 mg/kg; LPS 0,83=lipopolissacáride na dose 0,83 mg/kg.

De maneira semelhante ao BUR, foi testado o efeito do pré-tratamento com CBD nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg (CBX + S, sendo X a dose de CBD em mg/kg) sem a indução do SB com LPS 0,83 mg/kg, que demonstrou diferença estatística no teste ANOVA seguido de Newman-Keuls para o grupo que recebeu a dose mais alta em comparação com o controle. Houve tendência ($p=0,08$) para o grupo com a menor dose de CBD (figura 10).

10di-FST: Salina vs Canabidiol

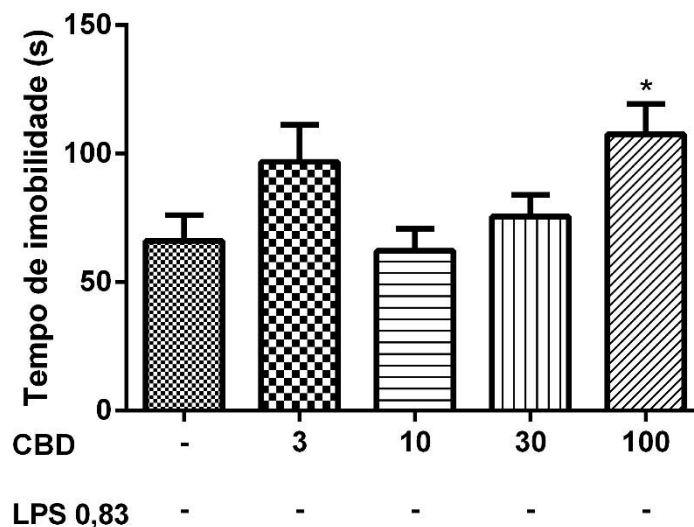


Figura 10: Curva dose-resposta no FST do canabidiol no teste do nado forçado. Resultado expresso em tempo absoluto de imobilidade em segundos (s) durante os 4 minutos finais do teste (n=8). A administração de CBD na dose de 100 mg/kg aumentou a imobilidade em comparação com os animais controle (CB 100+S, * $p < 0,05$, ANOVA seguido de Newman-keuls). Não houve diferença nas demais doses. 10di=10 dias de isolamento; CBD x=canabidiol na dose "x" mg/kg; LPS 0,83=lipopolissacáride na dose de 0,83 mg/kg.

Como nenhuma das doses de CBD foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade no FST nos animais C57BL/6, foi testada a dose de 30mg/kg no modelo de SB, uma vez que a mesma foi eficaz em outro estudo (Zanelati *et al.*, 2010) com camundongos SWISS. Dessa forma, o tratamento com 30mg/kg (CB30+LPS 0,83) foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade em um animal C57BL/6 com SB com LPS 0,83 mg/kg, revertendo-o para níveis próximos ao controle (V+S), conforme demonstrado na figura 11.

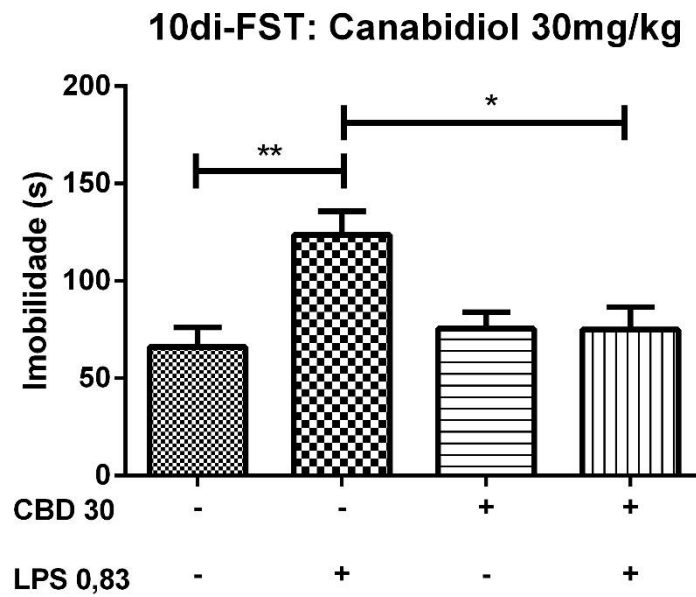


Figura 11: Efeito do tratamento com CBD 30mg/kg sobre o modelo de SB no teste do nado forçado. Resultado expresso em tempo absoluto de imobilidade em segundos (s) durante os 4 minutos finais do teste (n=8). O tratamento com CBD 30 mg/kg reverteu o tempo de imobilidade do modelo de SB para valores equivalentes ao controle (**p<0,005, *p<0,05, ANOVA seguido de Newman-keuls). 10di=10 dias de isolamento; CBD x=canabidiol na dose “x” mg/kg; LPS 0,83=lipopolissacáride na dose de 0,83 mg/kg.

Utilizando do mesmo protocolo de SB com LPS 0,83 mg/kg, foi realizado um controle de mobilidade com o teste OF. A dose de 0,83 mg/kg de LPS provocou alteração estatisticamente significativa, diminuindo a distância percorrida pelo animais na arena. Os animais que receberam apenas CBD não tiveram diferença na distância percorrida. Além disso, o tratamento com CBD não reverteu a redução da distância percorrida induzida pelo SB com LPS 0,83 mg/kg (figura 12)

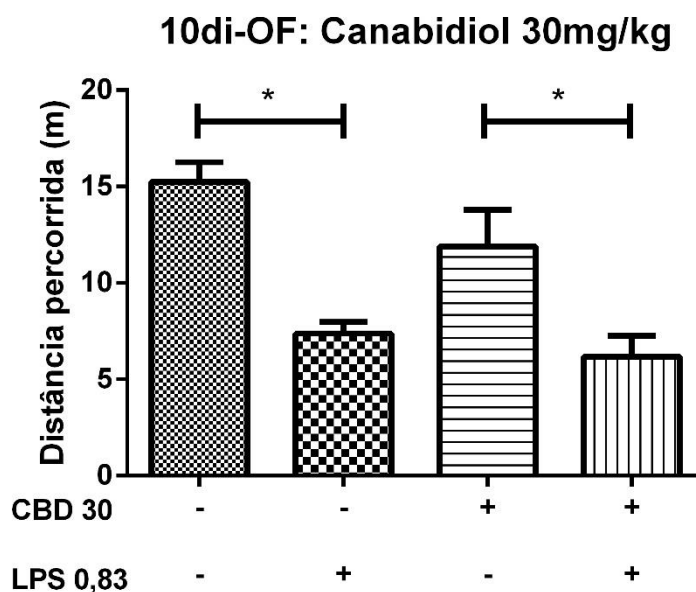


Figura 12: Efeito do tratamento com CBD 30mg/kg sobre o modelo de SB no teste de campo aberto. Resultado expresso em distância absoluta de percorrida em metros (m) durante os 5 minutos de duração do teste (n=8). O modelo SB diminuiu a distância percorrida em relação aos controles salina e CBD (*p<0,05, ANOVA seguido de Newman-keuls). O CBD não alterou a distância percorrida em relação aos seus controles. 10di=10 dias de isolamento; CBD x=canabidiol na dose “x” mg/kg; LPS 0,83=lipopolissacáride na dose de 0,83 mg/kg.

4.2.1 Curva dose-resposta do CBD sobre as citocinas inflamatórias.

Como descrito em Métodos, as dosagens de IL-1 β (tabela 2) foram realizadas pelo método ELISA e das demais citocinas pelo método CBA no hipotálamo (HT), córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e estriado (EST). Os resultados dessa análise estão dispostos na tabela 2 e a comparação foi realizada entre as doses de CBD para uma dada região.

Inicialmente foram comparados os níveis de IL-1 β entre o grupo veículo + salina (V+S) e CBD + salina (CBX + S, sendo X a dose de CBD em mg/kg). No HT a expressão de IL-1 β foi significativamente maior no grupo CB100+S quando comparado com o V+S, assim como em relação aos grupos CB3+S e CB10+S.

Os níveis expressos de IFN γ foram praticamente desprezíveis, de maneira que os valores representados aqui são uma extrapolação da curva de padronização da técnica CBA. Houve aumento dos níveis de IFN γ no hipotálamo no grupo pré tratado com CBD na dose de 100mg/kg (C100+S) quando comparado com o controle salina

(V+S). De maneira semelhante, o pré-tratamento com CBD a 3 mg/kg aumentou os níveis dessa citocina no córtex pré-frontal em relação ao controle V+S. Não houve diferença na expressão de IFN γ nas demais regiões.

Não houve diferença na expressão de IL-2 em nenhuma das regiões analisadas entre o grupo controle e os animais que receberam as doses de 3, 10 e 30 e 100 mg/kg.

A expressão de IL-4 mostrou-se aumentada no hipotálamo no grupo submetido ao tratamento com CBD 100mg/kg. Por outro lado, não houve alteração dessa citocina nesse grupo nas demais regiões analisadas. Os tratamentos com outras doses (3, 10 e 30 mg/kg) não mostraram alterações em nenhuma área analisada.

O tratamento com CBD 30 mg/kg reduziu significativamente os níveis de expressão de IL-6 em relação ao controle (V+S) no hipotálamo, sem achado semelhante noutras doses. Por outro lado, o tratamento com a dose de 3mg/kg de CBD aumentou a expressão de IL-6 no CPF em relação aos controles (V+S). Nas demais regiões não houve alteração da expressão de IL-6 com nenhuma das doses empregadas.

A avaliação dos níveis de IL-10, mostrou redução significativa na expressão dessa citocina no CPF com o tratamento com CBD nas doses de 10, 30 e 100mg/kg. Nas demais regiões, nenhuma dose alterou a expressão de IL-10.

O tratamento com CBD aumentou os níveis de expressão de TNF no hipotálamo na dose de 100mg/kg. Não foram evidenciadas alterações nas outras regiões nessas doses. As doses de 3 e 10 mg/kg não alteraram a expressão de TNF em nenhuma região.

Tabela 2: Curva dose-resposta do CBD sobre as citocinas no HT, CPF, HC e EST.

Citocina	Região	Concentração da citocina (pg/mg de proteína total no tecido)				
		V+S	CBD 3+S	CBD 10+S	CBD 30+S	CBD 100+S
IL-1 β	HT	8,6 \pm 2,4	14,7 \pm 8,4	18,1 \pm 4,8	15,3 \pm 2,3	29,6 \pm 15,0
	CPF	19,6 \pm 4,3	41,6 \pm 8,3	37,7 \pm 3,9	37,5 \pm	39,1 \pm 5,1
	HC	8,3 \pm 2,0	5,5 \pm 0,8	11,5 \pm 1,9	9,7 \pm 1,9	11,0 \pm 1,9
	EST	10,8 \pm 2,7	4,8 \pm 1,4	23,9 \pm 5,9	11,0 \pm 1,8	16,7 \pm 4,3
IFN γ (x10 ³)	HT	7,9 \pm 2,0	5,6 \pm 1,3	9,8 \pm 2,5	12,8 \pm 5,0	59,5 \pm 5,7*
	CPF	25,1 \pm 10,0	89,1 \pm 27,1*	61,0 \pm 8,4	36,5 \pm 8,9	57,3 \pm 8,7
	HC	18,9 \pm 4,7	21,6 \pm 3,5	33,1 \pm 1,1	27,0 \pm 5,0	27,0 \pm 4,3
	EST	59,1 \pm 6,3	62,8 \pm 1,1	61,1 \pm 6,2	53,4 \pm 6,7	81,4 \pm 2,6

Citocina	Região	Concentração da citocina (pg/mg de proteína total no tecido)				
		V+S	CBD 3+S	CBD 10+S	CBD 30+S	CBD 100+S
IL-2 (x10 ³)	HT	30,9 ± 8,8	30,1 ± 5,1	32,7 ± 7,5	27,0 ± 8,1	41,5 ± 6,1
	CPF	36,8 ± 3,7	73,2 ± 18,3	46,0 ± 5,6	50,3 ± 7,9	45,1 ± 6,8
	HC	17,0 ± 3,4	17,5 ± 3,3	26,8 ± 8,9	22,0 ± 4,4	14,6 ± 5,1
	EST	46,5 ± 5,1	46,6 ± 8,2	44,6 ± 6,9	38,6 ± 5,6	42,9 ± 5,3
IL-4 (x10 ³)	HT	20,6 ± 6,2	20,0 ± 3,6	25,2 ± 5,2	11,4 ± 2,8	79,4 ± 6,7*
	CPF	73,5 ± 34,2	12,6 ± 25,4	82,3 ± 10,1	89,2 ± 13,9	74,0 ± 11,2
	HC	30,4 ± 5,6	24,5 ± 2,5	30,5 ± 4,3	24,7 ± 8,1	36,9 ± 6,0
	EST	80,8 ± 8,4	87,1 ± 15,2	83,0 ± 10,0	72,0 ± 11,3	80,0 ± 10,1
IL-6 (x10 ³)	HT	15,9 ± 5,3	13,8 ± 3,6	21,4 ± 3,7	3,1 ± 0,2*	34,4 ± 1,8
	CPF	26,6 ± 8,1	71,6 ± 16,9*	40,8 ± 5,2	43,9 ± 7,8	31,1 ± 5,6
	HC	15,2 ± 3,4	13,6 ± 3,7	17,0 ± 2,4	14,1 ± 4,1	18,4 ± 2,8
	EST	40,6 ± 4,7	41,5 ± 8,2	40,8 ± 4,8	35,7 ± 6,3	39,8 ± 5,4
IL-10 (x10 ³)	HT	192,2 ± 54,9	155,8 ± 8,7	107,6 ± 37,3	69,5 ± 18,5	134,3 ± 18,8
	CPF	321 ± 72,3	194 ± 43,7*	128 ± 25,7*	135 ± 26,8*	116 ± 29,3*
	HC	72,1 ± 16,6	71,3 ± 30,9	47,4 ± 14,5	60,8 ± 12,6	99,6 ± 19,9
	EST	105 ± 11,6	129 ± 22,3	114 ± 18,6	67,3 ± 18,1	95,3 ± 19,0
TNF	HT	34,2 ± 11,0	35,5 ± 9,3	28,6 ± 6,9	68,6 ± 26,4	83,6 ± 8,2**
	CPF	70,7 ± 21,6	129 ± 36,5	89,1 ± 10,9	93,9 ± 15,4	88,5 ± 13,8
	HC	33,0 ± 6,2	32,3 ± 5,4	32,8 ± 5,1	40,6 ± 7,2	42,1 ± 7,3
	EST	92,4 ± 10,9	87,9 ± 16,5	90,6 ± 7,9	65,7 ± 8,0	93,5 ± 11,4

*p<0,05, ANOVA seguido de Newman-keuls

HT= hipotálamo; CPF=córtex pré-frontal; HC=hipocampo; EST=estriado; CBD x=canabidiol na dose "x" mg/kg; LPS 0,83=lipopolissacáride na dose de 0,83 mg/kg.

4.2.2 CBD 30 mg/kg reduziu os níveis de IL-1 β do modelo de SB no hipocampo e aumentou no estriado

Em seguida, o impacto do tratamento com CBD sobre a expressão de IL-1 β foi avaliada sobre o modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg (Fig 15). No hipotálamo (a), houve uma tendência (p=0,07) a maior expressão de IL-1 β no grupo de SB com LPS

0,83 mg/kg sem tratamento (V+LPS 0,83) em relação ao controle (V+S). No entanto, o tratamento com CBD não foi capaz de alterar sua expressão no animal controle (V+S) ou no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg. No CPF (b) não houve diferença de expressão de IL-1 β no modelo nem com o tratamento com CBD. No HC (c), o tratamento com CBD no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg (CB30+LPS0,83) reduziu significativamente a expressão de IL-1 β em relação ao controle V+LPS0,83. Não houve diferença estatística na comparação entre os outros grupos. Não houve diferença estatística na comparação entre os outros grupos (figura 13).

