



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação das consequências comportamentais da administração de um inibidor da via do TLR4 no córtex pré-frontal medial após exposição ao estresse e possível envolvimento do sistema endocanabinoide

Fábio José Coelho de Souza Junior

RIBEIRÃO PRETO-SP

2023

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

FÁBIO JOSÉ COELHO DE SOUZA JUNIOR

Avaliação das consequências comportamentais da administração de um inibidor da via do TLR4 no córtex pré-frontal medial após exposição ao estresse e possível envolvimento do sistema endocanabinoide

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a. Dra. Sabrina Francesca de Souza Lisboa

RIBEIRÃO PRETO-SP

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

Souza-Junior, Fabio José Coelho

Avaliação das consequências comportamentais da administração de um inibidor da via do TLR4 no córtex pré-frontal medial após exposição ao estresse e possível envolvimento do sistema endocanabinoide

Ribeirão Preto, 2023.

126 p.: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: . Lisboa, Sabrina Francesca de Souza.

1. TLR4.
2. Estresse.
3. Sistema endocanabinoide.
4. Antidepressivo.
5. Ansiolítico.
6. TAK-242.
7. Neuroimune.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Souza-Junior, Fábio José Coelho

Título: Avaliação das consequências comportamentais da administração de um inibidor da via do TLR4 no córtex pré-frontal medial após exposição ao estresse e possível envolvimento do sistema endocanabinoide

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: **Farmacologia**

Aprovado em: ____/____/ 2023

Banca examinadora

Julgamento: _____ Assinatura _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____



DEDICATÓRIA

*Aos meus avós, mãe e irmã, pelo
amor incondicional e aos amigos pela
inspiração e carinho.*



AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

"Ao ser superior, que é aquele que é, que tem guiado minha vida com maestria, que escreve realmente certo e tem possibilitado sempre voos mais altos para alçar.

À minha mãe Jane, que de forma incondicional renunciou a si mesma, colocando sempre seus filhos em primeiro lugar. Agradeço por cada lágrima que ela derramou silenciosamente, buscando sempre dar o melhor aos seus amados filhos. Sua dedicação e amor inabaláveis são uma fonte constante de inspiração para mim.

À minha querida irmã Emilly, expresso minha gratidão por ter sido um ponto de apoio constante em minha vida. Sou grato por ela ter me presenteado com um dos maiores tesouros da minha vida, meu amado sobrinho.

À minha amada avó Domingas, que se autodenomina minha maior fã. Mesmo quando o palco está com as luzes apagadas, ela está sempre ao meu lado, apoiando e incentivando todos os meus projetos, mesmo que isso cause a ela uma enorme saudade. Sua presença amorosa e constante em minha vida é um verdadeiro tesouro. Agradeço por seu apoio incondicional, por acreditar em mim e por ser minha fonte de inspiração.

Ao meu avô José, que assumiu o papel de pai na ausência dessa figura paterna, expresso minha imensa gratidão. Agradeço por seu amor, cuidado e por ser um pilar de apoio em minha vida. Sua presença e sacrifício nunca serão esquecidos.

Aos meus avós paternos, Fátima e José (in memoriam), que sempre foram fontes de apoio e inspiração na prática docente. Assim como minhas tias Cláudia e Flávia e Maria Dilma.

À minha querida irmã de alma, Maíra. Ela tem sido uma fonte constante de inspiração, companheirismo e amor ao longo dessa jornada. Sua presença em minha vida tem sido um verdadeiro presente, e sou grato por cada momento compartilhado e por seu apoio incondicional. Ao meu irmão Lírio, que partiu repentinamente, deixando-me fisicamente sozinho. Apesar da sua ausência, tenho a certeza de que ele está comigo a cada palavra escrita nesta dissertação. Seu espírito e seu amor permanecem vivos em minhas lembranças e em meu coração. Sua partida precoce me ensinou a valorizar cada momento e a buscar a grandeza em tudo o que faço. Eternos PSSE!

À todas as minhas amigas de vida, Juliana, Landara, Cintia e tantos outros amigos, que estiveram torcendo por mim durante essa emocionante aventura. Vocês aguardaram ansiosamente meu

retorno ao estado do açaí e seu apoio inabalável foi uma fonte constante de motivação. Sou imensamente grato por ter amigos tão especiais, que estiveram ao meu lado, mesmo à distância, torcendo pelo meu sucesso. Valorizo imensamente nossa amizade e desejo que ela perdure sempre.

Às minhas irmãs, que foram minha família em Ribeirão Preto, Lyzandra e Daniela. Durante toda essa jornada, vocês foram meu apoio emocional, financeiro e meu porto seguro. A presença constante de vocês, o suporte incondicional e o amor inabalável que recebi de cada uma foram fundamentais para minha força e determinação. Agradeço do fundo do meu coração por estarem ao meu lado, por me encorajarem nos momentos difíceis e por celebrarem as conquistas ao meu lado.

À Laura, minha querida amiga. Sua amizade foi e continuará sendo um dos maiores presentes que o laboratório pôde me proporcionar. Ao longo dessa jornada, sua presença, apoio e companheirismo foram inestimáveis. Agradeço de todo coração pelo carinho constante que você me dedicou. Obrigado por todo o amor, cuidado e pela conexão única que temos.

Ao meu refúgio, Yurie, Sávio e Arthur. A cada escuta atenta, abraço reconfortante, conversa sincera e café compartilhado, vocês trouxeram luz e amor à minha vida. Sou imensamente grato por cada momento que passamos juntos e por todos os sorrisos que vocês me proporcionaram. Vocês deixaram uma marca indelével em minha memória e em meu coração, e guardarei com carinho cada lembrança dos momentos felizes que compartilhamos.

Ao laboratório de Neuropsicofarmacologia, um "organismo vivo" composto por indivíduos que enriquecem o ambiente com suas mentes incríveis. A todos os amigos do laboratório e do programa de farmacologia, meu carinho e gratidão são imensuráveis. Cada um de vocês, Bruna (K9), Milena, Anísia, Letícia, Kennia, Fernanda, Anna Paula, Antônio, Julia, Lorena, Luana, Izabela, Marco, Vitor, Pedro, Larissa, Lívia, Débora (Uber) e tantos outros que passaram pelo nosso laboratório e cruzaram meu caminho, contribuíram de forma significativa para o meu crescimento pessoal e profissional. A troca de conhecimentos, as colaborações e as experiências compartilhadas foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e para o enriquecimento da minha jornada acadêmica. Sou grato por cada interação, apoio mútuo e momentos compartilhados. Guardarei para sempre em meu coração as lembranças e aprendizados adquiridos ao lado de cada um de vocês. Obrigado por fazerem parte dessa jornada e por tornarem o laboratório um lugar inspirador e acolhedor.

A professora Dra. Sâmia Joca, sua disposição em compartilhar seus conhecimentos são de extrema importância em minha jornada acadêmica e profissional. Tornando-se uma verdadeira fonte de inspiração, e incentivo em meu crescimento pessoal e intelectual.

À querida Gaby, que desempenhou um papel fundamental como ponto de apoio nesse projeto. Seus ensinamentos técnicos e científicos foram inestimáveis e tiveram um impacto significativo no sucesso deste trabalho. Sua contribuição foi essencial, fornecendo insights valiosos, orientações precisas e expertise em áreas-chave. Além disso, sua dedicação em compartilhar seu conhecimento e estar sempre disponível para esclarecer dúvidas foi extremamente valiosa. Sou grato por ter tido a oportunidade de aprender com alguém tão talentosa e generosa. Seu apoio foi fundamental para alcançarmos os resultados deste trabalho e sou imensamente grato por tudo o que você fez por mim e por este projeto.