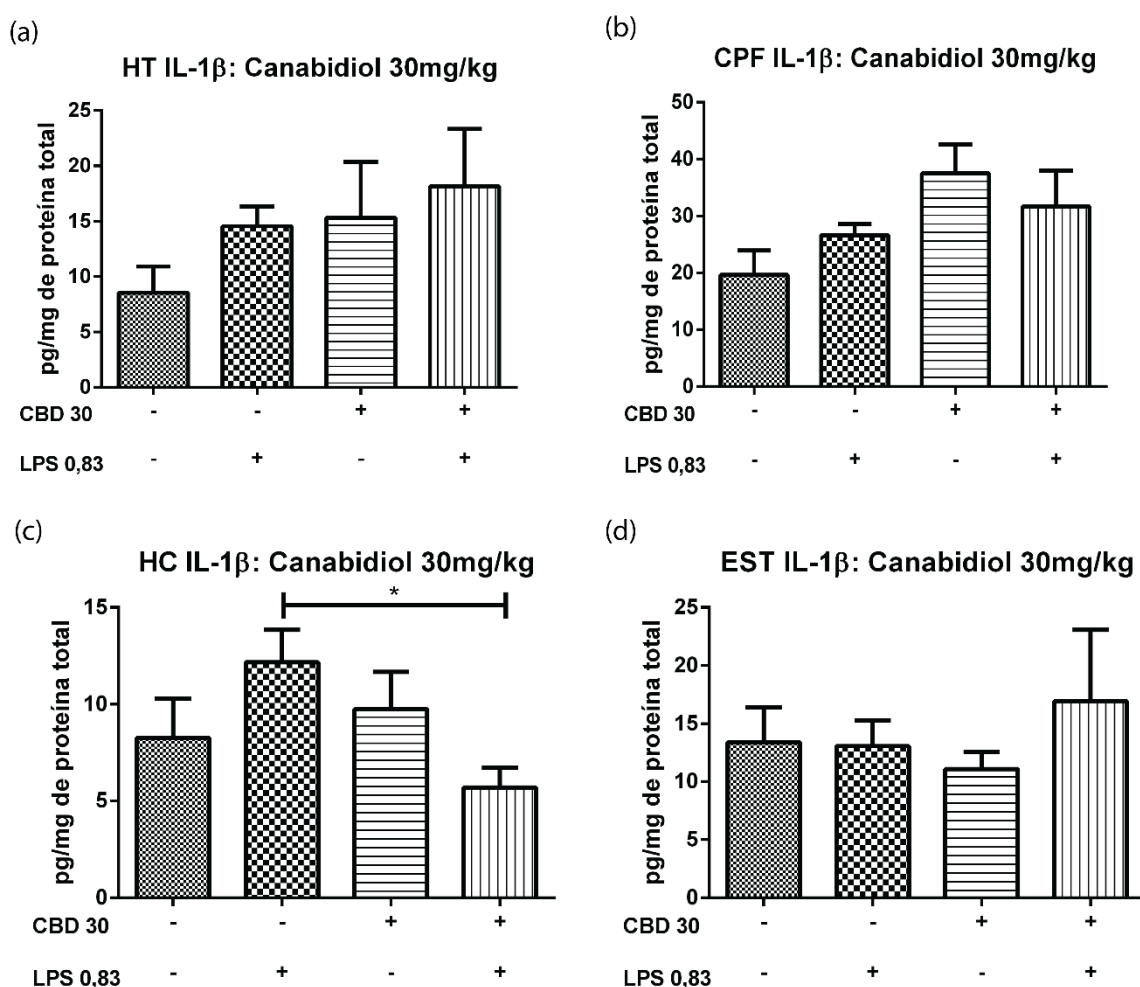


Figura 13: Expressão de IL-1 β no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD. Resultados expressos em pg de IL-1 β / mg de proteínas no tecido (pg/mg, n=8). O tratamento com CBD do modelo de SB reduziu os níveis de IL-1 β no HC (c, *p<0,05). Não houve diferença entre os grupos nas demais regiões. HT= hipotálamo; CPF=córtex pré-frontal; HC=hipocampo; EST=estriado; CBD x=canabidiol na dose "x" mg/kg; LPS 0,83=lipopolissacáride na dose de 0,83 mg/kg.

4.2.3 Não houve diferença na expressão de IFN γ pelo modelo SB ou no tratamento com CBD

As dosagens de todas as citocinas utilizando o método CBA foram realizadas no hipotálamo (a), córtex pré-frontal (b), hipocampo (c) e estriado (d). Não houve diferença na expressão de IFN γ em nenhuma das regiões analisadas entre o modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg (V+LPS 0,83) e o controle (V+S). Além disso, o tratamento com CBD na dose de 30mg/kg (C30+S) não alterou a síntese de IFN γ tanto no controle como no modelo (figura 14).

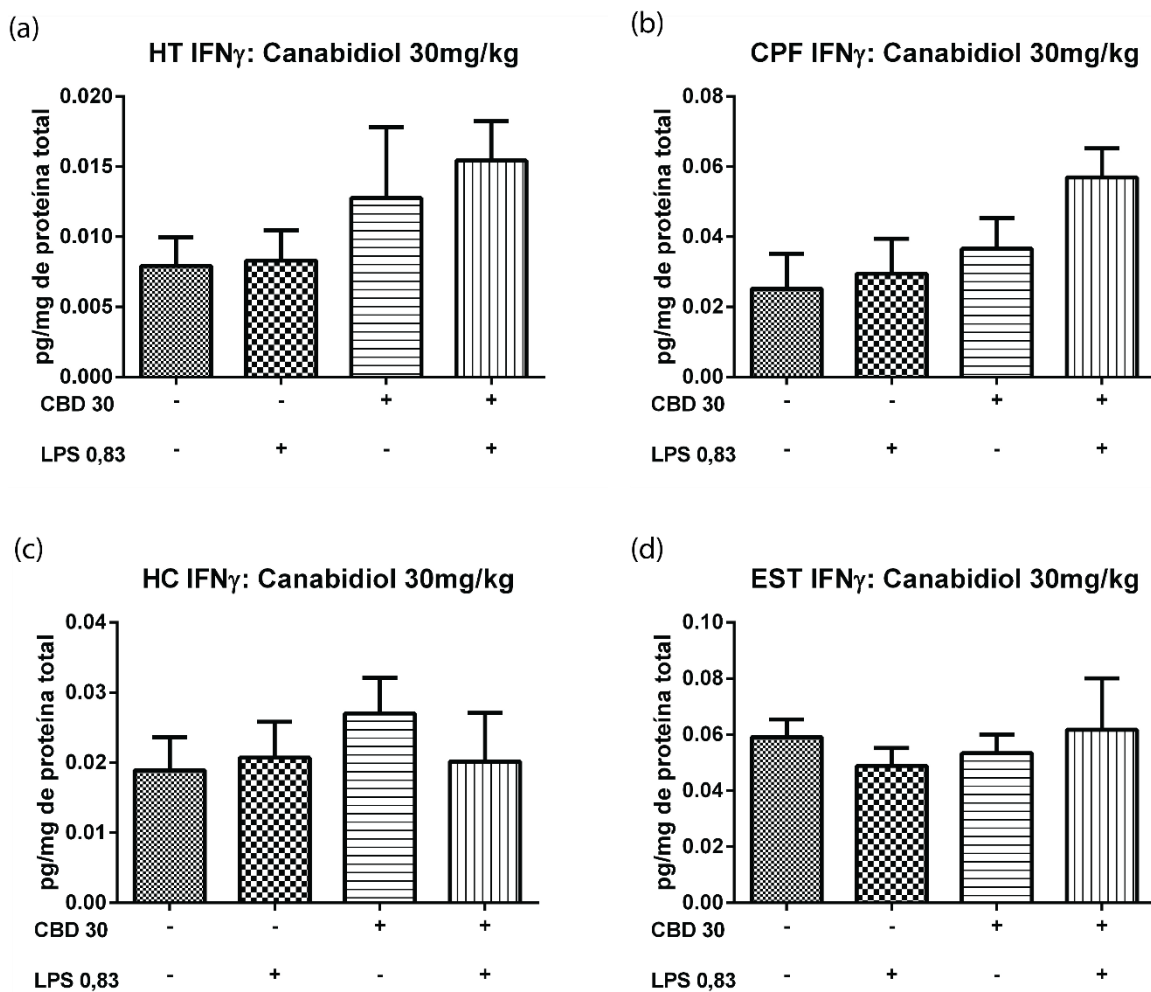


Figura 14: Expressão de IFN γ no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD. Resultados expressos em pg de IFN γ /mg de proteínas no tecido (pg/mg, n=8). O tratamento com CBD do modelo de SB não alterou a expressão de IFN γ em nenhuma das áreas analisadas. HT= hipotálamo; CPF=córtex pré-frontal; HC=hipocampo; EST=estriado; CBD x=canabidiol na dose "x" mg/kg; LPS 0,83=lipopolissacáride na dose de 0,83 mg/kg.

4.2.4 Não houve diferença na expressão de IL-2 pelo modelo SB ou no tratamento com CBD

As dosagens de todas as citocinas do método CBA foram realizadas no hipotálamo (a), córtex pré-frontal (b), hipocampo (c) e estriado (d). Não foi vista diferença entre o modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg (V+LPS 0,83) e o controle (V+S). O tratamento com CBD na dose de 30mg/kg (C30+S) não alterou a síntese de IL-2 tanto no controle como no modelo (figura 15).

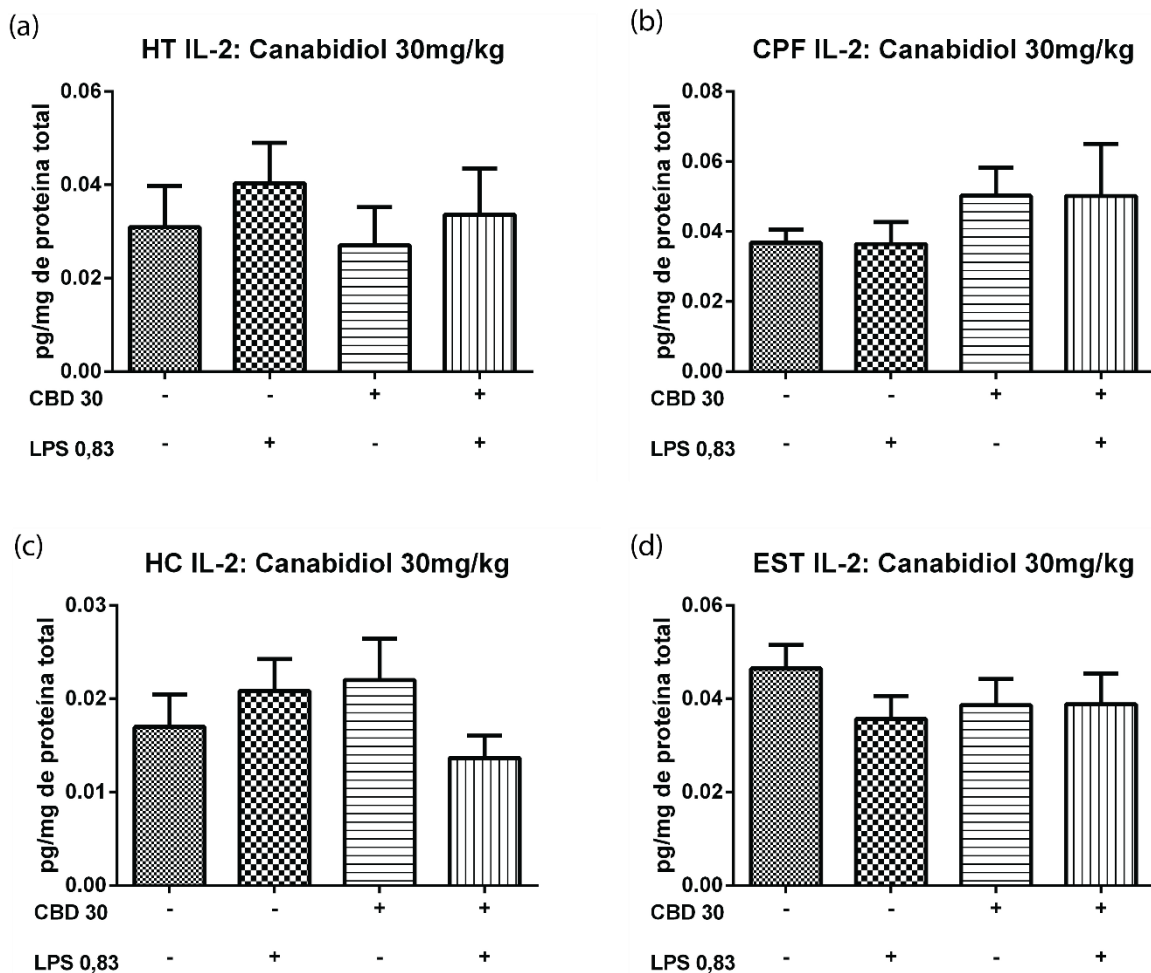


Figura 15: Expressão de IL-2 no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD. Resultados expressos em pg de IL-2/mg de proteínas no tecido (pg/mg, n=8). O tratamento com CBD do modelo de SB não alterou a expressão de IFN γ em nenhuma das áreas analisadas. HT= hipotálamo; CPF=córtex pré-frontal; HC=hipocampo; EST=estriado; CBD x=canabidiol na dose "x" mg/kg; LPS 0,83=lipopolissacáride na dose de 0,83 mg/kg.

4.2.5 Não houve diferença na expressão de IL-4 pelo modelo SB ou no tratamento com CBD

As dosagens de todas as citocinas do método CBA foram realizadas no hipotálamo (a), córtex pré-frontal (b), hipocampo (c) e estriado (d). O modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg não mostrou alteração da expressão de IL-4 no grupo sem tratamento com CBD ou no grupo que recebeu 30 mg/kg da droga (figuras 16).

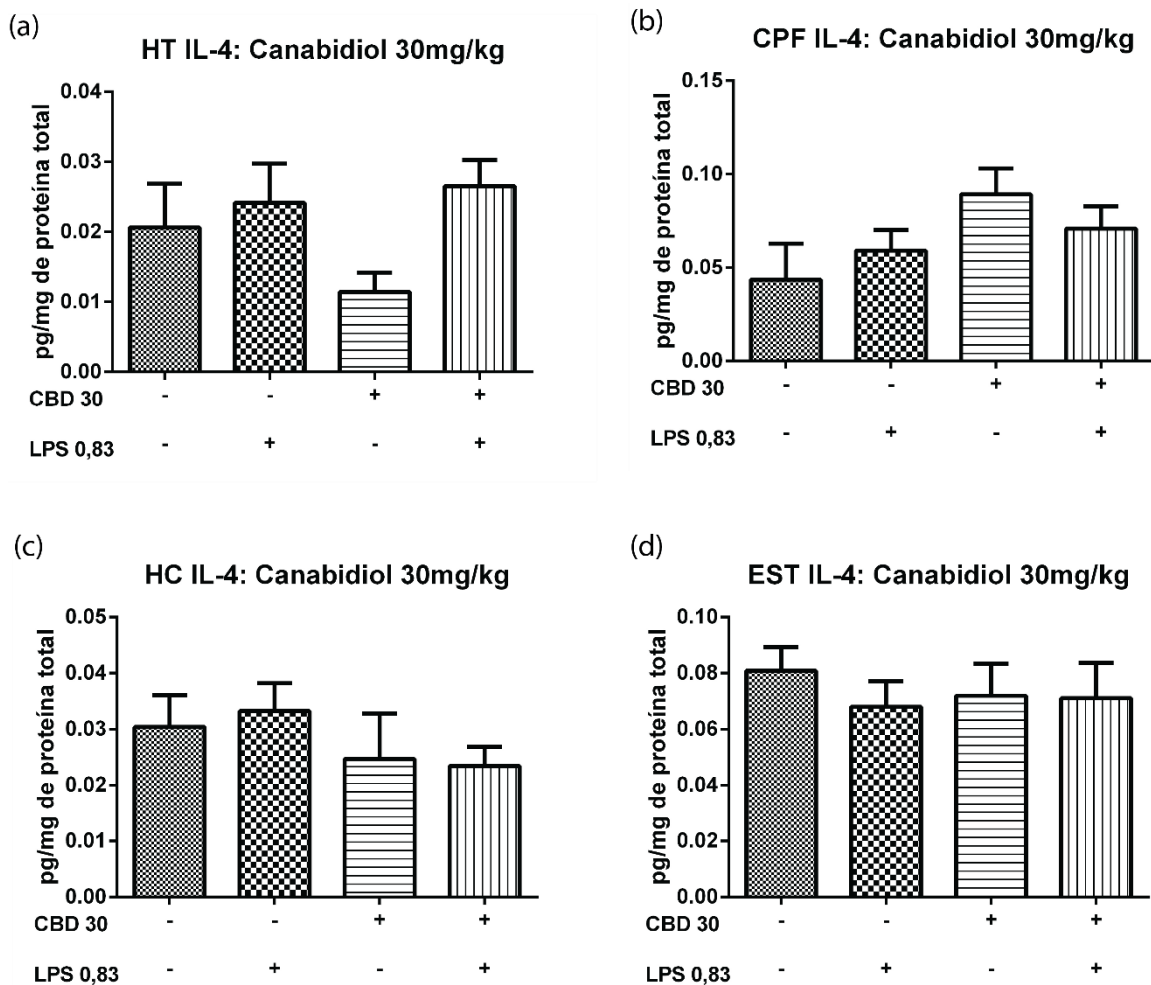


Figura 16: Expressão de IL-4 no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD. Resultados expressos em pg de IL-4/mg de proteínas no tecido (pg/mg, n=8). O tratamento com CBD do modelo de SB não alterou a expressão de IFN γ em nenhuma das áreas analisadas. HT= hipotálamo; CPF=córtex pré-frontal; HC=hipocampo; EST=estriado; CBD x=canabidiol na dose "x" mg/kg; LPS 0,83=lipopolissacáride na dose de 0,83 mg/kg.

4.2.6 O modelo SB aumentou a expressão de IL-6 que foi revertida pelo tratamento com CBD

As dosagens de todas as citocinas do método CBA foram realizadas no hipotálamo (a), córtex pré-frontal (b), hipocampo (c) e estriado (d). O modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg apresentou aumento significativo da expressão de IL-6 no HT, CPF e HC em comparação com o controle salina. Apresentou ainda tendência de elevação dos níveis de IL-6 no EST ($p=0,058$). O tratamento com CBD com dose de 30mg/kg foi capaz de reverter a expressão dessa citocina para os mesmos níveis de expressão do controle saudável no CPF e HC (figura 17).

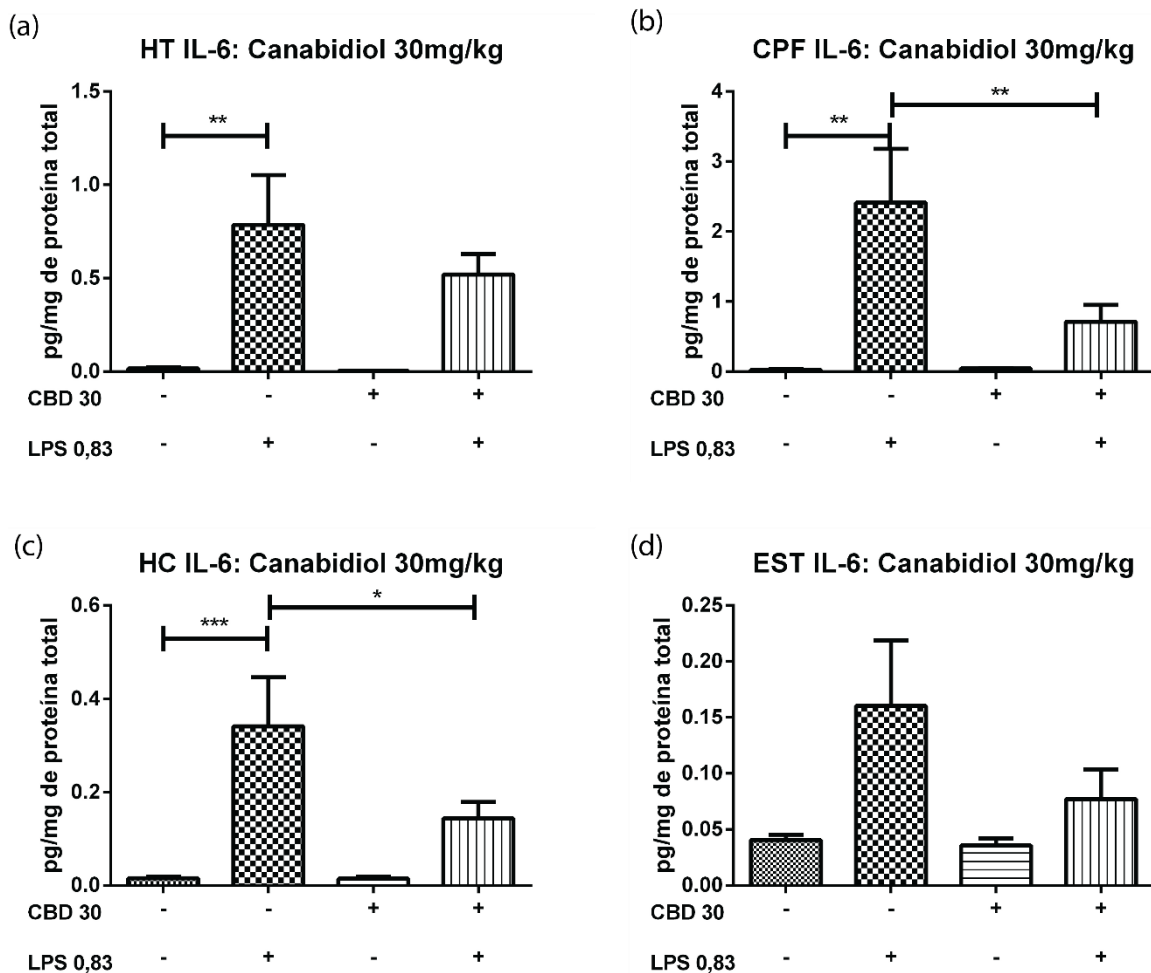


Figura 17: Expressão de IL-6 no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD. Resultados expressos em pg de IL-6/mg de proteínas no tecido (pg/mg, n=8). O modelo de SB apresentou níveis de IL-6 mais elevados que o controle no HT, CPF e HC ($***p<0,0005$, $**p<0,005$). O tratamento com CBD reduziu esses níveis no CPF e HC ($***p<0,0005$, $*p<0,05$). EST não apresentou diferença significativa. HT= hipotálamo; CPF=córtex pré-frontal; HC=hipocampo; EST=estriado; CBD x=canabidiol na dose "x" mg/kg; LPS 0,83=lipopolissacáride na dose de 0,83 mg/kg.

4.2.7 O modelo SB reduziu a expressão de IL-10 no CPF

As dosagens de todas as citocinas do método CBA foram realizadas no hipotálamo (a), córtex pré-frontal (b), hipocampo (c) e estriado (d). Os animais do grupo SB com LPS 0,83 mg/kg apresentaram redução significativa da expressão de IL-10 no CPF, com uma tendência ($p=0,06$) no HC. No entanto, o tratamento com CBD não foi capaz de restaurar os níveis de IL-10 em nenhuma das regiões analisadas (figura 18)

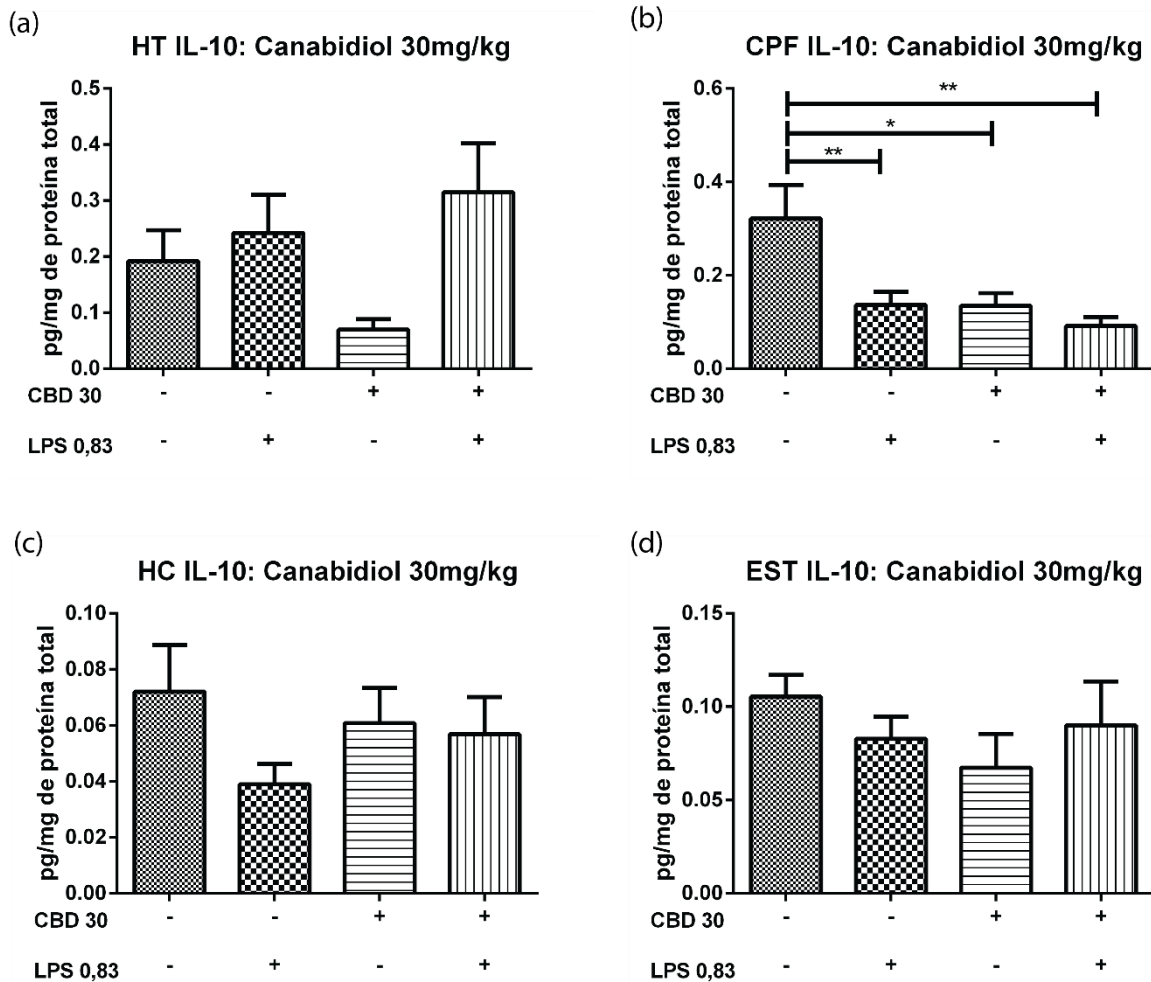


Figura 18: Expressão de IL-10 no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD. Resultados expressos em pg de IL-10/mg de proteínas no tecido (pg/mg, n=8). O modelo de SB reduziu os níveis de IL-10 no CPF em relação ao controle, assim como o CBD 30 mg/kg. Não houve diferença estatística nas outras regiões com o modelo ou o tratamento com CBD. HT= hipotálamo; CPF=córtex pré-frontal; HC=hipocampo; EST=estriado; CBD x=canabidiol na dose "x" mg/kg; LPS 0,83=lipopolissacáride na dose de 0,83 mg/kg.

4.2.8 CBD 30 mg/kg reduziu os níveis de TNF do modelo de SB no hipocampo

As dosagens de todas as citocinas do método CBA foram realizadas no hipotálamo (a), córtex pré-frontal (b), hipocampo (c) e estriado (d). O modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg não alterou a expressão de TNF em comparação com o grupo controle, embora tenha demonstrado tendência para aumento no HT ($p=0,08$). O tratamento com CBD na dose de 30 mg/kg reduziu a expressão dessa citocina no hipocampo em comparação com o modelo de SB ($*p<0,05$). Não houve diferença nos níveis de TNF nas outras regiões com o tratamento com CBD (figura 19).

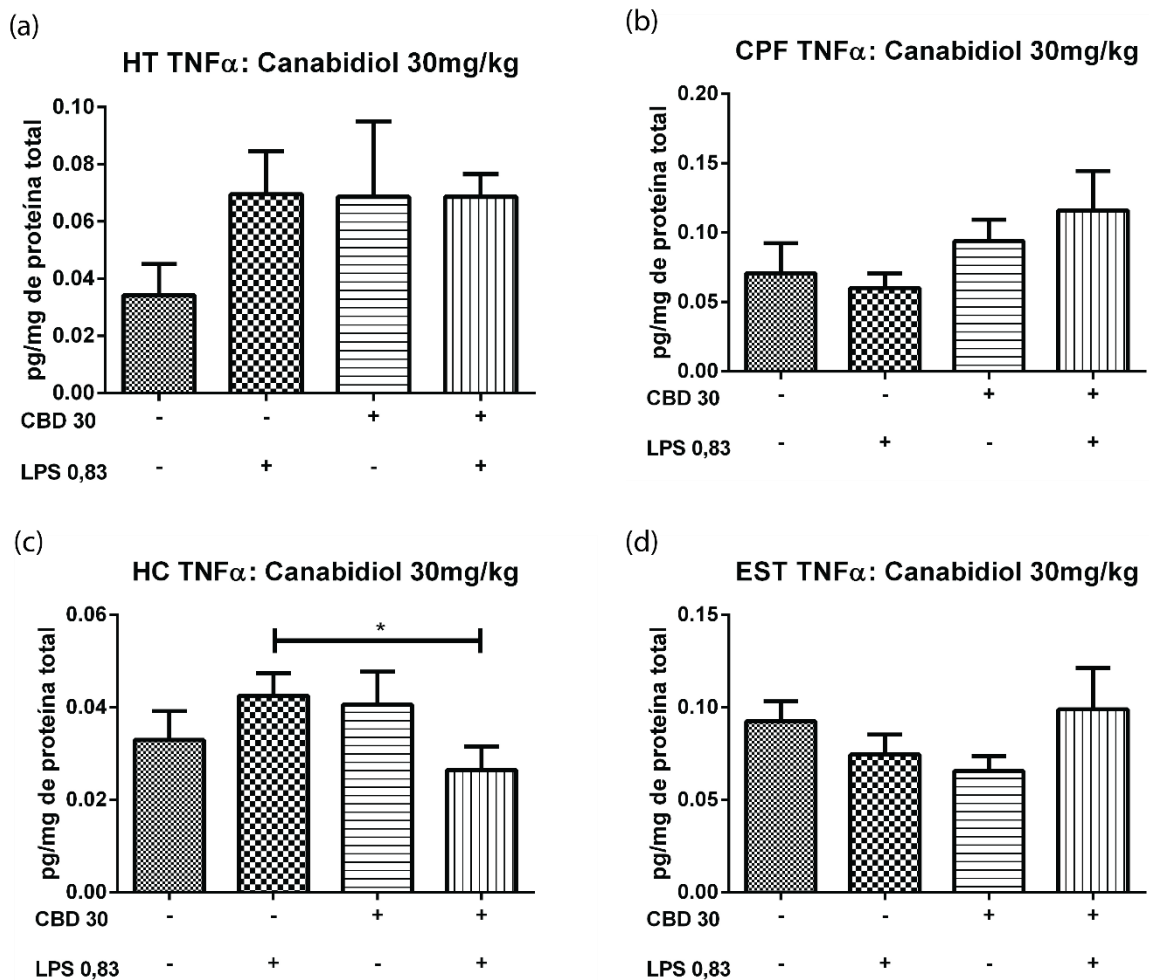


Figura 19: Expressão de TNF no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD. Resultados expressos em pg de TNF/mg de proteínas no tecido (pg/mg, n=8). O tratamento com CBD do modelo de SB reduziu os níveis de TNF no HC (c, $p<0,05$). HT= hipotálamo; CPF=córtex pré-frontal; HC=hipocampo; EST=estriado; CBD x=canabidiol na dose "x" mg/kg; LPS 0,83=lipopolissacáride na dose de 0,83 mg/kg.