À minha grande amiga Mariana Fronza. Sem a sua ajuda, os ensinamentos que você compartilhou e até mesmo os seus puxões de orelha, uma parte fundamental deste trabalho simplesmente não existiria. Agradeço de coração por acreditar em mim e por estar sempre disponível para me ouvir e me aconselhar. A sua orientação e apoio foram inestimáveis durante todo o processo, e sou verdadeiramente grato por ter tido a sorte de contar com você como uma fonte de inspiração e amizade. Obrigado, Dra. Mary, por ter contribuído de maneira tão significativa para o sucesso deste trabalho.

A todo corpo técnico da FCFRP pelo apoio e por manterem a organização do laboratório e afins, e em especial à Miriam Coutinho, por seu papel fundamental neste projeto. Com maestria, ela compartilhou seu vasto conhecimento sobre técnicas de cirurgia e, além disso, transmitiu a importância do comprometimento com o trabalho. Sua dedicação e habilidades proporcionaram uma experiência de aprendizado enriquecedora e motivadora. Sou grato por ter tido a oportunidade de aprender com alguém tão competente e inspiradora.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão aos funcionários do Depto. de Farmacologia. Em especial a Gislaine, pelo seu trabalho incansável e dedicação em auxiliar e facilitar minha jornada acadêmica. Sua eficiência e competência em lidar com todas as questões burocráticas e administrativas foram fundamentais para o bom andamento do meu percurso como discente. Além disso, sua simpatia e prontidão em prestar assistência sempre que necessário tornaram minha experiência ainda mais positiva. Agradeço sinceramente por todo o suporte e pela paciência demonstrada ao longo do tempo. Seu comprometimento e profissionalismo são

essenciais para o sucesso do programa de pós-graduação, e sou grato por tê-la como parte dessa equipe.

À minha querida orientadora Dra. Sabrina Lisboa, expresso minha profunda gratidão pela sua inestimável ajuda, orientação e dedicação durante todo o período em que fui seu aluno de mestrado. Agradeço sinceramente pela confiança depositada em mim. Sua vasta experiência e conhecimento foram essenciais para o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa, contribuindo significativamente para o aprimoramento das minhas habilidades e compreensão na área. Desejo-lhe um contínuo sucesso em sua carreira e que você possa continuar guiando e inspirando outros estudantes, assim como fez comigo. Fico na esperança de que nossos caminhos se cruzem novamente no futuro, para que eu possa expressar pessoalmente minha gratidão e compartilhar os resultados dos nossos esforços conjuntos.

Aos membros da banca pelo tempo dedicado e pelas contribuições para melhoria desse trabalho.

À Universidade de São Paulo, por me proporcionar uma excelente formação acadêmica e científica, com oportunidades jamais imaginadas.

Às agências de fomento FAPESP, CAPES e CNPQ, pelo apoio financeiro. Vida longa às nossas agências de fomento à pesquisa.

Por fim, essa dissertação é o resultado do esforço e dedicação de inúmeros brasileiros, que investem tempo e recursos financeiros na busca por um país melhor. De todos que compartilham a crença em um Brasil que ofereça oportunidades para todos e que seja palco de transformações revolucionárias. Portanto, essa dissertação é uma homenagem a esses guerreiros anônimos, que, independentemente de sua profissão ou posição social, mantêm viva a chama da esperança em um Brasil melhor.

*“I am writing a longer letter than usual
because there is not enough time to write
short one.”*

Blaise Pascal, *Lettres Provinciales* (ca.1657)



RESUMO

RESUMO

Souja-Junior, F. J. C. **Avaliação das consequências comportamentais da administração de um inibidor da via do TLR4 no córtex pré-frontal medial após exposição ao estresse e possível envolvimento do sistema endocanabinoide.** 2023. 126 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O estresse é definido como qualquer estímulo que apresente um desequilíbrio à homeostasia, sendo uma ameaça real ou percebida ao bem-estar de um organismo. Disfunções do sistema imunológico podem ser desencadeadas devido à exposição ao estresse, tendo a participação de diversos mediadores inflamatórios, incluindo enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), o fator nuclear kappa B (NFκB), e o receptor do tipo toll-4 (TLR4), em áreas encefálicas, como o córtex pré-frontal medial (CPFm). O receptor TLR4, presente em células do sistema imune inato, como macrófagos e micróglia, parece estar envolvido no fenótipo pró-inflamatório após estresse, particularmente no CPF. Entretanto, seu envolvimento local no CPFm para modulação da resposta comportamental frente ao estresse ainda precisa ser elucidado. Além disso, outro sistema que sofre influência do estresse, presente tanto no sistema nervoso central quanto em células do sistema imune, é o sistema endocanabinoide (eCB). Tendo em vista os mecanismos fisiopatológicos ocasionados pelo estresse, o objetivo do projeto é avaliar o envolvimento da via do receptor TLR4 no CPFm nas consequências comportamentais do estresse agudo e a possível participação da sinalização endocanabinoide. Para isso, avaliamos as respostas comportamentais de animais submetidos ao estresse de restrição agudo, com cânulas-guia direcionadas ao CPFm. Sete dias após a recuperação da cirurgia, os animais foram submetidos ao Teste do Campo Aberto (TCA), para avaliar possíveis alterações motoras ocasionadas pelo estresse da cirurgia ou durante o período de recuperação. Vinte e quatro horas após a avaliação do comportamental basal, os animais receberam injeção local do veículo (DMSO 100%) ou do inibidor de TLR4 (TAK-242), 10 minutos antes de serem submetidos ao protocolo de estresse de restrição (ER). Depois da sessão de estresse, os ratos foram alocados individualmente em caixas-moradia, assim como o grupo naíve. Após 24 horas os animais foram submetidos aos testes LCE e TNF, e ao final da avaliação comportamental foram coletadas amostras de sangue e tecidos cerebrais. Em nossos achados o ER aumentou o tempo de imobilidade TNF, aumentou os níveis plasmáticos de corticosterona e induziu a expressão gênica de TLR4 no CPFm. Além disso, a modulação farmacológica com TAK-242 em diferentes doses preveniu os efeitos do ER. Em suma, os dados sugerem que uma única exposição ao ER é capaz de promover alterações no sistema neuroimunológico no CPFm por meio da ativação da via do TLR4, desencadeando mudanças no fenótipo comportamental, que também podem ter sido influenciadas pelo aumento da corticosterona plasmática.

Palavras-chave: TLR4, Estresse, Sistema endocanabinoide, Antidepressivo, Ansiolítico, TAK-242, Neuroimune.



ABSTRACT

ABSTRACT

Souza-Junior, F. J. C. **Evaluation of the behavioral consequences of administering a TLR4 pathway inhibitor in the medial prefrontal cortex after exposure to stress and possible involvement of the endocannabinoid system.** 2023. 126 p. Dissertation (Master's) - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Stress is defined as any stimulus that disrupts homeostasis, posing a real or perceived threat to the well-being of an organism. Dysfunctions of the immune system can be triggered by exposure to stress, involving various inflammatory mediators, including the inducible nitric oxide synthase enzyme (iNOS), nuclear factor kappa B (NF κ B), and toll-like receptor 4 (TLR4) in brain areas such as the medial prefrontal cortex (mPFC). The TLR4 receptor, present in cells of the innate immune system such as macrophages and microglia, appears to be involved in the pro-inflammatory phenotype following stress, particularly in the mPFC. However, its local involvement in the mPFC for the modulation of behavioral responses to stress still needs to be elucidated. Additionally, another system influenced by stress, present in both the central nervous system and immune cells, is the endocannabinoid system (eCB). Considering the pathophysiological mechanisms caused by stress, the objective of the project is to evaluate the involvement of the TLR4 receptor pathway in the mPFC in the behavioral consequences of acute stress and the possible participation of endocannabinoid signaling. To do this, we evaluated the behavioral responses of animals subjected to acute restraint stress, with guide cannulas directed at the mPFC. Seven days after surgery recovery, the animals underwent the Open Field Test (OFT) to assess possible motor alterations caused by the surgery stress or during the recovery period. Twenty-four hours after the assessment of baseline behavior, the animals received a local injection of vehicle (DMSO 100%) or the TLR4 inhibitor (TAK-242), 10 minutes before the restraint stress (RS) protocol. After the stress session, all rats, including the naïve, were individually housed. After 24 hours, the animals were exposed to the EPM and FST tests. At the end of the behavioral assessment, blood samples and brain tissues were collected. In our findings, RS increased immobility time in the FST, increased corticosterone plasma levels and increased TLR4 gene expression in the mPFC. Additionally, pharmacological modulation with TAK-242 at different doses prevented the effects of RS. In summary, the data suggest that a single exposure to RS can promote changes in the neuroimmune system in the mPFC through the activation of the TLR4 pathway, triggering changes in the behavioral phenotype, which may have also been influenced by the increase in plasma corticosterone levels.