4.2.9 Curva dose-resposta do CBD sobre a síntese de NGF e BDNF

Para avaliar os efeitos agudos do modelo de LPS sobre os fatores neurotróficos e qual interferência o tratamento com CBD teria sobre o modelo, os níveis cerebrais dos fatores neurotróficos NGF e BDNF foram quantificados no córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo (HC) através da técnica ELISA. Na primeira região, a análise estatística mostrou maior expressão de BDNF e NGF nos animais que receberam CBD 3mg/kg (CB3+S) em comparação com seu controle salina (V+S). Não houve diferença de expressão no CPF nas demais doses. No hipocampo, não houve alteração da expressão desses fatores neurotróficos em nenhuma dose analisada (tabela 3).

Tabela 3: Curva dose-resposta do CBD sobre BDNF e NGF no CPF e HC.

FN	Região	Concentração do FN (pg/mg de proteína total no tecido)				
		V+S	CBD 3+S	CBD 10+S	CBD 30+S	CBD 100+S
BDNF	CPF	22,7 ± 3,4	48,9 ± 9,6*	27,8 ± 3,5	28,6 ± 4,3	33,6 ± 4,9
	HC	9,85 ± 1,7	9,75 ± 2,3	21,9 ± 7,7	13,2 ± 2,5	18,7 ± 4,2
NGF	CPF	26,4 ± 4,3	61,4 ± 14,0*	36,5 ± 4,5	39,6 ± 6,4	47,9 ± 4,9
	HC	10,2 ± 2,0	12,4 ± 4,3	23,1 ± 6,6	16,8 ± 2,7	21,1 ± 3,1

*p<0,05

CPF=córtex pré-frontal; HC=hipocampo; FN=fator neurotrófico; BDNF=*brain derived neurotrophic factor*; NGF=*nerve growth factor*; CBD x=canabidiol na dose "x" mg/kg; S=salina 0,9%; V=veículo.

4.2.10 O modelo de SB aumentou a expressão de fatores neurotróficos no hipocampo e o tratamento com CBD reverteu essa alteração.

O modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg aumentou os níveis de BDNF e NGF no hipocampo em relação ao controle com salina (V+S). O tratamento com CBD reverteu essa alteração, devolvendo os níveis desses fatores neurotróficos para valores

equivalentes aos do grupo (V+S). Não houve diferença na expressão desses fatores no CPF pelo modelo SB e o tratamento com CBD 30 mg/kg não impactou nos níveis de BDNF e NGF (figura 20).

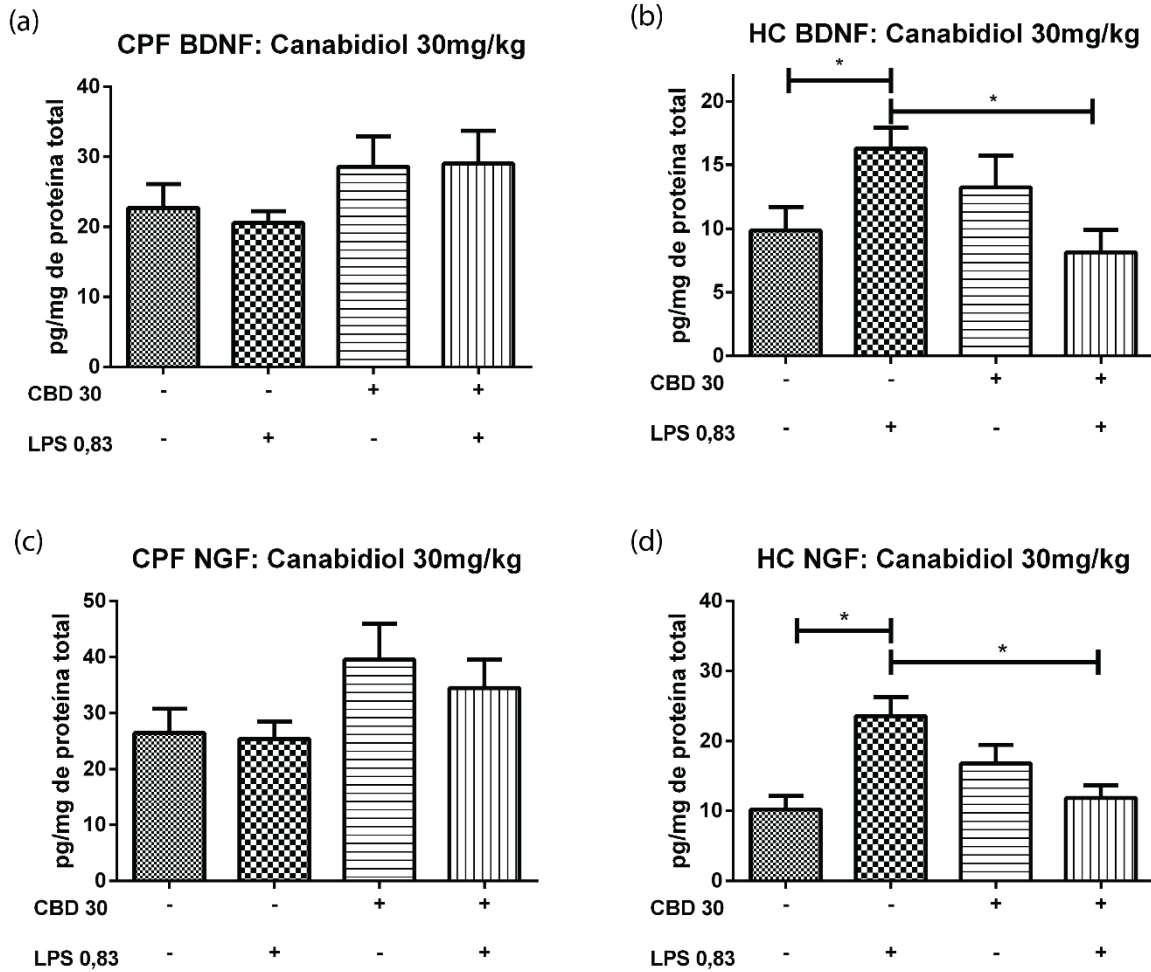


Figura 20: Expressão de NGF e BDNF no modelo de SB com LPS 0,83 mg/kg e o impacto do tratamento com CBD. Resultados expressos em pg de BDNF ou NGF/mg de proteínas no tecido (pg/mg, n=8). O modelo de SB apresentou níveis aumentados de BDNF e NGF no hipocampo em comparação com o grupo controle. O tratamento com CBD do modelo de SB reduziu os níveis de BDNF e NGF nas respectivas regiões. (b e d, *p<0,05). Não houve diferença da expressão desses fatores neurotróficos no CPF em nenhum dos grupos analisados. CPF=córtex pré-frontal; HC=hipocampo; BDNF=*brain derived neurotrophic factor*; NGF=*nerve growth factor*; CBD x=canabidiol na dose "x" mg/kg; LPS 0,83=lipopolissacáride na dose de 0,83 mg/kg.

5 Discussão

5.1 O *Sickness Behavior* altera o comportamento no teste *Burrowing*, mas não é um modelo de depressão.

Conforme demonstrado, mesmo em baixas doses (0,11 mg/kg), LPS é capaz de reduzir a quantidade de ração escavada no teste BUR (figuras 4 e 6). A reversibilidade com dexametasona endossa a etiologia inflamatória da alteração comportamental, reforçando o papel modulatório dos mediadores inflamatórios periféricos sobre o SNC. No entanto, o tratamento com CBD não provocou reversão no modelo de SB com LPS 0,11 mg/kg no BUR, em nenhuma das doses testadas (figura 7). Não obstante, a partir de 30mg/kg o próprio CBD piora o desempenho escavatório dos animais (figura 6). O teste BUR requer uma alta capacidade de organização, planejamento e função executiva (Deacon *et al.*, 2001) e, principalmente, de uma função hipocampal e pré-frontal preservada (Jirkof, 2014). Além disso, a complexidade da execução do comportamento requer um funcionamento ótimo do SNC (Jirkof, 2014), cuja alteração, mesmo que discreta ou inicial, é capaz de induzir alteração no BUR. A consequência dessa alta sensibilidade do teste é sua principal limitação: a perda de especificidade. O teste BUR mostrou-se alterado desde modelos de doença de Alzheimer (Deacon *et al.*, 2008; Sano *et al.*, 2009), doença causada por príons (Deacon *et al.*, 2001; Felton *et al.*, 2005), SB (Cunningham *et al.*, 2007; Teeling *et al.*, 2007; Cunningham *et al.*, 2009), doenças inflamatórias intestinais (Jirkof, 2014), até modelos de ansiedade (Line *et al.*, 2011), esquizofrenia (Ballard *et al.*, 2002; Halene *et al.*, 2009), e para rastreio de condições estressantes de manutenção dos animais (Rettich *et al.*, 2006). Dada a baixa sensibilidade do teste BUR, é possível que o modelo de SB com LPS 0,11 mg/kg tenha sido suficiente para gerar alterações nesse teste uma vez que uma discreta alteração na homeostase encefálica causada pelo estímulo periférico seja capaz de deturpar a execução de um comportamento tão complexo quanto a escavação. Dessa forma, o emprego do teste BUR para avaliação de comportamento tipo depressão ou a reversibilidade desse com o tratamento com canabinóides mostra-se inadequada.

No entanto, curiosamente, o CBD na dose de 30 mg/kg reduziu a escavação nos animais não submetidos a LPS em relação ao controle salina. Casarotto e colegas

demonstraram efeito ansiolítico no teste de esconder esferas em doses de CBD de 15, 30 e 60 mg/kg. Em relação ao emprego de BUR para avaliação de ansiedade, Line e colaboradores (Line *et al.*, 2011) utilizaram modelos KO e de super-expressão do 5-HTT. O primeiro grupo apresentou redução da quantidade de ração escavada enquanto o grupo com super-expressão desse transportador apresentou aumento da escavação. Dessa forma, é possível que a redução da escavação percebida na dose de 30mg/kg de CBD seja uma demonstração do efeito ansiolítico da droga, possivelmente mediado pelo efeito agonista sobre 5-HT_{1a}.

5.2 O modelo *Sickness Behavior* alterou os testes FST e OF. Isso o torna um modelo de depressão?

O FST, ao contrário do teste BUR, já é utilizado há vários anos para avaliação de modelos de comportamento depressivo em animais e, dessa forma, suas características já foram amplamente revisadas em trabalhos anteriores (Petit-Demouliere *et al.*, 2005; Matsuo *et al.*, 2010). Esse histórico de uso permitiu a construção de alguns critérios de validade para o FST como modelo e teste de comportamento depressivo, dentre os quais se destacam a confiabilidade e a validade preditiva. O primeiro critério refere-se à capacidade do teste de ter seus resultados replicados por outros experimentadores em condições semelhantes. A simplicidade do protocolo de execução e leitura do teste, a dispensabilidade de treinamento de camundongos e a replicabilidade do teste em outros laboratórios garantiram confiabilidade ao FST (Petit-Demouliere *et al.*, 2005). A validade preditiva compõe, juntamente com os critérios de validade de face e de constructo, uma tríade de conceitos originalmente elaborados por Willner (Willner, 1984) para avaliar e qualificar um modelo animal quanto a fidelidade da reprodução da depressão. Segundo Willner, a validade preditiva avalia a capacidade de um modelo identificar a ação antidepressivas de distintos mecanismos farmacológicos, sem cometer erros de omissão ou comissão e se há correlação entre a potência terapêutica no modelo e no transtorno (Willner, 1984). Aplicando tais conceitos, foi demonstrado por Borsini e Meli que o FST detecta 94% dos antidepressivos assumindo como atividade antidepressiva a redução do tempo de imobilidade em 20% (Borsini e Meli, 1988). Além disso, foi

demonstrado que, apesar do tratamento agudo provocar também redução da imobilidade, o tratamento crônico acentua essa redução (Petit-Demouliere *et al.*, 2005), consolidando a validade no modelo.

No presente estudo, o modelo de SB apresentou aumento do tempo de imobilidade no FST em relação ao seu controle, exposto apenas ao isolamento de 10 dias. Inicialmente, esse resultado sugeriu a existência de um comportamento tipo depressão no modelo de SB. No entanto, o teste OF demonstrou mobilidade diminuída, colocando em cheque a interpretação inicial anteriormente descrita, visto que a alteração do FST poderia decorrer, portanto, de uma redução global da capacidade de mobilidade do animal. A redução da mobilidade no teste OF é uma alteração intrínseca do SB manifestada até as primeiras horas pós indução do modelo, conforme demonstrado em diversos estudos (Yirmiya *et al.*, 1994; Yirmiya, 1996) (Swiergiel e Dunn, 2007), e desaparece após 24 horas do estímulo com LPS IP. Por outro lado, a alteração sobre o FST permanece além do período de 24 horas iniciais. Nesse momento, há predomínio do comportamento tipo depressão, vistos através de testes como o FST ou o teste de suspensão pela cauda, com remissão da alteração de mobilidade intrínseca ao SB. No presente estudo, a existência de um componente comportamental do tipo depressão no SB deve ser considerada, entretanto o FST não é capaz de distingui-lo da alteração de mobilidade intrínseca ao SB vista no OF.

Finalmente, a reversibilidade dessa alteração com o tratamento com CBD 30 mg/kg (figura 11) endossa o corpo de evidências dessa droga como um possível agente antidepressivo, e agora em um contexto inflamatório. Apesar do tratamento com CBD reverter a alteração no FST do modelo de SB, no presente estudo não foi evidenciada redução no tempo de imobilidade dos animais tratados com CBD 30 mg/kg em relação aos seus controles salina, como foi demonstrado em 2010 por Zanelati (Zanelati *et al.*, 2010). Tal fato pode decorrer da diferença entre as espécies e animais empregados nos dois estudos. Essa interação do CBD com o SB será melhor discutida adiante.

Apesar das diferenças entre os protocolos empregados, a comparação binária (alterado/não alterado) entre os resultados obtidos em ambos os modelos demonstra os diferentes propósitos de cada teste. A falta de especificidade e alta sensibilidade do teste BUR contrasta com a maior especificidade e menor sensibilidade no teste FST, visto que doses baixas (como 0,11 mg/kg) e sem isolamento não foram

suficientes para gerar alterações nesse último, enquanto grande impacto era percebido no BUR nessas doses.

5.3 Os marcadores inflamatórios do *Sickness Behavior* e seu papel no comportamento tipo depressão desse modelo.

Vários estudos demonstraram o envolvimento de citocinas inflamatórias e o TDM, conforme citado em Introdução. De maneira semelhante, a experimentação animal e humana demonstrou que o SB, consequência comportamental da estimulação imune exógena, pode ser induzido pela administração isolada de algumas citocinas, como IL-1 β e TNF, ou pela administração de um ligante de TLR, como o LPS.

O modelo induzido por LPS tem como característica a ativação difusa do sistema imune, com o recrutamento de leucócitos diversos e indução da síntese de várias citocinas. A atuação conjunta dessas substâncias determina a manifestação comportamental através da manipulação da função neural e dos circuitos. No entanto, a pluralidade de repercussões causadas pela atuação desses mediadores inflamatórios dificulta a identificação dos processos chaves para o SB. De maneira semelhante, no TDM tem-se também o aumento e a interação de diversas citocinas simultaneamente. Embora no TDM não possua uma endotoxina como desencadeante da sua fisiopatologia, há correspondência entre os achados séricos no TDM e no SB induzido por LPS. No entanto, as quantificações diretas dessas citocinas encontram como grande limitante as baixas índices de expressão dessas no SNC, eventualmente abaixo do limite de detecção das técnicas empregadas.

Apesar de fortemente envolvidas na fisiopatologia do SB, a síntese de IL-1 β e TNF nos modelos de SB com dose de 0,11 e 0,83 mg/kg não se mostrou alterada nas regiões do HT, CPF, HC ou ST seis horas após o estímulo periférico. Além disso, apesar da redução da expressão de IL-1 β no CPF com o tratamento com CBD na dose de 3mg/kg, a co-administração de LPS 0,11mg/kg e CBD 3 mg/kg restabeleceu os níveis de IL-1 β em CPF para valores próximos dos grupos controle e SB. As alterações nos níveis séricos dessas citocinas no SB é um achado relativamente conservado entre grupos de pesquisa diferentes (Gibb *et al.*, 2008; Custodio *et al.*,

2013; Gibb *et al.*, 2013; Mello *et al.*, 2013), com pico de TNF, IL-10 e IL-6 cerca de 1,5 horas após o estímulo IP com LPS e com o retorno aos níveis basais 24 horas após o estímulo com dose de 0,5 – 1.0 mg/kg de LPS. No entanto, essa análise não estava no escopo desse trabalho. Dessa forma, não é possível verificar diretamente a eficácia do estímulo dado em gerar as respostas periféricas necessárias para indução do SB. No entanto, as alterações comportamentais reproduzidas por ambos os modelos nos testes BUR, FST e OF sugerem a reprodução adequada do modelo. Em relação aos índices centrais dessas citocinas os achados são controversos. A análise de RNAm da IL-1 β e TNF nos modelos de SB induzidos por LPS demonstram aumento em várias regiões cerebrais, como HT (Ashley *et al.*, 2013), CPF, HC, cerebelo, córtex parieto-frontal (Turrin *et al.*, 2001) e núcleo do trato solitário (Gibb *et al.*, 2008). Em relação a IL-1 β e TNF, os níveis de RNAm são encontrados aumentados no CPF 1,5 horas do estímulo periférico, com pico ocorrendo 3 horas (Gibb *et al.*, 2013) após o estímulo e mantêm-se elevados 6 (Ashley *et al.*, 2013) e 9 (Park *et al.*, 2011) horas após. No hipocampo o pico de IL-1 β é atingindo 1,5 horas após o estímulo (Gibb *et al.*, 2013), mantendo-se elevado 6 horas e com retorno aos níveis basais após 24 horas (Terrando *et al.*, 2010). No entanto, a demonstração de RNAm denota uma propensão a síntese de determinada proteína e, em relação a IL-1 β por exemplo, se refere a síntese do seu precursor que, para se tornar ativo, requer ainda eventos pós-transcricionais (Neveu e Liege, 2000), ou seja, uma medida indireta do fenômeno. Dessa maneira, outros processos intermediários ainda podem interferir com a síntese de determinada citocina e o mais indicado seria a quantificação proteica.

Em relação a quantificação direta de IL-1 β , há maior variabilidade de relato entre grupos diferentes. Utilizando um protocolo de LPS IP na dose de 0,5 mg/kg, Custódio e colaboradores (Custodio *et al.*, 2013) encontraram níveis aumentados de IL-1 β no CPF 1,5 horas depois do estímulo que perdurou até 24 horas após. O mesmo grupo não identificou diferenças na expressão dessa citocina em nenhum dos tempos analisados (1,5 e 24 horas pós LPS) no HC e no ST. Em relação ao TNF, esse grupo não evidenciou diferença nos índices em nenhuma das três regiões analisadas. Por outro lado, outros dois grupos (Mello *et al.*, 2013; Tomaz *et al.*, 2014) encontraram níveis aumentados de IL-1 β no CPF, HC e ST 24 horas após o mesmo estímulo com LPS 0,5 mg/kg. Em outro modelo (Biesmans *et al.*, 2013), utilizando 2 doses de LPS (0,63 e 2,5 mg/kg) e análises em três tempos distintos (2, 6 e 24 horas após o estímulo

com LPS) os níveis de IL-1 β foram encontrados aumentados apenas 6 horas após estímulo com 2,5 mg/kg e normalizados 24 horas após. Os níveis de TNF mostraram-se aumentados 2 e 6 horas após o estímulo com ambas as doses e normalizados após 24 horas (Biesmans *et al.*, 2013). Porém, esse último estudo não estudou áreas cerebrais separadamente, impossibilitando comparações com o presente trabalho. Apesar de grande variabilidade dos resultados, um denominador comum entre o presente estudo e os demais é a baixa concentração dessas citocinas nos tecidos cerebrais, na ordem de picogramas/g de tecido ou proteína total no tecido. Dessa forma, é possível que grande parte das análises realizadas em tecidos cerebrais encontrem-se nos limites de detecção dos métodos empregados (ELISA), favorecendo imprecisões nas análises e consequentes falhas de detecção. É notável a ampla variação dos protocolos utilizados por grupos distintos bem como dos resultados obtidos. Varia-se não apenas o tempo, mas também a espécie de roedor utilizada, a dose de LPS empregada no modelo, o método de análise, o material e a região analisada. A falta de uniformidade entre os modelos utilizados por diferentes grupos dificulta a comparação em relação ao comportamento de IL-1 β no SB. Finalmente, no presente modelo não foram encontradas diferenças na expressão dessas citocinas em nenhuma das quatro regiões analisadas. Apesar de isoladamente serem capazes de gerar a alteração do SB a sua alteração pode não ser necessária no contexto inflamatório geral do modelo induzido por LPS.

Dentre as citocinas testadas, IL-10 é a única que exerce efeito anti-inflamatório e existe escassa literatura descrevendo a interação do SB com essa citocina especificamente. Ao contrário do presente estudo, Qin e colaboradores encontraram níveis cerebrais e séricos de RNAm de IL-10 elevados com a administração de doses elevadas de LPS (3mg/kg), assim como outras citocinas inflamatórias uma hora após o tratamento com LPS (Qin *et al.*, 2008).

Ao contrário das outras citocinas, IL-6 possui um receptor composto por duas cadeias peptídicas (Rose-John, 2012). A primeira, IL-6r, consiste da porção específica do receptor ancorado na membrana plasmática e é expresso por um número restrito de células, tais como hepatócitos e células do sistema imune periférico. No entanto, essa porção específica não é capaz de traduzir a sinalização para o meio intracelular, dada a sua pequena porção projetada para esse meio. Por outro lado, a segunda cadeia peptídica, chamada de gp130 (130 kDa), possui uma expressão ubíqua entre

tipos celulares e é responsável por essa sinalização intracelular após formar um dímero com a primeira cadeia (Kishimoto, 2005; Scheller *et al.*, 2006; Rose-John, 2012). Essa dimerização constitui a via clássica de sinalização da IL-6. No entanto, o IL-6r pode se destacar da membrana plasmática, constituindo o IL-6r solúvel (sIL-6r), encontrado normalmente no sangue e líquido céfalo-raquidiano. Após ligação com a IL-6, o IL-6r pode ligar-se com outras subunidades gp130 distribuídas em praticamente todos os tipos celulares, onde ativará cascatas intracelulares. As concentrações de sIL-6r sofrem significativo incremento na presença de resposta inflamatória ativa, em fluidos ricos em neutrófilos, viabilizando uma amplificação da sinalização de maneira mais específica e mais restrita às regiões que experimentam uma ativação imune prévia, através da maior síntese da porção sIL-6r. No modelo genético de superexpressão de IL-6, o emprego de anticorpos anti-IL-6 ou de gp130 solúvel (que se liga ao dímero IL-6-IL-6r, inativando-o) reduziram o tempo de imobilidade no TST e FST ao mesmo tempo que reduziram a expressão de IL-6 nos CPF, reforçando o papel de IL-6 no comportamento tipo depressivo bem como demonstrando seu importante papel como amplificador de sinal (Sukoff Rizzo *et al.*, 2012).

Os dados apresentados no presente estudo apontaram a IL-6 como importante mediador bioquímico para os achados, visto que a alteração nos seus índices acompanhou os achados comportamentais no FST. Conforme abordado previamente, a IL-6 possui papel crítico como moduladora e amplificadora da sinalização inflamatória, estimulando a síntese de citocinas e recrutamento das células envolvidas na resposta imune, como ativação de leucócitos, expressão de proteínas de adesão e produção de citocinas (Kishimoto, 2006). Diferentemente das citocinas anteriormente citadas, IL-6 não gera uma resposta comportamental do tipo SB quando administrada de maneira isolada periféricamente. De maneira semelhante, a injeção intracerebroventricular de doses até 100 ng/animal também não produziu alterações comportamentais significativas, alterando apenas a curva térmica e gerando ativação do eixo HPA (Lenczowski *et al.*, 1999). Por outro lado, a administração intratecal de altas doses de IL-6 (1000ng/animal) foi capaz de induzir uma alteração comportamental mais específica, com aumento do tempo de imobilidade ao FST e TST, cerca de 2 horas após o estímulo e com duração de até 48 horas após injeção (Sukoff Rizzo *et al.*, 2012). No entanto, essa alteração comportamental não reproduz

todo o espectro de alterações do SB, como redução da atividade locomotora ou outros sinais físicos, como piloereção e posição antálgica e é IL-1 β independente. Além disso, a infusão intratecal de IL-6 aumentou a expressão dessa interleucina no HT, CPF e HC (Sukoff Rizzo *et al.*, 2012), exatamente as mesmas regiões que esse estudo com LPS IP demonstrou. Dessa maneira, é possível inferir que a IL-6 está implicada na porção tipo depressiva do SB rastreado pelo FST. Nesse modelo específico, a IL-1 β possui pouca influência, o que é corroborado pela não alteração dos índices de IL-1 β no cérebro seguido da infusão de IL-6. No mesmo trabalho, Rizzo e colaboradores (Sukoff Rizzo *et al.*, 2012) utilizaram um modelo genético com aumento da expressão dos receptores de IL-6, cujo fenótipo inclui aumento da imobilidade ao FST e TST associado aumento dos índices de IL-6 no CPF e hipocampo. Nesse modelo genético, o tratamento com IL-1ra não reduziu o tempo de imobilidade no FST e TST assim como não teve impacto nos níveis cerebrais de IL-6, reforçando a independência de IL-1 β desse conjunto de alterações tipo depressivas. Além disso, o modelo acima citado possui resistência à atividade antidepressiva da fluoxetina, que só é eficaz nas doses mais altas. O SB tipo depressão induzido por IL-6 foi também estudado por Kong e colaboradores (Kong *et al.*, 2015), que demonstraram em modelos *in vitro* e *in vivo* a interação dessa citocina com o transportador 5-HTT. Nesse estudo, foi demonstrado que, através da ativação da via STAT3 (figura 1), a IL-6 induziu uma curiosa diminuição da expressão de RNAm de 5HTT e redução da recaptação do neurotransmissor 5-HT associada a indução paradoxal de alteração comportamental tipo depressão. O mesmo estudo demonstrou ainda que animais IL-6 KO apresentam menor expressão de 5-HTT (RNA e proteína), maior afinidade de ligação com ISRS, não apresentam fenótipo tipo depressão e menor efeito antidepressivo de ISRS. Conjuntamente, esses resultados sugerem a alteração comportamental tipo depressão induzida por IL-6 nos modelos animais é menos dependente da regulação serotoninérgica e que é possível que essa seja a causa da resistência ao tratamento exibido pelo modelo de Rizzo e colaboradores. Curiosamente, conforme dito anteriormente em Introdução, Yoshimura e colaboradores demonstraram que a resistência ao tratamento com ISRS também foi associada a maiores concentrações séricas de IL-6 em humanos (Yoshimura *et al.*, 2009). Conjuntamente essas observações destacam IL-6 como um importante fator e possível agente no TDM refratário ao tratamento com ISRS.

5.4 O Canabidiol como candidato a droga antidepressiva

Vários são os moduladores do sistema ECb, sintéticos ou naturais, disponíveis com diferentes índices seletividade pelos receptores canabinóides e até mesmo por outros receptores. Apesar de ser um derivado da planta *Cannabis sativa* e estar incluído na categoria dos canabinóides, o CBD é pouco seletivo para os receptores desse sistema (Burstein, 2015) e com mecanismo de ação parcialmente descrito e em constante investigação. Além disso, existem várias evidências de atuação em outros grupos de receptores, como descrito em Introdução.

No presente estudo, o CBD não alterou os tempos de imobilidade no FST quando comparado aos controles salina, ao contrário do observado no teste BUR, conforme discutido previamente. Por outro lado, no modelo de SB, o CBD foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade em relação ao controle SB, revertendo esses índices para próximo àqueles vistos nos controles salina. Achado semelhante, em um contexto não inflamatório, já foi evidenciado em outros estudos com CBD e FST (Zanelati *et al.*, 2010; Reus *et al.*, 2011; Sartim *et al.*, 2016). Curiosamente, no teste OF, o CBD não alterou a mobilidade dos animais no modelo SB ou nos animais controles salina. Esse resultado corrobora a hipótese da existência de um comportamento tipo depressão, reversível com o tratamento com CBD, subjacente à alteração de mobilidade induzida pelo modelo de SB, esse último não reversível pela droga. No entanto, a realização de novos experimentos, com um modelo de SB após resolução da alteração motora é indicado, viabilizando, assim a avaliação do CBD no comportamento tipo depressão.

Ainda permanece restrito o número de trabalhos que visam correlacionar fenômenos inflamatórios com o emprego do CBD como agente modulador em modelos de doenças do SNC. Mesmo utilizando termos genéricos como “*cytokines*” e “*cannabidiol*” uma breve busca no PUBMED retornou com apenas 40 registros com modelos inflamatórios diversos (busca realizada no dia 26/03/2016). No entanto, alguns achados encontram-se concordantes com o presente trabalho. Por exemplo, o tratamento com CBD reduziu a expressão sérica de várias citocinas, incluindo IL-6, em um modelo de asma em ratos (Vuolo *et al.*, 2015) e em um modelo de inflamação

pulmonar induzida por LPS (Ribeiro *et al.*, 2015). Adicionalmente, um estudo *in vitro* com culturas de células microgliais expostas a LPS demonstrou redução dose dependente da expressão de IL-1 β e IL-6, dentre outras citocinas com o tratamento com CBD (Kozela *et al.*, 2010). Posteriormente, em um modelo de neuroinflamação induzido por amiloide beta, o CBD reduziu a expressão de IL-1 β e outros marcadores inflamatórios *in vitro* e *in vivo* (Esposito *et al.*, 2011). Conjuntamente, essas evidências apontam um efeito anti-inflamatório para essa droga, concordando com os resultados adquiridos no presente estudo.