Keywords: TLR4, Stress, Endocannabinoid system, Antidepressant, Anxiolytic, TAK-242, Neuroimmune.

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG: 2-arachidonoylglicerol

AEA: anandamida

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

CB1: receptor de canabinóide tipo 1

CB2Rs: receptores de canabinóide tipo 2

CMS: estresse crônico leve

SNC: sistema nervoso central

CRH: hormônio liberador de corticotrofina

CRS: estresse crônico de restrição

CUMS: estresse crônico imprevisível leve

DAMPs: padrões moleculares associados a danos

eCB: endocanabinoide

LCE: labirinto elevado em cruz

FAAH: hidrolase de amida de ácido graxo

fr-HMGB1: caixa 1 de alta mobilidade totalmente reduzida

FST: teste de natação forçada

GM-CSF: fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos

GR: receptor de glicocorticóide

GABA: ácido gama-aminobutírico

HMGB1: caixa 1 de alta mobilidade

HPA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

HSPs: proteínas de choque térmico

Iba-1: molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1

IDO: indolamina 2,3-dioxigenase

IFN α : interferon α

I κ B: inibidor do fator nuclear kappa B

IKK: inibidor da quinase do fator nuclear kappa B

IL-1 β : interleucina 1 β

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

IRAK: quinase associada ao receptor de interleucina-1

IRF3: fator regulador interferon 3

KO: knockout (gene inativado)

LPS: lipopolissacarídeo

MAGL: lipase de monoacilglicerol

MAPK: quinase ativada por mitógeno

MD-2: fator de diferenciação mieloide 2

TDM: transtorno depressivo maior

mRNA: RNA mensageiro

MyD88: fator de diferenciação mieloide 88

NFκB: fator nuclear kappa B

NLRP3: receptor 3 da proteína de oligomerização de nucleotídeo

NMDA: N-metil-D-aspartato

TCA: teste de campo aberto

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

CPF: córtex pré-frontal

PGE2: prostaglandina E2

p-IκBα: inibidor de fator nuclear kappa B α fosforilado

p-NFκB: fator nuclear kappa B fosforilado

PPARα: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma α

PRR: receptor de reconhecimento de padrões

NPV: núcleo paraventricular do hipotálamo

TPS: teste de preferência por sacarose

TAK1: quinase ativada pelo fator de crescimento transformador β-1

TIRAP: proteína adaptadora do domínio receptor Toll/interleucina-1

TLRs: receptores tipo Toll-like

TNF-α: fator de necrose tumoral α

TRAF6: fator de associação ao receptor de necrose tumoral 6

TRAM: molécula adaptadora relacionada a Toll/interleucina-1-indutora de domínio receptor- β

TRIF: molécula adaptadora relacionada a Toll/interleucina-1-indutora de domínio receptor- β



LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via de sinalização do TLR4

Figura 2: Imagem representativa do delineamento experimental completo

Figura 3: Pontos representativos mostrando microinjeção no CPFm na porção pré-límbica

Figura 4: Animais submetidos ao TCA 24h antes do protocolo de ER para avaliar possíveis alterações na locomoção ocasionadas pelo processo cirúrgico.

Figura 5: Avaliação dos efeitos do estresse de restrição (3 horas) em ratos machos Wistar Hannover submetidos ao tratamento na intra-porção pré-límbica do CPF com veículo ou TAK242 (inibidor da via do TLR4) e após 24 horas, testados no LCE.

Figura 6: Avaliação dos efeitos do estresse de restrição (3 horas) em ratos machos wistar hannover submetidos ao tratamento intra-porção pré-límbica do CPF com veículo ou TAK242 (inibidor da via do TLR4) após 24 horas, testados no TNF.

Figura 7: Efeitos do estresse agudo de restrição e do TAK-242 (0,3; 3,0; 9,0 µg/0,2 µl) administrado no córtex pré-frontal de ratos na ativação da via de sinalização do receptor tool-like 4 (TLR4).

Figura 8: Efeitos do estresse agudo de restrição ou do TAK-242 (0,3; 3,0; 9,0 µg/0,2 µl) administrado no córtex pré-frontal medial-PL de ratos na expressão de componentes do sistema endocanabinoide.

Figura 9: Efeitos do ER e do TAK-242 (0,3; 3,0; 9,0 µg/0,2 µl) nos Níveis de corticosterona plasmática.



Sumário

1. INTRODUÇÃO	22
2. REFERENCIAL TEÓRICO	27
2.1 Estresse, uma resposta fisiológica essencial do organismo.....	27
2.2 Desordens neuropsiquiátricas e estresse.....	28
2.3 Alterações neuroimunes ocasionadas pelo estresse.....	30
2.4 Ativação do TLR4	32
2.5 Envolvimento do TLR4 na resposta ao estresse e neuroinflamação	33
2.6 Sistema endocanabinoide, neuroinflamação e a via do TLR4.....	36
3. HIPÓTESE	39
4. OBJETIVOS	41
4.1 Objetivo Geral	41
4.2 Objetivos específico	41
5. MATERIAIS E METÓDOS	44
5.1 Animais de experimentação	44
5.2 Soluções e drogas	44
5.3 Cirurgia estereotáxica	44
5.4 Análise Histológica dos sítios de administração da droga	44
5.5 Protocolo de estresse por restrição (ER)	44
5.6 Análise comportamental	45
5.6.1 Teste do Campo Aberto (TCA)	45
5.6.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	45
5.6.3 Teste do Nado Forçado (TNF).....	45
5.7 Coleta de material e análises	46
5.7.1 Coleta de sangue e dosagem de corticosterona	46
5.7.2 Eutanásia e obtenção dos tecidos	46
5.8 Análises moleculares	46

5.8.1	Elisa	46
5.8.2	PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	46
5.9	Análise estatística	47
5.10	Procedimento experimental	47
5.10.1	Experimento 1.1: Avaliação das respostas comportamentais e molecular de animais submetidos ao estresse de restrição agudo após implantação de cânulas-guia direcionadas ao CPFm.....	47
6.	RESULTADOS	50
6.1	Localização dos sítios de injeção	50
6.2	Avaliação das respostas comportamentais e moleculares de animais submetidos ao estresse de restrição agudo após implantação de cânulas-guia direcionadas ao CPFm	51
6.2.1	Efeitos do ER e da modulação farmacológica na via do TLR4 CPFm-PL nos comportamentos avaliados no labirinto em cruz elevado	52
6.2.2	Efeitos do ER e da modulação farmacológica na via do TLR4 CPFm-PL nos comportamentos avaliados no teste do nado forçado.	53
6.2.3	Efeitos do estresse agudo de restrição e da modulação farmacológica pelo TAK-242 na ativação da via de sinalização do TLR4 no CPF	55
6.2.4	Efeitos do estresse agudo de restrição e da modulação farmacológica pelo TAK-242 em componentes do sistema endocanabinoide	56
6.2.5	Efeitos do estresse agudo de restrição e da modulação farmacológica pelo TAK-242 nos níveis plasmáticos de corticosterona.....	58
7.	DISCUSSÃO	60
8.	CONCLUSÃO	68
9.	REFERÊNCIAS	70
10.	ANEXOS	92

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A resposta fisiológica ao estresse é um processo adaptativo que prepara o organismo para lidar com estressores internos ou externos. No entanto, a exposição prolongada, intensa ou repetida a estressores pode resultar em uma resposta desadaptativa que pode prejudicar funções previstas na fisiologia saudável do organismo. Essa resposta desadaptativa pode ser um fator desencadeante ou agravante de uma série de doenças no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), incluindo depressão, ansiedade, comprometimento cognitivo e doenças cardíacas (Calcia *et al.*, 2016; Ketchesin *et al.*, 2017).