A modulação imuno-independente das vias serotoninérgicas através do CBD, por exemplo através dos receptores 5-HT_{1A} pode representar um mecanismo de ação terapêutico sobre o modelo de SB. O primeiro, um dos principais receptores serotoninérgicos, está envolvido na fisiopatologia clássica do TDM. Já foi demonstrada a capacidade de tratamento das manifestações comportamentais de SB com o uso de ISRS com correlação com a redução da expressão de citocinas (Yirmiya *et al.*, 2000). Além desse, o receptor de adenosina A_{2A}, expresso no principalmente no EST, participa da regulação da excitabilidade neural de acordo com a energia disponível (Hanff *et al.*, 2010). A ativação desses receptores nos neurônios espinhosos GABAérgicos das vias estriatais diretas e, principalmente, indiretas provavelmente estão envolvidos com as manifestações no desacoplamento entre motivação e ação existente no TDM. O emprego de agonistas desses receptores causa depressão comportamental (Hanff *et al.*, 2010). Algumas evidências apontam, inclusive, uma modulação da atividade desses receptores pelas citocinas inflamatórias, principalmente IL-1 β , uma vez que a administração de antagonistas de A_{2A} previnem o surgimento do SB, embora a ativação do mesmo não seja suficiente para gerar a alteração comportamental (Hanff *et al.*, 2010). No entanto, no presente estudo não foi demonstrado aumento significativo de IL-1 β ou TNF no SB 6 horas após estímulo com LPS IP enquanto os índices de IL-6 mostraram-se marcadamente aumentados. Dessa forma, não é possível atribuir majoritariamente os efeitos comportamentais ao aumento de atividade do 5-HTT induzida pela ativação da via p38/MAPK mediada por IL-1 α ou TNF α

Por outro lado, a reversão induzida pelo CBD dos níveis de IL-6 tanto no CPF quanto no HC pode representar o principal mecanismo de ação pelo qual essa droga atua terapêuticamente no componente *tipo depressivo* do modelo de SB. É provável

que a modulação mediada por IL-6 através da fosforilação de STAT3 seja responsável pela alteração comportamental, conforme demonstrado por Kong e colaboradores (Kong *et al.*, 2015). Essa mesma via está associada com redução da expressão de 5-HTT, fato que gera, portanto, um comportamento tipo depressão “atípico”, com menor recaptção de 5-HT. O tratamento com CBD provocou redução dos índices de IL-6 no CPF e HC bem como reversão do comportamento tipo depressão. Assim é possível que a ação terapêutica sobre o modelo tenha sido resultado da modulação das concentrações de IL-6 nas regiões analisadas. Ainda envolvendo IL-6, o decréscimo da sua expressão pode ser responsável pela redução dos níveis de síntese de IL-1 β e TNF no HC, dado o seu papel amplificador da sinalização inflamatória exercido predominantemente pela via intracelular da STAT3.

Finalmente não foram feitas análises acerca das vias intracelulares do IL-6 ou do funcionamento do sistema serotoninérgico ou de outros neurotransmissores envolvidos no presente estudo, tanto em relação ao modelo quanto ao agente terapêutico. Dessa maneira, a grande amplitude de alvos farmacológicos distintos para o CBD torna a definição da causalidade dos eventuais efeitos terapêuticos desse fármaco um desafio. Por outro lado, o CBD já é usado no tratamento de condições humanas, com farmacocinética já relativamente descrita (Huestis, 2007) e com segurança estabelecida. Esse fato viabiliza o emprego dessa droga mais rapidamente em protocolos experimentais humanos uma vez que sua eficácia esteja estabelecida em modelos animais. Assim, a interpretação desses resultados deve ser cautelosa e as evidências para o estabelecimento de umnexo causal ainda são frágeis, sendo necessários experimentos que incluam também análises dos sistemas monoaminérgicos.

5.5 O envolvimento dos fatores neurotróficos com o *Sickness Behavior*

Citados anteriormente em Introdução, alguns fatores neurotróficos possuem a sua expressão modulada por receptores serotoninérgicos, com os quais hipoteticamente estabelecem uma relação homeostática que pode estar deturpada no TDM. Além disso, citocinas inflamatórias estão implicadas diretamente no controle da neurogênese, como o IL-1 β , que diminuiu a citogênese e neurogênese tanto através

da interação com seu receptor IL-1r1 ou através da promoção de síntese de glicocorticoides e a administração de IL-1Ra preveniu esse decréscimo (Calabrese *et al.*, 2014). Assim como para IL-1, as funções de TNF são mais bem estabelecidas, promovendo decréscimo da proliferação de células-tronco neurais e aumento de apoptose, excitotoxicidade e processos neurodegenerativos (Calabrese *et al.*, 2014). Em relação a IL-6, também foi demonstrada redução da neurogênese de células progenitoras hipocâmpais em favorecimento de astrocitogênese. Por outro lado, IL-6 está envolvida também em vias neuroprotetoras em condições fisiológicas, como plasticidade neural, neurogênese e LTP (Calabrese *et al.*, 2014).

Os fatores neurotróficos geralmente encontram sua expressão reduzida em contextos neurodegenerativos, tais como a neuroinflamação e alguns autores descrevem as alterações dos níveis de expressão dos fatores num contexto agudo induzido por LPS. Primeiramente, análises de RNAm demonstraram diminuição da expressão de RNAm de BDNF no CPF e HC 4 horas após a exposição de camundongos C57BL/6 a 0,25mg/kg de LPS normalizando os seus níveis 48 horas após (Kranjac *et al.*, 2012). Em outro modelo, com avaliação 24 horas após o estímulo periférico, o tratamento com 0,5 mg/kg de LPS não alterou a expressão de BDNF no hipocampo, embora tenha prevenido o seu aumento induzido por doxiciclina (Mello *et al.*, 2013). Outro estudo (Schnydrig *et al.*, 2007) realizou a dosagem de BDNF e do seu precursor (pro-BDNF) em sinaptossomos e encontrou níveis reduzidos de ambos 48 horas depois no seu modelo de SB induzido por LPS (0,5mg/kg). A análise com 24 horas também não demonstrou alteração. Advogando em favor da técnica de dosagem dos sinaptossomos, Schnydrig e colaboradores (Schnydrig *et al.*, 2007) sugerem que os resultados controversos podem advir da dosagem de homogenato do tecido cerebral (como no presente trabalho), englobando BDNF estocado intracelularmente por células gliais e, portanto, não funcional no instante da análise (Schnydrig *et al.*, 2007). Confrontando esses resultados, o nosso modelo demonstrou aumento da expressão de BDNF e NGF 6 horas após a exposição a 0,83 mg/kg de LPS no hipocampo e essa alteração foi revertida com o tratamento com CBD (figura 20) Tomaz e colaboradores (Tomaz *et al.*, 2014), em concordância com o presente achado, fizeram a dosagem de BDNF e encontraram níveis aumentados 24 horas após a injeção IP de LPS 0,5mg/kg e conjecturaram a hipótese de se tratar de uma limitação do modelo de SB agudo.

6 Considerações finais

Conforme discutido previamente, no TDM, a literatura aponta de maneira mais uniforme o aumento da expressão das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF, principalmente em relação aos dois últimos. Analogamente, o aumento de IL-6 notado no presente modelo de SB e a sua reversibilidade com o tratamento com CBD destacam o papel dessa citocinas como um dos agentes críticos para o desenvolvimento da alteração comportamental do SB. Analogamente, algumas evidências demonstram redução dos níveis séricos dessa citocina com o tratamento farmacológico e não farmacológico antidepressivo em pacientes com TDM. Apesar de ser insuficiente para gerar uma resposta SB completa quando injetada perifericamente, o IL-6 é um importante amplificador de sinalização inflamatória entre as células imunes além de estar associado ao comportamento tipo depressão em outros modelos. O CBD, droga moduladora do sistema ECb e de vários outros receptores, possui ação antidepressiva em um contexto não inflamatório e, no presente modelo, demonstrou o mesmo efeito após estímulo com LPS. A reversibilidade da alteração comportamental correlacionada com a redução de IL-1 β , TNF e, principalmente, IL-6 pelo CBD o colocam numa posição de relevância como candidato antidepressivo.

No entanto, visto a multiplicidade de processos etiopatogênicos que estão em curso sob um mesmo “rótulo diagnóstico” de TDM, é necessário reconhecer a limitação do modelo de SB e dos testes empregados. Dessa forma, a investigação continuada dos processos fisiopatológicos subjacentes a esse quadro psiquiátrico é necessária e ganha força com a associação de novas tentativas terapêuticas em modelos animais.

7 Referências

- ASHLEY, N. T. et al. Sleep deprivation attenuates endotoxin-induced cytokine gene expression independent of day length and circulating cortisol in male Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). **J Exp Biol**, v. 216, n. Pt 14, p. 2581-6, Jul 15 2013. ISSN 1477-9145 (Electronic) 0022-0949 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23531821> >.
- ASNIS, G. M.; DE LA GARZA, R., 2ND. Interferon-induced depression in chronic hepatitis C: a review of its prevalence, risk factors, biology, and treatment approaches. **J Clin Gastroenterol**, v. 40, n. 4, p. 322-35, Apr 2006. ISSN 0192-0790 (Print) 0192-0790 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16633105> >.
- BALLARD, T. M. et al. Severe impairment of NMDA receptor function in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site results in drug-resistant nonhabituating hyperactivity. **J Neurosci**, v. 22, n. 15, p. 6713-23, Aug 1 2002. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12151550> >.
- BAMBICO, F. R. et al. Effect of delta-9-tetrahydrocannabinol on behavioral despair and on pre- and postsynaptic serotonergic transmission. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 38, n. 1, p. 88-96, Jul 2 2012. ISSN 1878-4216 (Electronic) 0278-5846 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22386778> >.
- BANKS, W. A. Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. **Curr Pharm Des**, v. 11, n. 8, p. 973-84, 2005. ISSN 1381-6128 (Print) 1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777248> >.
- BARBOSA, I. G. et al. Monocyte and lymphocyte activation in bipolar disorder: a new piece in the puzzle of immune dysfunction in mood disorders. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 18, n. 1, Oct 31 2014. ISSN 1469-5111 (Electronic) 1461-1457 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25539506> >.
- BARES, M. et al. Early reduction in prefrontal theta QEEG cordance value predicts response to venlafaxine treatment in patients with resistant depressive disorder. **Eur Psychiatry**, v. 23, n. 5, p. 350-5, Aug 2008. ISSN 0924-9338 (Print) 0924-9338 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18450430> >.
- BAYEWITCH, M. et al. The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. **FEBS Lett**, v. 375, n. 1-2, p. 143-7, Nov 13 1995. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7498464> >.
- BELTRAMO, M. et al. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. **Science**, v. 277, n. 5329, p. 1094-7, Aug 22 1997. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9262477> >.
- BENROS, M. E. et al. Autoimmune diseases and severe infections as risk factors for mood disorders: a nationwide study. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 8, p. 812-20, Aug 2013. ISSN 2168-6238 (Electronic) 2168-622X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23760347> >.
- BENTLEY, S. M.; PAGALILAUAN, G. L.; SIMPSON, S. A. Major depression. **Med Clin North Am**, v. 98, n. 5, p. 981-1005, Sep 2014. ISSN 1557-9859 (Electronic) 0025-7125 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25134869> >.
- BIESMANS, S. et al. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 271359, 2013. ISSN 1466-1861 (Electronic) 0962-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23935246> >.

BISOGNO, T. et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. **Br J Pharmacol**, v. 134, n. 4, p. 845-52, Oct 2001. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606325> >.

BLANKMAN, J. L.; SIMON, G. M.; CRAVATT, B. F. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. **Chem Biol**, v. 14, n. 12, p. 1347-56, Dec 2007. ISSN 1074-5521 (Print) 1074-5521 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096503> >.

BLUTHE, R. M. et al. Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 12, p. 4447-56, Dec 2000. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11122355> >.

BLUTHE, R. M. et al. Dual effect of central injection of recombinant rat interleukin-4 on lipopolysaccharide-induced sickness behavior in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 86-93, Jan 2002. ISSN 0893-133X (Print) 0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751035> >.

BLUTHE, R. M. et al. Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes. **Neuroreport**, v. 7, n. 15-17, p. 2823-7, Nov 4 1996. ISSN 0959-4965 (Print) 0959-4965 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8981475> >.

BLUTHE, R. M. et al. Synergy between tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in the induction of sickness behavior in mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, n. 2, p. 197-207, 1994. ISSN 0306-4530 (Print) 0306-4530 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8190839> >.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 94, n. 2, p. 147-60, 1988. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3127840> >.

BURSTEIN, S. Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. **Bioorg Med Chem**, v. 23, n. 7, p. 1377-85, Apr 1 2015. ISSN 1464-3391 (Electronic) 0968-0896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25703248> >.

BURTON, M. D.; SPARKMAN, N. L.; JOHNSON, R. W. Inhibition of interleukin-6 trans-signaling in the brain facilitates recovery from lipopolysaccharide-induced sickness behavior. **J Neuroinflammation**, v. 8, p. 54, 2011. ISSN 1742-2094 (Electronic) 1742-2094 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595956> >.

CALABRESE, F. et al. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 430, 2014. ISSN 1662-5102 (Electronic) 1662-5102 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25565964> >.

CAMPOS, A. C. et al. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 367, n. 1607, p. 3364-78, Dec 5 2012. ISSN 1471-2970 (Electronic) 0962-8436 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23108553> >.

CAPURON, L.; MILLER, A. H. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. **Pharmacol Ther**, v. 130, n. 2, p. 226-38, May 2011. ISSN 1879-016X (Electronic) 0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21334376> >.

CAPURON, L. et al. Anterior cingulate activation and error processing during interferon-alpha treatment. **Biol Psychiatry**, v. 58, n. 3, p. 190-6, Aug 1 2005. ISSN 0006-3223 (Print) 0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16084839> >.

- CAPURON, L. et al. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. **Mol Psychiatry**, v. 7, n. 5, p. 468-73, 2002. ISSN 1359-4184 (Print) 1359-4184 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12082564> >.
- CASTILLO, A. et al. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. **Neurobiol Dis**, v. 37, n. 2, p. 434-40, Feb 2010. ISSN 1095-953X (Electronic) 0969-9961 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19900555> >.
- CHANDLER, S. et al. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. **J Neuroimmunol**, v. 72, n. 2, p. 155-61, Feb 1997. ISSN 0165-5728 (Print) 0165-5728 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9042108> >.
- CHOURBAJI, S. et al. IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. **Neurobiol Dis**, v. 23, n. 3, p. 587-94, Sep 2006. ISSN 0969-9961 (Print) 0969-9961 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16843000> >.
- CHURCHILL, L. et al. Brain distribution of cytokine mRNA induced by systemic administration of interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha. **Brain Res**, v. 1120, n. 1, p. 64-73, Nov 20 2006. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17022949> >.
- CUNNINGHAM, C. et al. Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. **Biol Psychiatry**, v. 65, n. 4, p. 304-12, Feb 15 2009. ISSN 1873-2402 (Electronic) 0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18801476> >.
- CUNNINGHAM, C. et al. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 4, p. 490-502, May 2007. ISSN 0889-1591 (Print) 0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17321719> >.
- CUSTODIO, C. S. et al. Time course of the effects of lipopolysaccharide on prepulse inhibition and brain nitrite content in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 713, n. 1-3, p. 31-8, Aug 5 2013. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665499> >.
- DANTZER, R. Cytokine, sickness behavior, and depression. **Neurol Clin**, v. 24, n. 3, p. 441-60, Aug 2006. ISSN 0733-8619 (Print) 0733-8619 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16877117> >.
- _____. Cytokine, sickness behavior, and depression. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 29, n. 2, p. 247-64, May 2009. ISSN 1557-8607 (Electronic) 0889-8561 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19389580> >.
- DANTZER, R. et al. Molecular basis of sickness behavior. **Ann N Y Acad Sci**, v. 856, p. 132-8, Sep 29 1998. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9917873> >.
- DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 46-56, Jan 2008. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18073775> >.
- DAVIS, C. N. et al. IL-1beta induces a MyD88-dependent and ceramide-mediated activation of Src in anterior hypothalamic neurons. **J Neurochem**, v. 98, n. 5, p. 1379-89, Sep 2006. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16771830> >.