A exposição aguda ou crônica a diversos estressores psicossociais em modelos animais, por exemplo, pode promover alterações morfológicas e neuroplásticas no cérebro, principalmente em áreas límbicas (Castrén and Hen, 2013; Radley *et al.*, 2015) profunda remodelação da arquitetura neuronal, particularmente na amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal (CPF). Dentre essas regiões cerebrais, o córtex pré-frontal medial (CPFm) possui responsividade aumentada ao estresse e tem demonstrado sofrer alterações significativas em sua morfologia e função após estresse agudo (Treccani *et al.*, 2014) e crônico (Mcewen, 2000; Radley *et al.*, 2006).

Além disso, diversos estudos demonstram que a exposição ao estresse agudo intenso ou crônico induz a ativação de processos pró-inflamatórios pela micróglia, célula de defesa do SNC, em diversas áreas cerebrais, como no hipocampo e CPF (Walker, Frederick Rohan *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2016; Catale *et al.*, 2020; Frank *et al.*, 2020). Estas células são responsivas tanto a estímulos não patogênicos quanto patogênicos, portanto, suas ações variam desde a manutenção da homeostasia até quadros de neuroinflamação, dependendo do tipo, intensidade e duração do estímulo (Wake and Fields, 2011; Arcuri *et al.*, 2017). Como sensores do ambiente circundante, a micróglia é altamente responsiva às perturbações locais, e essas perturbações podem conduzir a diferentes estados reativos por meio de mudanças morfológicas e funcionais (Catale *et al.*, 2020).

A exposição ao estresse também induz alterações em outras moléculas associadas à resposta imune no cérebro, particularmente no CPF, como o aumento da expressão das enzimas iNOS e COX-2 (ciclooxigenase 2), o fator de transcrição NFκB e receptores do tipo Toll (TLRs), como o TLR4 (Gárate, Garcia-Bueno B Fau - Madrigal, *et al.*; Gárate, Iciar *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Mouihate and Mehdawi, 2016; Li *et al.*, 2021). O TLR4 é um receptor de reconhecimento de padrões (PRR) expresso na membrana, principalmente por células imunes

inatas, como na micróglia no cérebro (Li *et al.*, 2021). Como um PRR, o TLR4 pode detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS), como lipopolissacarídeo (LPS) e padrões moleculares associados a danos (DAMPS), como proteínas de choque térmico (HSP) e proteína do grupo 1 de mobilidade alta (HMGB1) (Franklin *et al.*, 2018).

A ativação do TLR4 depende do correceptor MD-2 (fator de diferenciação mielóide 2) e do recrutamento de proteínas adaptadoras, como o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88). Esse processo desencadeia a ativação da via intracelular canônica do NF κ B, que culmina na fosforilação pelo complexo multi-subunidade I κ B quinase (IKK) de I κ B (p65), promovendo a sua degradação via proteossoma e permitindo a translocação de NF κ B (dímeros:p50/RelA ou p50/c-Rel) para o núcleo. Esse fator de transcrição, ao se ligar na região promotora, promove a expressão de diversos genes pró-inflamatórios, como COX-2, iNOS, IL-1 β (interleucina 1 β), IL-6 (interleucina 6), e TNF- α (fator de necrose tumoral α) (García Bueno *et al.*, 2016).

Além do seu papel fisiológico na imunidade inata, os receptores TLRs podem promover efeitos deletérios. A superativação de TLRs expressos em diferentes tipos de células do sistema imune pode levar à interrupção da homeostase imunológica e, assim, aumentar o risco de doenças inflamatórias e distúrbios autoimunes (El-Zayat *et al.*, 2019), incluindo processos neurodegenerativos envolvendo TLR4 (García Bueno *et al.*, 2016). Além disso, evidências sugerem o envolvimento desse receptor em transtornos psiquiátricos, como por exemplo, o aumento da expressão de TLR4 foi observado no CPF dorsolateral de indivíduos depressivos que cometeram suicídio (Pandey *et al.*, 2014). Já a inibição farmacológica da via TLR4 pela administração sistêmica de TAK-242 demonstrou reduzir a neuroinflamação no CPF de ratos expostos ao estresse de restrição agudo (Gárate *et al.*, 2014).

No entanto, o possível envolvimento de receptores TLR4 no CPF como mediadores diretos das consequências comportamentais do estresse ainda não havia sido investigado. Além dos receptores TLR4, diversos estudos demonstram que o sistema endocanabinoide (eCB) também sofre influência do estresse (Hill and Gorzalka, 2004; Viveros *et al.*, 2005). Evidências apontam que a ativação de TLRs, como TLR4 e TLR2 em modelos *in vivo* e *in vitro* por desafio com LPS, aumenta os níveis de eCBs, principalmente o 2-araquidonilglicerol (2-AG), possivelmente para atenuar a resposta inflamatória e reduzir danos subsequentes. Considerando que essa molécula se comporta como um quimioatraente, os níveis localmente aumentados podem recrutar células imunes para o local e mitigar mais danos nos tecidos (Mccoy, 2016).

O estresse induz a liberação de glutamato, que por meio de receptores NMDA aumenta a atividade neuronal. A ativação de NMDA e de receptores metabotrópicos do tipo mGlu5 pelo glutamato resultam em aumento de cálcio intracelular no terminal pós-sináptico, culminando com ativação de enzimas de síntese de eCBs, levando a sua produção e liberação pelo terminal pós-sináptico na fenda sináptica (Lisboa *et al.*, 2017). Os receptores canabinoides (CB1 e CB2) são os principais receptores para os eCBs, enquanto a anandamida (AEA) e o 2-AG são os dois principais eCBs (Matsuda *et al.*, 1990; Herkenham *et al.*, 1991; Devane *et al.*, 1992; Sugiura *et al.*, 1995). Os eCBs são considerados neurotransmissores atípicos, pois são sintetizados sob demanda e não são armazenados em vesículas. Eles agem de forma retrógrada, controlando a liberação de vários neurotransmissores, como GABA e glutamato (Zou and Kumar, 2018; Lisboa *et al.*, 2019).

Vários trabalhos, inclusive do nosso grupo de pesquisa, demonstraram que a via sinalização eCB no CPFm tem importante papel na regulação das respostas relacionadas ao estresse e ansiedade através do controle do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Lisboa *et al.*, 2017). (Hill *et al.*, 2010). A presença de receptores CB1 em circuitos corticolímbicos que regulam o eixo HPA, as propriedades antiestresse do uso de cannabis e várias outras evidências, inclusive de modelos animais, apoiam o envolvimento da sinalização eCB na inibição da resposta ao estresse (Hill and McEwen, 2010; Lisboa *et al.*, 2018). Além disso, a presença do sistema eCB, principalmente os receptores CB2, nas células imunes, especialmente nas células da micróglia, e o envolvimento deste sistema na modulação neuroimune fortalecem a ideia de que os efeitos dos eCBs na modulação de respostas comportamentais poderiam envolver a modulação dos mecanismos neuroimunes (Lisboa *et al.*, 2016; Mecha *et al.*, 2016).

De fato, a ativação do sistema eCB modula respostas inflamatórias desencadeadas pelo estresse. O tratamento com agonista do receptor CB1 e CB2 atenuou neuroinflamação no CPF induzida pelo estresse repetido em camundongos (Zoppi *et al.*, 2011; Zoppi *et al.*, 2014). Ainda, um estudo do nosso grupo mostrou que administração de um agonista CB1/CB2 reduziu a ativação da resposta neuroimune e as consequências comportamentais, redução da ansiedade e do medo condicionado tardio, em animais submetido ao estresse de derrota social (Lisboa *et al.*, 2018).

A neuroinflamação tem sido implicada na neurobiologia dos distúrbios neuropsiquiátricos (Dunn *et al.*, 2020). Vários alvos estão envolvidos nas respostas neuroinflamatórias, incluindo alguns induzidos pela exposição ao estresse, como TLR4 e a sinalização eCB. No entanto, poucos estudos avaliaram a interação entre esses sistemas na

regulação da neuroinflamação e mudanças de comportamento após o estresse (Wang, Y. *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2022). Considerando que a resposta induzida pelo estresse é altamente coordenada, com liberação de mediadores que a favorecem e de outros que facilitam a resolução do processo, o desequilíbrio nesta resposta fina pode resultar em favorecimento de um ou outro sistema. Enquanto a redução da sinalização eCB frente a situações de estresse poderia facilitar os efeitos inflamatórios do estresse, a inibição dos efeitos inflamatórios poderia facilitar a adaptação ao estresse, por favorecer a sinalização eCB.

Desta forma, os possíveis efeitos benéficos da inibição da sinalização TLR4 no estresse poderiam ser, em parte, por facilitação da sinalização eCB. Com isso, o presente trabalho teve como segundo objetivo investigar se a possível participação da via de sinalização do TLR4 no CPF nas consequências comportamentais e neuroinflamatórias induzidas pelo estresse tem envolvimento do sistema eCB.

REFERÊNICAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estresse, uma resposta fisiológica essencial do organismo

O estresse é uma resposta fisiológica do organismo a qualquer desafio externo ou interno que apresente como um fator adverso a sua homeostasia. A resposta ao estresse é adaptativa, tendo como característica funcional preparar o corpo para lidar com os estímulos apresentados por um estressor, seja interno ou externo (ambiental). Por exemplo, as respostas fisiológicas do corpo ao trauma e à cirurgia invasiva servem para atenuar mais danos nos tecidos. Esta resposta ao estresse é mediada por uma interação complexa de mecanismos nervosos, endócrinos e imunológicos, que envolvem a ativação de sistemas como o eixo simpático-adrenomedular (SAM), o eixo hipotálamo hipófise adrenal (HPA) e o sistema imunológico (Mifsud and Reul, 2018).

Entretanto, a exposição a um estressor intenso e agudo ou de forma repetitiva, ou a um estressor prolongado (estresse crônico), pode tornar a resposta ao estresse desadaptativa e prejudicial à homeostasia corporal, principalmente ao cérebro. Entre as alterações observadas, pode-se incluir a remodelação de conexões sinápticas, resultando em menor controle de regiões envolvidas com tarefas de ordem superior, particularmente o CPF, e uma compensação pela maior atividade nas partes primitivas do cérebro focadas na sobrevivência, como a amígdala (Pan *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2020)

Portanto, no cérebro, as ações do estresse dependem de diferentes redes neuronais, as quais são envolvidas com diferentes tipos de estressores, embora se sobreponham em alguns pontos. Estressores físicos, como infecções e hemorragias, induzem a ativação de regiões cerebrais como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), o núcleo do trato solitário (NTS) e o locus coeruleus (LC) (Godoy *et al.*, 2018). Estressores psicológicos, como exposição a estímulos aversivos e sinais relacionados a predadores, envolvem componentes do sistema límbico, incluindo o CPF, amígdala, hipocampo, área tegmental ventral (VTA) e núcleo accumbens (NAc). Essas conexões límbicas-PVN são retransmitidas especialmente por neurônios que possuem o GABA como principal neurotransmissor (neurônios GABAérgicos). O estresse crônico afeta esse circuito, resultando em maior excitabilidade do PVN e, considerando que os neurônios que produzem o hormônio liberador de corticotropina (CRH) são expressos no PVN, isso pode resultar na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Herman, 2012).

Vários sistemas de neurotransmissores, como os sistemas noradrenérgico, glutamatérgico, serotoninérgico, nitrérgico e canabinoide, desempenham papéis críticos nos processos de neuroplasticidade após a exposição ao estresse. Além disso, mudanças na organização estrutural da amígdala, hipocampo e CPF também estão envolvidas na resposta ao estresse. É válido ressaltar, que, o CPF medial possui um grau de suscetibilidade aumentado em situações estressoras, sofrendo alterações significativas em sua morfologia e função após a exposição ao estresse crônico (Mcewen *et al.*, 2016; Woo *et al.*, 2021).

Em situações de estresse agudo em modelo animal ocorre o aumento da liberação de corticosterona, que medeia o aumento da liberação de glutamato na região do CPF, influenciando, assim, em alguns aspectos do comportamento cognitivo e emocional (Koole, 2009; Popoli *et al.*, 2011; Langer *et al.*, 2021). É bem estabelecido que a disfunção glutamatérgica é uma característica importante em distúrbios relacionados ao estresse (Treccani *et al.*, 2014). Dessa forma, esses dados sugerem que o CPF medial está diretamente envolvido nos efeitos disfuncionais do estresse, bem como no início e progressão de doenças psiquiátricas relacionadas, como transtornos de ansiedade e depressão (Treccani *et al.*, 2014; Musazzi *et al.*, 2019; Martini *et al.*, 2023).

2.2 Distúrbios neuropsiquiátricos e estresse

A relação entre exposição a eventos estressores e o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos, como depressão, ansiedade e transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), é bem estabelecida (Kessler *et al.*, 2002; Mcewen, 2008). Além do tipo de estresse, as consequências desse estímulo no SNC podem se distinguir em decorrência de exposição única e intensa, como aquelas relacionadas a traumas, ou ainda de exposições crônicas e remissivas, como o estresse enfrentado em situações cotidianas, mas também alguns traumas.

Portanto, diferentes modelos animais têm contribuído para elucidar as singularidades e similaridades de mecanismos fisiopatológicos envolvidos na resposta a diferentes condições estressoras (Yuen *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2022; Yamanishi *et al.*, 2022). Por exemplo, frente a um estresse agudo é observado o aumento da neurotransmissão glutamatérgica no CPF (Yuen *et al.*, 2009), da inflamação sistêmica mediado por interações neuroimunes (Tang *et al.*, 2022; Yamanishi *et al.*, 2022) e de alterações monoaminérgicas no CPFm, núcleo accumbens (NAc), e hipocampo (Wilkinson *et al.*, 2023). Em conjunto, essas alterações promovem um fenótipo comportamental tipo-depressivo/ansioso que pode perdurar durante longos períodos através de modificações plásticas (Chu *et al.*, 2016).

Quando os períodos de estresse são longos e remitentes, como no estresse moderado crônico imprevisível (CUMS), é observado um aumento do comportamento tipo-depressivo com traços de anedonia, comportamento ansioso e déficits de memória de curto prazo. Essas alterações podem ser mimetizadas com a injeção de corticosterona ou seus análogos, demonstrando a importância da desregulação do eixo HPA nesse fenótipo (Nandam *et al.*, 2019).

Em relação as alterações no SNC, é observado a redução de receptores 5-HT_{1A} do hipocampo, regulação positiva dos β -adrenoceptores corticais, regulação negativa do GR do hipocampo, regulação positiva dos receptores CB₁ canabinoides corticais pré-frontais, reduções no fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) frontocortical e hipocampal, e reduções na sinalização AC-PKA (Belleau *et al.*, 2019). Essas alterações em conjunto promovem a perda de conectividade estrutural e o comprometimento da organização e atividade fisiológica das redes neurais, promovendo alterações de comportamento e das estratégias de enfrentamento do estresse (Belleau *et al.*, 2019).