- DE LA GARZA, R., 2ND. Endotoxin- or pro-inflammatory cytokine-induced sickness behavior as an animal model of depression: focus on anhedonia. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 4-5, p. 761-70, 2005. ISSN 0149-7634 (Print)
0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878621> >.
- DE SOUZA BERNARDINO, T. C. et al. Wistar Audiogenic Rats (WAR) exhibit altered levels of cytokines and brain-derived neurotrophic factor following audiogenic seizures. **Neurosci Lett**, v. 597, p. 154-158, Apr 30 2015. ISSN 1872-7972 (Electronic)
0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25936592> >.
- DEACON, R. M. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. **Nat Protoc**, v. 1, n. 1, p. 118-21, 2006. ISSN 1750-2799 (Electronic)
1750-2799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406222> >.
- DEACON, R. M. et al. Age-dependent and -independent behavioral deficits in Tg2576 mice. **Behav Brain Res**, v. 189, n. 1, p. 126-38, May 16 2008. ISSN 0166-4328 (Print)
0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18261809> >.
- DEACON, R. M. et al. Burrowing into prion disease. **Neuroreport**, v. 12, n. 9, p. 2053-7, Jul 3 2001. ISSN 0959-4965 (Print)
0959-4965 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11435945> >.
- DECZKOWSKA, A.; BARUCH, K.; SCHWARTZ, M. Type I/II Interferon Balance in the Regulation of Brain Physiology and Pathology. **Trends Immunol**, v. 37, n. 3, p. 181-92, Mar 2016. ISSN 1471-4981 (Electronic)
1471-4906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26877243> >.
- DEUTSCH, D. G.; CHIN, S. A. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. **Biochem Pharmacol**, v. 46, n. 5, p. 791-6, Sep 1 1993. ISSN 0006-2952 (Print)
0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8373432> >.
- DI MARZO, V. The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. **Pharmacol Res**, v. 60, n. 2, p. 77-84, Aug 2009. ISSN 1096-1186 (Electronic)
1043-6618 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559360> >.
- DOWLATI, Y. et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biol Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 446-57, Mar 1 2010. ISSN 1873-2402 (Electronic)
0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20015486> >.
- EL-ALFY, A. T. et al. Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from Cannabis sativa L. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 95, n. 4, p. 434-42, Jun 2010. ISSN 1873-5177 (Electronic)
0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20332000> >.
- ESPOSITO, G. et al. Cannabidiol reduces Abeta-induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPARgamma involvement. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28668, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22163051> >.
- FAVA, M. et al. A comparison of mirtazapine and nortriptyline following two consecutive failed medication treatments for depressed outpatients: a STAR*D report. **Am J Psychiatry**, v. 163, n. 7, p. 1161-72, Jul 2006. ISSN 0002-953X (Print)
0002-953X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16816220> >.
- FELTON, L. M. et al. MCP-1 and murine prion disease: separation of early behavioural dysfunction from overt clinical disease. **Neurobiol Dis**, v. 20, n. 2, p. 283-95, Nov 2005. ISSN 0969-9961 (Print)
0969-9961 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15886005> >.

- FONSECA, B. M. et al. Endogenous cannabinoids revisited: a biochemistry perspective. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 102-103, p. 13-30, Apr-May 2013. ISSN 1098-8823 (Print) 1098-8823 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23474290> >.
- FRENOIS, F. et al. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 5, p. 516-31, Jun 2007. ISSN 0306-4530 (Print) 0306-4530 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17482371> >.
- FROMMBERGER, U. H. et al. Interleukin-6-(IL-6) plasma levels in depression and schizophrenia: comparison between the acute state and after remission. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 247, n. 4, p. 228-33, 1997. ISSN 0940-1334 (Print) 0940-1334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9332905> >.
- GERHARD, D. M.; WOHLER, E. S.; DUMAN, R. S. Emerging treatment mechanisms for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity. **Drug Discov Today**, Feb 6 2016. ISSN 1878-5832 (Electronic) 1359-6446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26854424> >.
- GIBB, J.; AL-YAWER, F.; ANISMAN, H. Synergistic and antagonistic actions of acute or chronic social stressors and an endotoxin challenge vary over time following the challenge. **Brain Behav Immun**, v. 28, p. 149-58, Feb 2013. ISSN 1090-2139 (Electronic) 0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23164949> >.
- GIBB, J. et al. Synergistic and additive actions of a psychosocial stressor and endotoxin challenge: Circulating and brain cytokines, plasma corticosterone and behavioral changes in mice. **Brain Behav Immun**, v. 22, n. 4, p. 573-89, May 2008. ISSN 1090-2139 (Electronic) 0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18191534> >.
- GIBNEY, S. M. et al. Poly I:C-induced activation of the immune response is accompanied by depression and anxiety-like behaviours, kynurenine pathway activation and reduced BDNF expression. **Brain Behav Immun**, v. 28, p. 170-81, Feb 2013. ISSN 1090-2139 (Electronic) 0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23201589> >.
- GLASER, S. T. et al. Evidence against the presence of an anandamide transporter. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 7, p. 4269-74, Apr 1 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12655057> >.
- GLOBAL BURDEN OF HEPATITIS, C. W. G. Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. **J Clin Pharmacol**, v. 44, n. 1, p. 20-9, Jan 2004. ISSN 0091-2700 (Print) 0091-2700 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681338> >.
- GOEHLER, L. E. et al. Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: a possible mechanism for immune-to-brain communication. **Brain Res Bull**, v. 43, n. 3, p. 357-64, 1997. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9227848> >.
- GOLD, P. W. The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. **Mol Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 32-47, Feb 2015. ISSN 1476-5578 (Electronic) 1359-4184 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25486982> >.
- GREDEN, J. F. The burden of disease for treatment-resistant depression. **J Clin Psychiatry**, v. 62 Suppl 16, p. 26-31, 2001. ISSN 0160-6689 (Print) 0160-6689 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11480881> >.
- GROTENHERMEN, F. Pharmacology of cannabinoids. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 25, n. 1-2, p. 14-23, Feb-Apr 2004. ISSN 0172-780X (Print) 0172-780X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15159677> >.

- HAASE, J.; BROWN, E. Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression--a central role for the serotonin transporter? **Pharmacol Ther**, v. 147, p. 1-11, Mar 2015. ISSN 1879-016X (Electronic) 0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25444754> >.
- HAFNER, S. et al. C-reactive protein is associated with polymorphisms of the angiotensin-converting enzyme gene in major depressed patients. **J Psychiatr Res**, v. 42, n. 2, p. 163-5, Jan 2008. ISSN 0022-3956 (Print) 0022-3956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17391703> >.
- HALENE, T. B. et al. Assessment of NMDA receptor NR1 subunit hypofunction in mice as a model for schizophrenia. **Genes Brain Behav**, v. 8, n. 7, p. 661-75, Oct 2009. ISSN 1601-183X (Electronic) 1601-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19563516> >.
- HANFF, T. C.; FURST, S. J.; MINOR, T. R. Biochemical and anatomical substrates of depression and sickness behavior. **Isr J Psychiatry Relat Sci**, v. 47, n. 1, p. 64-71, 2010. ISSN 0333-7308 (Print) 0333-7308 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20686201> >.
- HANNESTAD, J.; DELLAGIOIA, N.; BLOCH, M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 12, p. 2452-9, Nov 2011. ISSN 1740-634X (Electronic) 0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21796103> >.
- HARDINGHAM, G. E.; FUKUNAGA, Y.; BADING, H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. **Nat Neurosci**, v. 5, n. 5, p. 405-14, May 2002. ISSN 1097-6256 (Print) 1097-6256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11953750> >.
- HAYDON, P. G.; CARMIGNOTO, G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. **Physiol Rev**, v. 86, n. 3, p. 1009-31, Jul 2006. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16816144> >.
- HEGDE, V. L.; NAGARKATTI, P. S.; NAGARKATTI, M. Role of myeloid-derived suppressor cells in amelioration of experimental autoimmune hepatitis following activation of TRPV1 receptors by cannabidiol. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18281, Apr 01 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21483776> >.
- HILLARD, C. J. et al. Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. **J Neurochem**, v. 69, n. 2, p. 631-8, Aug 1997. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9231721> >.
- HILLARD, C. J.; JARRAHIAN, A. Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy. **Br J Pharmacol**, v. 140, n. 5, p. 802-8, Nov 2003. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12970089> >.
- HILLARD, C. J.; LIU, Q. S. Endocannabinoid signaling in the etiology and treatment of major depressive illness. **Curr Pharm Des**, v. 20, n. 23, p. 3795-811, 2014. ISSN 1873-4286 (Electronic) 1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24180398> >.
- HORWATH, E. et al. The validity of major depression with atypical features based on a community study. **J Affect Disord**, v. 26, n. 2, p. 117-25, Oct 1992. ISSN 0165-0327 (Print) 0165-0327 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1447429> >.
- HOWLETT, A. C. The cannabinoid receptors. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 68-69, p. 619-31, Aug 2002. ISSN 1098-8823 (Print) 1098-8823 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432948> >.

HOWREN, M. B.; LAMKIN, D. M.; SULS, J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. **Psychosom Med**, v. 71, n. 2, p. 171-86, Feb 2009. ISSN 1534-7796 (Electronic) 0033-3174 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19188531> >.

HUESTIS, M. A. Human cannabinoid pharmacokinetics. **Chem Biodivers**, v. 4, n. 8, p. 1770-804, Aug 2007. ISSN 1612-1880 (Electronic) 1612-1872 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17712819> >.

IVY, A. S. et al. Noradrenergic and serotonergic blockade inhibits BDNF mRNA activation following exercise and antidepressant. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 75, n. 1, p. 81-8, Apr 2003. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12759116> >.

JIRKOF, P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. **J Neurosci Methods**, v. 234, p. 139-46, Aug 30 2014. ISSN 1872-678X (Electronic) 0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24525328> >.

JONES, K. A.; THOMSEN, C. The role of the innate immune system in psychiatric disorders. **Mol Cell Neurosci**, v. 53, p. 52-62, Mar 2013. ISSN 1095-9327 (Electronic) 1044-7431 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064447> >.

KATONA, I.; FREUND, T. F. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. **Annu Rev Neurosci**, v. 35, p. 529-58, 2012. ISSN 1545-4126 (Electronic) 0147-006X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22524785> >.

KENDLER, K. S.; GARDNER, C. O.; PRESCOTT, C. A. Toward a comprehensive developmental model for major depression in women. **Am J Psychiatry**, v. 159, n. 7, p. 1133-45, Jul 2002. ISSN 0002-953X (Print) 0002-953X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12091191> >.

_____. Toward a comprehensive developmental model for major depression in men. **Am J Psychiatry**, v. 163, n. 1, p. 115-24, Jan 2006. ISSN 0002-953X (Print) 0002-953X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16390898> >.

KENT, S. et al. Sickness behavior as a new target for drug development. **Trends Pharmacol Sci**, v. 13, n. 1, p. 24-8, Jan 1992. ISSN 0165-6147 (Print) 0165-6147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1542935> >.

KENTNER, A. C. et al. Behavioral and physiological effects of a single injection of rat interferon-alpha on male Sprague-Dawley rats: a long-term evaluation. **Brain Res**, v. 1095, n. 1, p. 96-106, Jun 20 2006. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16712809> >.

KIM, M. H.; LEEM, Y. H. Chronic exercise improves repeated restraint stress-induced anxiety and depression through 5HT1A receptor and cAMP signaling in hippocampus. **J Exerc Nutrition Biochem**, v. 18, n. 1, p. 97-104, Mar 2014. ISSN 2233-6834 (Print) 2233-6834 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25566444> >.

KISHIMOTO, T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 1-21, 2005. ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771564> >.

_____. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. **Arthritis Res Ther**, v. 8 Suppl 2, p. S2, 2006. ISSN 1478-6362 (Electronic) 1478-6354 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899106> >.

KOHLER, S. et al. The serotonergic system in the neurobiology of depression: Relevance for novel antidepressants. **J Psychopharmacol**, v. 30, n. 1, p. 13-22, Jan 2016. ISSN 1461-7285 (Electronic) 0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26464458> >.

- KONG, E. et al. STAT3 controls IL6-dependent regulation of serotonin transporter function and depression-like behavior. **Sci Rep**, v. 5, p. 9009, Mar 11 2015. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25760924> >.
- KOZELA, E. et al. Cannabinoids Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. **J Biol Chem**, v. 285, n. 3, p. 1616-26, Jan 15 2010. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19910459> >.
- KRANJAC, D. et al. Peripheral bacterial endotoxin administration triggers both memory consolidation and reconsolidation deficits in mice. **Brain Behav Immun**, v. 26, n. 1, p. 109-21, Jan 2012. ISSN 1090-2139 (Electronic) 0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889586> >.
- KRISHNADAS, R.; CAVANAGH, J. Depression: an inflammatory illness? **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 83, n. 5, p. 495-502, May 2012. ISSN 1468-330X (Electronic) 0022-3050 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22423117> >.
- KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, Oct 16 2008. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923511> >.
- _____. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. **Am J Psychiatry**, v. 167, n. 11, p. 1305-20, Nov 2010. ISSN 1535-7228 (Electronic) 0002-953X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843874> >.
- LAMERS, F. et al. Identifying depressive subtypes in a large cohort study: results from the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). **J Clin Psychiatry**, v. 71, n. 12, p. 1582-9, Dec 2010. ISSN 1555-2101 (Electronic) 0160-6689 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20673552> >.
- LAPRAIRIE, R. B. et al. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. **Br J Pharmacol**, v. 172, n. 20, p. 4790-805, Oct 2015. ISSN 1476-5381 (Electronic) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26218440> >.
- LENCZOWSKI, M. J. et al. Central administration of rat IL-6 induces HPA activation and fever but not sickness behavior in rats. **Am J Physiol**, v. 276, n. 3 Pt 2, p. R652-8, Mar 1999. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10070124> >.
- LINE, S. J. et al. Opposing alterations in anxiety and species-typical behaviours in serotonin transporter overexpressor and knockout mice. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 21, n. 1, p. 108-16, Jan 2011. ISSN 1873-7862 (Electronic) 0924-977X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20863670> >.
- LIU, Y.; HO, R. C.; MAK, A. Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: a meta-analysis and meta-regression. **J Affect Disord**, v. 139, n. 3, p. 230-9, Aug 2012. ISSN 1573-2517 (Electronic) 0165-0327 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21872339> >.
- LO FERMO, S. et al. Outcome of psychiatric symptoms presenting at onset of multiple sclerosis: a retrospective study. **Mult Scler**, v. 16, n. 6, p. 742-8, Jun 2010. ISSN 1477-0970 (Electronic) 1352-4585 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20350959> >.
- LOFTIS, J. M. et al. Administration of pegylated interferon-alpha-2a or -2b does not induce sickness behavior in Lewis rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 31, n. 10, p. 1289-94, Nov 2006. ISSN 0306-4530 (Print) 0306-4530 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17049181> >.