O estresse agudo, como o estresse de restrição ou o choque nas patas em animais, tem consequências significativas no cérebro, especialmente em regiões importantes como o CPF (Yuen *et al.*, 2009; Musazzi *et al.*, 2019; Dorofeikova *et al.*, 2023). Estudos demonstraram que a exposição aguda ao estresse pode levar a alterações na liberação de neurotransmissores, incluindo o glutamato, nas sinapses dessa região cerebral. Essas mudanças podem afetar negativamente a plasticidade sináptica, a comunicação neuronal e a função executiva do CPF (Yuen *et al.*, 2009; Treccani *et al.*, 2014).

Além disso, o estresse agudo também pode desencadear respostas inflamatórias e neuroendócrinas, com aumentos significativos de IL-1 β , IL-1RA e IL-6 e TNF- α , que podem impactar outras áreas cerebrais relacionadas à regulação emocional e ao processamento cognitivo, estando associadas a aumentos de humor negativo e ansiedade (Maydych, 2019). A influência dessas alterações no CPF e em outras áreas cerebrais pode estar associada ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, como depressão, ansiedade e transtornos de estresse pós-traumático (Maydych, 2019).

Portanto, como exposto anteriormente, mudanças induzidas pelo estresse nos circuitos neurais envolvidos no processamento e regulação emocional podem levar a respostas mal adaptativas e contribuir para o desenvolvimento de diversos outros transtornos psiquiátricos (McLaughlin *et al.*, 2014). Assim, um maior entendimento a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta a estressores pelo organismo é fundamental para possibilitar a modulação e a redução do impacto de consequências deletérias provenientes.

2.3 Alterações neuroimunes ocasionadas pelo estresse

Experiências estressantes podem induzir a ativação de muitos aspectos da imunidade periférica e processos neuroimunes centrais, contribuindo para várias formas de defesa do hospedeiro, recuperação do estresse e, finalmente, suscetibilidade a doenças. Existe uma comunicação bidirecional entre o cérebro e o sistema imunológico, que envolve vias eferentes e aferentes, por meio das quais o cérebro e a periferia trocam informações sobre o estado homeostático do corpo. Este processo é um elemento essencial da resposta a fatores ambientais, fisiológicos e psicológicos que afetam a homeostasia de um organismo (Deak *et al.*, 2015; Antonelli *et al.*, 2018).

O estresse causa alterações neuroimunes e fisiológicas que contribuem para o desenvolvimento de distúrbios neuropsiquiátricos, inclusive através da interferência com sistemas de neurotransmissores como serotonina, dopamina e norepinefrina (Krishnan and Nestler, 2008). Parte das alterações neuroquímicas no cérebro decorrentes do estresse e da inflamação podem resultar da ativação da via das quinureninas pela hiper-regulação da enzima IDO, que afeta o metabolismo do triptofano e os níveis de serotonina, redução da produção do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), entre outras (Kiank *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2017; Martín-Hernández *et al.*, 2019). Essas alterações estão associadas principalmente a transtornos do humor, como ansiedade e depressão, mas importante frisar que nem todos os pacientes com transtornos do humor apresentam sinais de ativação imune (Becking *et al.*, 2013; Hodes *et al.*, 2016).

Os sinais neuroendócrinos podem modular a função imunológica e induzir alterações na micróglia. As micróglias são sensores do ambiente e, portanto, altamente responsivas a distúrbios locais, que podem levar a diferentes estados reativos (Herman *et al.*, 2016; Wang, F. *et al.*, 2018; Haj-Mirzaian *et al.*, 2021). As células da micróglia são vulneráveis a estímulos infecciosos e estéreis, como estresse psicológico, de modo que suas ações variam desde a manutenção da homeostase até a neuroinflamação induzida, dependendo do tipo, intensidade e duração do estímulo (Walker, F. R. *et al.*, 2013; Arcuri *et al.*, 2017).

Vários estudos demonstraram que a exposição ao estresse agudo ou crônico além de induzir alterações comportamentais (McEwen *et al.*, 2016; Woo *et al.*, 2021), induz a expansão dos processos microgliais em muitas áreas cerebrais, incluindo o hipocampo e o CPF (Catale *et al.*, 2020). O conjunto de receptores expressos nas micróglias permite que essas células detectem e respondam a sinais de estresse deflagrados pelos sistemas neuroendócrino,

imunológico e nervoso (Wolf *et al.*, 2017; Frank *et al.*, 2019). A ativação microglial tem uma classificação complexa, mas é designada de forma genérica como ativação microglial M1 ou pró-inflamatória, e microglial M2 ou anti-inflamatória (Walker, F. R. *et al.*, 2013).

Microglia exibe funções amplamente diferentes dependendo do estágio da vida, da região do SNC e do contexto de saúde ou doença. Diferenças no número microglial, morfologia e expressão gênica também foram relatadas entre os sexos (Hanamsagar *et al.*, 2017; Krasemann *et al.*, 2017). Funções microgliais adequadas são cruciais para a plasticidade e adaptação comportamental ao ambiente (Salter & Stevens, 2017; Tay *et al.*, 2017a). Ao longo da vida, a microglia contribui para a neurogênese, formação do circuito neuronal, formação e remodelação vascular e manutenção da homeostase (Tay *et al.*, 2017c). Durante o envelhecimento e em doenças, essas células podem tornar-se reativas ou prejudicadas em sua vigilância e fagocitose (Streit, 2002; Koellhoffer *et al.*, 2017; Spittau, 2017).

A contribuição microglial para doenças está associada a papéis fisiológicos comprometidos por exemplo, na manutenção sináptica e plasticidade (Tay *et al.*, 2017a) e processos que são adaptativos no cérebro saudável, mas que levam à morte celular e danos aos tecidos em ambientes patológicos por exemplo, excitotoxicidade, estresse oxidativo e inflamação; (Weil *et al.*, 2008). A reação microglial pode ser desencadeada por qualquer tipo de insulto ou distúrbio do SNC. A reação microglial persistente, frequentemente associada à proliferação, está envolvida em condições patológicas que vão desde distúrbios do neurodesenvolvimento, lesões traumáticas, doenças infecciosas, tumores e distúrbios psiquiátricos, até doenças neurodegenerativas.

A ativação microglial é uma característica observada em quadros de neuroinflamação e que tem sido implicada na patogênese de vários distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo TDM e ansiedade (Won and Kim, 2020; Troubat *et al.*, 2021). A resposta neuroinflamatória ao estresse é complexa e envolve múltiplas vias de sinalização. Uma das principais vias é a sinalização do NF- κ B, que regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias e outros genes relacionados ao sistema imunológico (Felger and Lotrich, 2013). O estresse pode ativar a sinalização de NF- κ B particularmente na micróglia no cérebro, levando à produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Por exemplo, a ativação da micróglia induzida pelo estresse está associada a um aumento na expressão interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Felger and Lotrich, 2013). Essas citocinas podem estimular ainda mais a micróglia

e contribuir para promover a neuroinflamação, uma vez que têm a capacidade de induzir e propagar reações inflamatórias em todo o cérebro.

Além disso, o estresse também pode induzir a liberação de padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs), como ATP e HMGB1, que podem ativar o sistema imunológico inato e desencadear uma resposta inflamatória. DAMPs podem ser liberados de células danificadas e sua presença no cérebro pode sinalizar perigo e ativar a micróglia (Pan *et al.*, 2014; Wang, Y. L. *et al.*, 2018). Uma via envolvida nestas respostas e que é induzida pelo estresse é a do inflamassoma de NLRP3, um complexo multiproteico que pode ativar a caspase-1 e promover a secreção de IL-1 β e outras citocinas. O inflamassoma de NLRP3 tem sido implicado na patogênese de várias doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (Kelley, Nathan *et al.*, 2019). A exposição ao estresse também induz alterações em outras moléculas associadas à resposta imune no cérebro, particularmente no CPF, como o aumento da expressão da iNOS e COX-2, o NF κ B e receptores semelhantes a Toll (TLRs), como o TLR4 (Gárate, Iciar *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Mouihate and Mehdawi, 2016).

Portanto, a exposição ao estresse agudo ou crônico pode ter várias consequências imunológicas, como aumento dos níveis de cortisol, ativação da micróglia, aumento de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias circulantes (IL-6 e TNF- α), ativação da via das quinureninas, liberação de DAMPs e prostaglandinas, entre outras moléculas, como citado acima. Alguns desses mediadores podem ser encontrados no cérebro, onde podem mediar a neuroinflamação e estar envolvidos em várias alterações comportamentais (Ménard *et al.*, 2017; Franklin *et al.*, 2018).

2.4 Ativação do TLR4

O TLR4 é membro da família de receptores do tipo “Toll”, que desempenha um papel importante no sistema imunológico inato. A sinalização do receptor de TLR4 é mediada tanto por PAMPs, como LPS, quanto DAMPs, como HMGB1, HSPs e fibrinogênio, e pode ser ativada por duas vias: a via dependente de MyD88 ou a via independente de MyD88 (Fig. 01) (Kawai and Akira, 2007; Kawasaki, Takumi and Kawai, Taro, 2014), conforme descrito a seguir.

Após a ativação do TLR4 pode haver o recrutamento da proteína adaptadora MyD88, e ativação das proteínas quinase associada ao receptor IL-1 (IRAK) e fator 6 associado ao

receptor TNF (TRAF6), que ativam o fator de crescimento transformador quinase 1 ativado por beta [TAK1, também conhecida como proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) quinase quinase 7 (MKK7)]. Essa molécula leva à ativação das vias MAPK, promovendo a translocação nuclear da proteína ativadora 1 (AP-1). TAK1 também pode ativar o complexo I κ B-quinase (IKK) [formado pelo modulador essencial do NF κ B (NEMO), IKK α e IKK β], que fosforila a proteína inibidora do complexo NF κ B (subunidades p65 e p50) e o I κ B α . I κ B α fosforilado (p-I κ B α) é degradado pelo proteassoma, que então libera NF κ B para translocar para o núcleo, onde promoverá a transcrição de vários genes pró-inflamatórios, incluindo aqueles necessários para o inflamassoma NLRP3 (Weber *et al.*, 2013; Kawasaki, T. and Kawai, T., 2014; Iwata *et al.*, 2016).

Além da via dependente de MyD88, a ativação do TLR4 também pode ativar uma via de sinalização independente de MyD88, conhecida como via TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β). Essa via é ativada principalmente por ligantes como LPS, derivados de bactérias gram-negativas. A ativação do TLR4 recruta uma proteína adaptadora chamada TRIF, que sinaliza através de várias moléculas, incluindo TRAF3 (fator de necrose tumoral relacionado ao receptor 3) e TRAF6. Essa via culmina na ativação dos fatores de transcrição IRF3 (fator regulador interferon 3) e NF- κ B, resultando na produção de interferons tipo I e outras citocinas pró-inflamatórias (Kawasaki, Takumi and Kawai, Taro, 2014)

A ativação do receptor TLR4 por DAMPs e PAMPs pode desencadear tanto via dependente quanto independente de MyD88, levando à ativação do NF- κ B, IRF3 e a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons tipo I. Esses processos desempenham um papel crítico na resposta imunológica do organismo a danos celulares e infecções (Kawasaki, T. and Kawai, T., 2014).

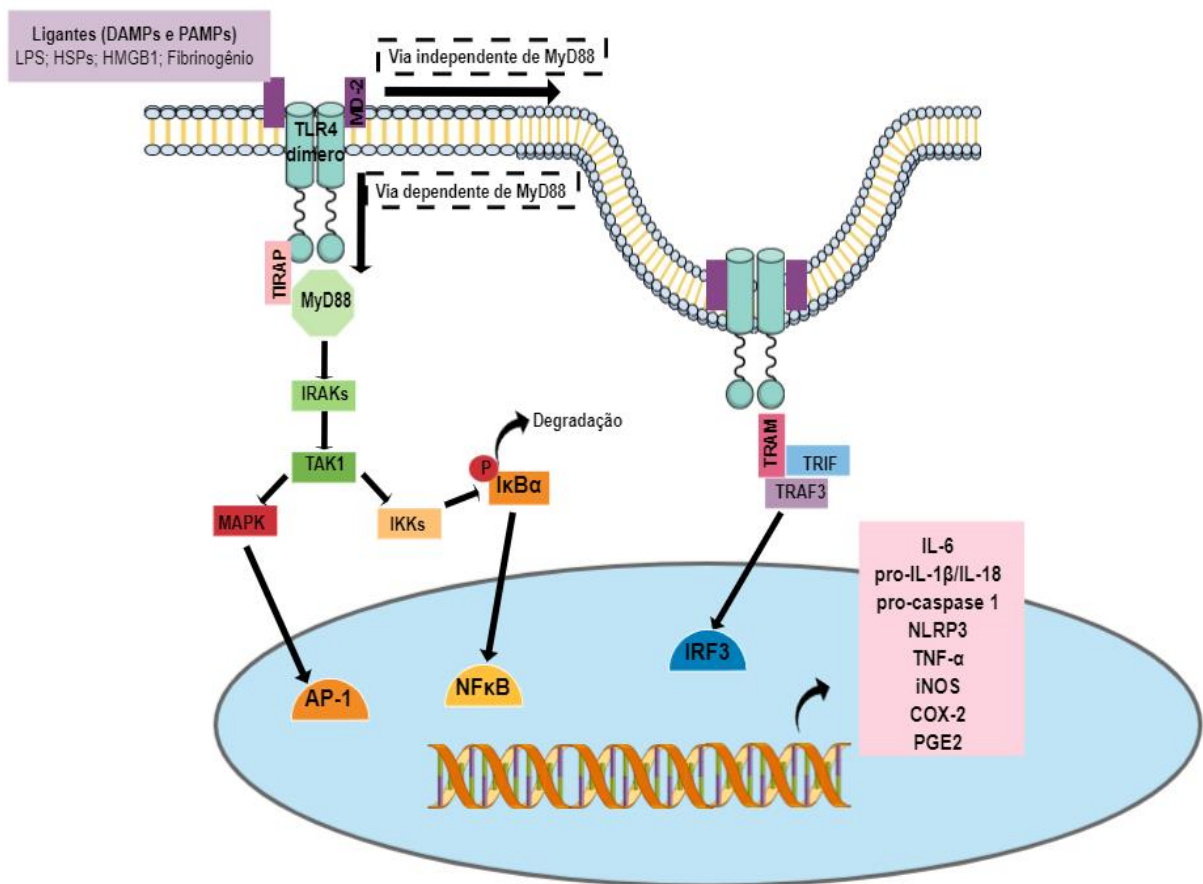


Figura 01: Via de sinalização do TLR4. Adaptado Souza-Junior, 2023. Ativação microglial, via TLR4 por PAMPs, como LPS, ou DAMPs, como HSPs, HMGB1 e fibrinogênio, levando a um aumento na citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , enzimas que medeiam respostas imunes/inflamatórias, como iNOS, COX-2 e PGE2 e transcrição de componentes da via do inflamassoma NLRP3 (pró-IL-1 β , pró-IL-18, pró-caspase-1, e NLRP3).