- LONG, L. E. et al. A behavioural comparison of acute and chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in C57BL/6JArc mice. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 13, n. 7, p. 861-76, Aug 2010. ISSN 1469-5111 (Electronic) 1461-1457 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19785914> >.
- LUCACIU, L. A.; DUMITRASCU, D. L. Depression and suicide ideation in chronic hepatitis C patients untreated and treated with interferon: prevalence, prevention, and treatment. **Ann Gastroenterol**, v. 28, n. 4, p. 440-7, Oct-Dec 2015. ISSN 1108-7471 (Print) 1108-7471 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26424594> >.
- LUHESHI, G. N. et al. Vagotomy attenuates the behavioural but not the pyrogenic effects of interleukin-1 in rats. **Auton Neurosci**, v. 85, n. 1-3, p. 127-32, Dec 20 2000. ISSN 1566-0702 (Print) 1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11189019> >.
- MACEWAN, D. J. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. **Cell Signal**, v. 14, n. 6, p. 477-92, Jun 2002. ISSN 0898-6568 (Print) 0898-6568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11897488> >.
- MAES, M. et al. Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. **BMC Med**, v. 10, p. 66, 2012. ISSN 1741-7015 (Electronic) 1741-7015 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22747645> >.
- MAES, M. et al. The effects of psychological stress on leukocyte subset distribution in humans: evidence of immune activation. **Neuropsychobiology**, v. 39, n. 1, p. 1-9, 1999. ISSN 0302-282X (Print) 0302-282X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892853> >.
- MARCO, E. M. et al. Endocannabinoid system and psychiatry: in search of a neurobiological basis for detrimental and potential therapeutic effects. **Front Behav Neurosci**, v. 5, p. 63, 2011. ISSN 1662-5153 (Electronic) 1662-5153 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22007164> >.
- MARQUETTE, C. et al. IL-1beta, TNFalpha and IL-6 induction in the rat brain after partial-body irradiation: role of vagal afferents. **Int J Radiat Biol**, v. 79, n. 10, p. 777-85, Oct 2003. ISSN 0955-3002 (Print) 0955-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14630536> >.
- MATSUO, N. et al. Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. **Front Behav Neurosci**, v. 4, p. 29, 2010. ISSN 1662-5153 (Electronic) 1662-5153 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676234> >.
- MCALÉER, J. P.; VELLA, A. T. Understanding how lipopolysaccharide impacts CD4 T-cell immunity. **Crit Rev Immunol**, v. 28, n. 4, p. 281-99, 2008. ISSN 1040-8401 (Print) 1040-8401 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19166381> >.
- MCCUSKER, R. H.; KELLEY, K. W. Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. **J Exp Biol**, v. 216, n. Pt 1, p. 84-98, Jan 1 2013. ISSN 1477-9145 (Electronic) 0022-0949 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23225871> >.
- MCFARLAND, M. J. et al. A role for caveolae/lipid rafts in the uptake and recycling of the endogenous cannabinoid anandamide. **J Biol Chem**, v. 279, n. 40, p. 41991-7, Oct 1 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15292270> >.
- MCPARTLAND, J. M. et al. Are cannabidiol and Delta(9)-tetrahydrocannabinol negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. **Br J Pharmacol**, v. 172, n. 3, p. 737-53, Feb 2015. ISSN 1476-5381 (Electronic) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25257544> >.
- MECHOULAM, R.; PARKER, L. A. The endocannabinoid system and the brain. **Annu Rev Psychol**, v. 64, p. 21-47, 2013. ISSN 1545-2085 (Electronic)

- 0066-4308 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22804774> >.
- MELLO, B. S. et al. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **J Psychiatr Res**, v. 47, n. 10, p. 1521-9, Oct 2013. ISSN 1879-1379 (Electronic) 0022-3956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23835040> >.
- MEYERS, C. A. Mood and cognitive disorders in cancer patients receiving cytokine therapy. **Adv Exp Med Biol**, v. 461, p. 75-81, 1999. ISSN 0065-2598 (Print) 0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10442168> >.
- MICALE, V. et al. Endocannabinoid system and mood disorders: priming a target for new therapies. **Pharmacol Ther**, v. 138, n. 1, p. 18-37, Apr 2013. ISSN 1879-016X (Electronic) 0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261685> >.
- MICHOULAM, R.; SHVO, Y. Hashish. I. The structure of cannabidiol. **Tetrahedron**, v. 19, n. 12, p. 2073-8, Dec 1963. ISSN 0040-4020 (Print) 0040-4020 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5879214> >.
- MITCHELL, A. J.; VAZE, A.; RAO, S. Clinical diagnosis of depression in primary care: a meta-analysis. **Lancet**, v. 374, n. 9690, p. 609-19, Aug 22 2009. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19640579> >.
- MRAZEK, D. A. et al. A review of the clinical, economic, and societal burden of treatment-resistant depression: 1996-2013. **Psychiatr Serv**, v. 65, n. 8, p. 977-87, Aug 1 2014. ISSN 1557-9700 (Electronic) 1075-2730 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789696> >.
- MULLER, N.; MYINT, A. M.; SCHWARZ, M. J. Inflammatory biomarkers and depression. **Neurotox Res**, v. 19, n. 2, p. 308-18, Feb 2011. ISSN 1476-3524 (Electronic) 1029-8428 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20658274> >.
- MULLER, N.; SCHWARZ, M. J. The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. **Mol Psychiatry**, v. 12, n. 11, p. 988-1000, Nov 2007. ISSN 1359-4184 (Print) 1359-4184 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17457312> >.
- MULLER, N. et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. **Mol Psychiatry**, v. 11, n. 7, p. 680-4, Jul 2006. ISSN 1359-4184 (Print) 1359-4184 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16491133> >.
- MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61-5, Sep 2 1993. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7689702> >.
- NEMEROFF, C. B. Prevalence and management of treatment-resistant depression. **J Clin Psychiatry**, v. 68 Suppl 8, p. 17-25, 2007. ISSN 1555-2101 (Electronic) 0160-6689 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17640154> >.
- NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, Mar 28 2002. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11931738> >.
- NEVEU, P. J.; LIEGE, S. Mechanisms of behavioral and neuroendocrine effects of interleukin-1 in mice. **Ann N Y Acad Sci**, v. 917, p. 175-85, 2000. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11268342> >.
- NIERENBERG, A. A.; DECECCO, L. M. Definitions of antidepressant treatment response, remission, nonresponse, partial response, and other relevant outcomes: a focus on treatment-resistant depression. **J Clin Psychiatry**, v. 62 Suppl 16, p. 5-9, 2001. ISSN 0160-6689 (Print)

0160-6689 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11480882> >.

O'CONNOR, J. C. et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. **J Neurosci**, v. 29, n. 13, p. 4200-9, Apr 1 2009. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339614> >.

ODDI, S. et al. Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 5, p. 840-50, Mar 2008. ISSN 1420-682X (Print) 1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18213445> >.

PALIN, K. et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced sickness behavior is impaired by central administration of an inhibitor of c-jun N-terminal kinase. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 197, n. 4, p. 629-35, May 2008. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18274729> >.

PARK, S. E. et al. Insulin-like growth factor-I peptides act centrally to decrease depression-like behavior of mice treated intraperitoneally with lipopolysaccharide. **J Neuroinflammation**, v. 8, p. 179, 2011. ISSN 1742-2094 (Electronic) 1742-2094 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22189158> >.

PATEL, A. Review: the role of inflammation in depression. **Psychiatr Danub**, v. 25 Suppl 2, p. S216-23, Sep 2013. ISSN 0353-5053 (Print) 0353-5053 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995180> >.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 177, n. 3, p. 245-55, Jan 2005. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15609067> >.

PITT, D. et al. Glutamate uptake by oligodendrocytes: Implications for excitotoxicity in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 61, n. 8, p. 1113-20, Oct 28 2003. ISSN 1526-632X (Electronic) 0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14581674> >.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 88-109, Jan 2008. ISSN 0893-133X (Print) 0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17851537> >.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-2, Apr 21 1977. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/559941> >.

PRINS, J.; OLIVIER, B.; KORTE, S. M. Triple reuptake inhibitors for treating subtypes of major depressive disorder: the monoamine hypothesis revisited. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 20, n. 8, p. 1107-30, Aug 2011. ISSN 1744-7658 (Electronic) 1354-3784 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21682663> >.

PUNTENER, U. et al. Long-term impact of systemic bacterial infection on the cerebral vasculature and microglia. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 146, 2012. ISSN 1742-2094 (Electronic) 1742-2094 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22738332> >.

QIN, L. et al. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. **J Neuroinflammation**, v. 5, p. 10, 2008. ISSN 1742-2094 (Electronic) 1742-2094 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18348728> >.

RAISON, C. L.; CAPURON, L.; MILLER, A. H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends Immunol**, v. 27, n. 1, p. 24-31, Jan 2006. ISSN 1471-4906 (Print) 1471-4906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16316783> >.

- RETTICH, A. et al. The physiological and behavioral impact of sensory contact among unfamiliar adult mice in the laboratory. **J Appl Anim Welf Sci**, v. 9, n. 4, p. 277-88, 2006. ISSN 1088-8705 (Print) 1088-8705 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17209752> >.
- REUS, G. Z. et al. Administration of cannabidiol and imipramine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases brain-derived neurotrophic factor levels in the rat amygdala. **Acta Neuropsychiatr**, v. 23, n. 5, p. 241-8, Oct 2011. ISSN 0924-2708 (Print) 0924-2708 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25379896> >.
- RIBEIRO, A. et al. Cannabidiol improves lung function and inflammation in mice submitted to LPS-induced acute lung injury. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 37, n. 1, p. 35-41, Feb 2015. ISSN 1532-2513 (Electronic) 0892-3973 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25356537> >.
- ROMAN, A.; KREINER, G.; NALEPA, I. Macrophages and depression - a misalliance or well-arranged marriage? **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 6, p. 1663-72, 2013. ISSN 1734-1140 (Print) 1734-1140 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24553015> >.
- ROSE-JOHN, S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 9, p. 1237-47, 2012. ISSN 1449-2288 (Electronic) 1449-2288 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23136552> >.
- ROTHERMUNDT, M. et al. Different immune patterns in melancholic and non-melancholic major depression. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 251, n. 2, p. 90-7, 2001. ISSN 0940-1334 (Print) 0940-1334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11407444> >.
- RUSSO, E. B. et al. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. **Neurochem Res**, v. 30, n. 8, p. 1037-43, Aug 2005. ISSN 0364-3190 (Print) 0364-3190 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16258853> >.
- SAITO, K. et al. A mechanism for increased quinolinic acid formation following acute systemic immune stimulation. **J Biol Chem**, v. 268, n. 21, p. 15496-503, Jul 25 1993. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8340378> >.
- SANO, Y. et al. X11-like protein deficiency is associated with impaired conflict resolution in mice. **J Neurosci**, v. 29, n. 18, p. 5884-96, May 6 2009. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19420255> >.
- SARTIM, A. G.; GUIMARAES, F. S.; JOCA, S. R. Antidepressant-like effect of cannabidiol injection into the ventral medial prefrontal cortex-Possible involvement of 5-HT_{1A} and CB₁ receptors. **Behav Brain Res**, v. 303, p. 218-27, Apr 15 2016. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26801828> >.
- SCHAFERS, M.; SORKIN, L. Effect of cytokines on neuronal excitability. **Neurosci Lett**, v. 437, n. 3, p. 188-93, Jun 6 2008. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18420346> >.
- SCHEDLOWSKI, M.; ENGLER, H.; GRIGOLEIT, J. S. Endotoxin-induced experimental systemic inflammation in humans: a model to disentangle immune-to-brain communication. **Brain Behav Immun**, v. 35, p. 1-8, Jan 2014. ISSN 1090-2139 (Electronic) 0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24491305> >.
- SHELLER, J.; OHNESORGE, N.; ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. **Scand J Immunol**, v. 63, n. 5, p. 321-9, May 2006. ISSN 0300-9475 (Print) 0300-9475 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16640655> >.
- SCHIEPERS, O. J.; WICHERS, M. C.; MAES, M. Cytokines and major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 29, n. 2, p. 201-17, Feb 2005. ISSN 0278-5846 (Print) 0278-5846 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15694227> >.

SCHNYDRIG, S. et al. Peripheral lipopolysaccharide administration transiently affects expression of brain-derived neurotrophic factor, corticotropin and proopiomelanocortin in mouse brain. **Neurosci Lett**, v. 429, n. 1, p. 69-73, Dec 11 2007. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17976910> >.

SLUZEWSKA, A. et al. Interleukin-6 serum levels in depressed patients before and after treatment with fluoxetine. **Ann N Y Acad Sci**, v. 762, p. 474-6, Jul 21 1995. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7668562> >.

SRINIVASAN, D. et al. Cell type-specific interleukin-1beta signaling in the CNS. **J Neurosci**, v. 24, n. 29, p. 6482-8, Jul 21 2004. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15269258> >.

STELLA, N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. **Glia**, v. 58, n. 9, p. 1017-30, Jul 2010. ISSN 1098-1136 (Electronic) 0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20468046> >.

SUKOFF RIZZO, S. J. et al. Evidence for sustained elevation of IL-6 in the CNS as a key contributor of depressive-like phenotypes. **Transl Psychiatry**, v. 2, p. e199, 2012. ISSN 2158-3188 (Electronic) 2158-3188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23212583> >.

SWIERGIEL, A. H.; DUNN, A. J. Effects of interleukin-1beta and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 86, n. 4, p. 651-9, Apr 2007. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360031> >.

TEELING, J. L. et al. The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: Implications for a role of COX-1. **Brain Behav Immun**, v. 24, n. 3, p. 409-19, Mar 2010. ISSN 1090-2139 (Electronic) 0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19931610> >.

TEELING, J. L. et al. Sub-pyrogenic systemic inflammation impacts on brain and behavior, independent of cytokines. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 6, p. 836-50, Aug 2007. ISSN 0889-1591 (Print) 0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17367989> >.

TERRANDO, N. et al. The impact of IL-1 modulation on the development of lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction. **Crit Care**, v. 14, n. 3, p. R88, 2010. ISSN 1466-609X (Electronic) 1364-8535 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20470406> >.

TILLEUX, S.; HERMANS, E. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. **J Neurosci Res**, v. 85, n. 10, p. 2059-70, Aug 1 2007. ISSN 0360-4012 (Print) 0360-4012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17497670> >.

TOKARSKI, K. et al. Repeated administration of imipramine attenuates glutamatergic transmission in rat frontal cortex. **Neuroscience**, v. 153, n. 3, p. 789-95, May 15 2008. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18403127> >.

TOMAZ, V. S. et al. Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**, v. 268, p. 236-46, May 30 2014. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24662848> >.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. **Eur J Pharmacol**, v. 185, n. 1, p. 1-10, Aug 21 1990. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2171955> >.

TUGLU, C. et al. Increased serum tumor necrosis factor-alpha levels and treatment response in major depressive disorder. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 170, n. 4, p. 429-33, Dec 2003. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12955291> >.

- TURRIN, N. P. et al. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide. **Brain Res Bull**, v. 54, n. 4, p. 443-53, Mar 1 2001. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306198> >.
- VIVIANI, B.; GARDONI, F.; MARINOVICH, M. Cytokines and neuronal ion channels in health and disease. **Int Rev Neurobiol**, v. 82, p. 247-63, 2007. ISSN 0074-7742 (Print) 0074-7742 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17678965> >.
- VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 8, p. 626-40, Aug 2005. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16025096> >.
- VUOLO, F. et al. Evaluation of Serum Cytokines Levels and the Role of Cannabidiol Treatment in Animal Model of Asthma. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 538670, 2015. ISSN 1466-1861 (Electronic) 0962-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26101464> >.
- WANG, J. et al. Decreased immobility in swimming test by homologous interferon-alpha in mice accompanied with increased cerebral tryptophan level and serotonin turnover. **Neurosci Lett**, v. 452, n. 2, p. 96-100, Mar 13 2009. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19383422> >.
- WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 83, n. 1, p. 1-16, 1984. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6429692> >.
- YIRMIYA, R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. **Brain Res**, v. 711, n. 1-2, p. 163-74, Mar 4 1996. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8680860> >.
- YIRMIYA, R. et al. Illness, cytokines, and depression. **Ann N Y Acad Sci**, v. 917, p. 478-87, 2000. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11268375> >.
- YIRMIYA, R. et al. Behavioral effects of lipopolysaccharide in rats: involvement of endogenous opioids. **Brain Res**, v. 648, n. 1, p. 80-6, Jun 13 1994. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7922530> >.
- YOSHIMURA, R. et al. Higher plasma interleukin-6 (IL-6) level is associated with SSRI- or SNRI-refractory depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 4, p. 722-6, Jun 15 2009. ISSN 1878-4216 (Electronic) 0278-5846 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19332097> >.
- YOUNG, J. J.; BRUNO, D.; POMARA, N. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. **J Affect Disord**, v. 169, p. 15-20, Dec 2014. ISSN 1573-2517 (Electronic) 0165-0327 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25128861> >.
- ZANELATI, T. V. et al. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. **Br J Pharmacol**, v. 159, n. 1, p. 122-8, Jan 2010. ISSN 1476-5381 (Electronic) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20002102> >.
- ZHU, C. B.; BLAKELY, R. D.; HEWLETT, W. A. The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 10, p. 2121-31, Oct 2006. ISSN 0893-133X (Print) 0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452991> >.

ZHU, C. B. et al. p38 MAPK activation elevates serotonin transport activity via a trafficking-independent, protein phosphatase 2A-dependent process. **J Biol Chem**, v. 280, n. 16, p. 15649-58, Apr 22 2005. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728187> >.

ZHU, C. B. et al. Interleukin-1 receptor activation by systemic lipopolysaccharide induces behavioral despair linked to MAPK regulation of CNS serotonin transporters. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 13, p. 2510-20, Dec 2010. ISSN 1740-634X (Electronic) 0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20827273> >.