2.5 Envolvimento do TLR4 na resposta ao estresse e neuroinflamação

Diferentes abordagens, incluindo genéticas, químicas e farmacológicas, são empregadas para investigar o papel do envolvimento do receptor TLR4 na resposta ao estresse e no comportamento. Estudos recentes têm investigado o papel do receptor 4 do tipo Toll-like (TLR4) na ativação de respostas inflamatórias no SNC e sua associação com distúrbios psiquiátricos (Liu *et al.*, 2014; Bruno *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2019). Embora o TLR4 seja conhecido principalmente por seu papel na resposta imune periférica, evidências emergentes sugerem sua expressão e atividade no SNC, incluindo regiões cerebrais envolvidas no processamento emocional (Gárate, Garcia-Bueno B Fau - Madrigal, *et al.*). Estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram o envolvimento do TLR4 na modulação da neuroinflamação e na

patogênese de distúrbios neuropsiquiátricos (Cheng *et al.*, 2016; García-Bueno *et al.*, 2016; Pandey *et al.*, 2019).

Modelos empregando o LPS para avaliar comportamento doentio, déficits cognitivos e comportamentos do tipo depressivo em animais são amplamente empregados para correlacionar alterações comportamentais e imunológicas mediante a ativação do TLR4 (Yang *et al.*, 2019; Lasselin *et al.*, 2020). Além disso, modelos genéticos também são utilizados, como camundongos knockout (KO) para TLR4 e camundongos C3H/HeJ; no último, o TLR4 tem uma resposta defeituosa ao LPS (Gárate, I. *et al.*, 2013). Vários estudos mostram que TLR4 KO é resistente ao efeito comportamental do estresse e tem níveis mais baixos de neuroinflamação (para revisão, ver (Souza-Junior *et al.*, 2022)). Os camundongos TLR4 KO demonstram resistência ao comportamento depressivo no paradigma do desamparo aprendido e exibem uma resposta de citocinas atenuada ao estresse, caracterizada por níveis mais baixos de TNF- α , IL-6 e IL-1 β no hipocampo em comparação com camundongos do tipo selvagem (Cheng *et al.*, 2016). Além disso, esses camundongos apresentam um fenótipo protetor após serem submetidos a estresse de restrição homotípica repetida ou CUMS (Caso *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2020). Ainda aspectos da interação social em camundongos TLR4 KO e camundongos TLR2/TLR4 KO duplos, submetidos a estresse de derrota social repetido são reduzidos, e esse efeito está relacionado aos receptores TLR2/TLR4 presentes especificamente na micróglia CPFm. Esses receptores também desempenham um papel na atividade neuronal reduzida, na ativação microglial e na atrofia dendrítica no CPFm após o estresse (Nie *et al.*, 2018).

Como já discutido brevemente, a exposição ao estresse pode aumentar citocinas, espécies reativas de oxigênio e enzimas pró-inflamatórias no cérebro, especialmente no hipocampo e no CPF, e diminuir os fatores neurotróficos e as monoaminas nas mesmas regiões cerebrais (Walker, Frederick Rohan *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2016; Hemmati *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020; Woo *et al.*, 2021) e parte destas alterações podem ser mediadas pela ativação do TLR4.

Além disso, estresse agudo, ou estressores homotípicos repetidos, caracterizados por serem o mesmo tipo de estressor, aumentam a expressão de componentes da via TLR4 no cérebro, incluindo TLR4, MyD88 e NF κ B (Gárate, García-Bueno B Fau - Madrigal, *et al.*; Okun *et al.*, 2012; Gárate, I. *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Um dos principais DAMPs responsáveis por desencadear a resposta do TLR4 é o HMGB1 (Lian *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). Vários estudos mostraram que o estresse severo aumenta os níveis

de HMGB1 no cérebro, contribuindo para a neuroinflamação (Frank *et al.*, 2015). Considerando que HMGB1 se liga à TLR4 e seu co-receptor CD14, resultando na liberação de diversas citocinas, e considerando que as mudanças comportamentais após o estresse envolvem a liberação de HMGB1, esse DAMP pode ser responsável também pelas consequências comportamentais da ativação do TLR4 após a exposição ao estresse (Wang, B. *et al.*, 2018).

Como comentado anteriormente, estudos mostram que o estresse aumenta a expressão na micróglia de componentes da via do inflamassoma NLRP3 no cérebro (Weber *et al.*, 2013; Iwata *et al.*, 2016; Feng, Xiujing *et al.*, 2019; Kelley, N. *et al.*, 2019), o que em grande parte depende da via do TLR4 (Weber *et al.*, 2013). A via clássica de ativação do NLRP3 acontece em duas etapas: a iniciação e a ativação. Na etapa da iniciação, há a síntese de precursores pró-inflamatórios mediada pela ativação de TLR4 e translocação de NF- κ B para o núcleo, promovendo a expressão de NLRP3 e da pró-IL-1 β , o precursor da IL-1 β . Já na etapa de ativação, ocorre a mudança conformacional do inflamassoma NLRP3 mediado por um segundo sinal de estresse, que pode ser aumento de ATP, que ativa receptores como o receptor purinérgico 2 do tipo X7 (P2X7), induzindo a oligomerização do NLRP3 após o efluxo de potássio. O NLRP3 interage com a proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain*), que recruta a pró-caspase-1, ativando o inflamassoma de NLRP3. Em sequência, a pró-caspase é clivada em caspase-1, que é responsável por ativar a pró-IL-1 β em IL-1 β (Iwata *et al.*, 2016), que é então liberada pela micróglia.

Em relação as abordagens farmacológicas, há o E-5531, eritoran e TAK-242 (resatorvid), que foram desenvolvidos como inibidores da via de sinalização do TLR4, inicialmente para o tratamento da sepse (Wittebole *et al.*, 2010; Savva and Roger, 2013; Tam *et al.*, 2021). No entanto, esses medicamentos se mostraram ineficazes neste contexto (Rice *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2022). Como o mecanismo principal desses compostos visa bloquear a ativação da via do TLR4 por DAMPs e por PAMPs, como podem inibir a indução de uma resposta inflamatória crônica estéril, que pode estar envolvida em doenças neuropsiquiátricas (Zaffaroni and Peri, 2018; Shirayama *et al.*, 2022), esses fármacos têm sido usado como ferramentas experimentais neste contexto.

Foi demonstrada que a inibição da via do TLR4 por TAK-242 atenuou a neuroinflamação induzida por LPS por estresse agudo de restrição (Gárate *et al.*, 2014). O TAK-242 se liga seletivamente ao resíduo de cisteína do TLR4, interrompendo assim sua interação com as moléculas adaptadoras TIRAP e TRAM. Em outro estudo foi evidenciado um efeito

antidepressivo do TAK-242 em um modelo de desamparo aprendido após administração aguda pela via intracerebroventricular (Shirayama *et al.*, 2022). Curiosamente, o efeito foi atenuado pela administração local de NBQX, um antagonista dos receptores AMPA do glutamato, ou por ANA-12, um inibidor da sinalização do receptor TrkB do BDNF, destacando o envolvimento desses receptores em promover o efeito tipo-antidepressivo. Outro fármaco desenvolvido com a finalidade de modular a via do TLR4, o Eritoran, é um análogo sintético da porção lipídica A do LPS, portanto compete com o LPS pela ligação à porção MD-2 do complexo receptor TLR4 (Barochia *et al.*, 2011).

Em um estudo conduzido por (Aboul-Fotouh *et al.*, 2018), essa droga reduziu, de forma dependente da dose, os comportamentos depressivos e as alterações neuroquímicas induzidas pelo estresse crônico de restrição. É importante evidenciar que o papel preciso do TLR4 nas respostas comportamentais ao estresse ainda requer uma melhor compreensão. O efeito observado em camundongos TLR4 KO pode estar relacionado, por exemplo, à ausência desses receptores durante o desenvolvimento cerebral. É necessário investigar mais a fundo para esclarecer totalmente a contribuição do TLR4 nesses contextos comportamentais sob estresse.

2.6 Sistema endocanabinoide, neuroinflamação e a via do TLR4

Como descrito anteriormente a neuroinflamação tem sido discutida como capaz de desempenhar um papel central na neurobiologia dos distúrbios neuropsiquiátricos (Dunn *et al.*, 2020). Além de vários alvos envolvidos nas respostas neuroinflamatórias, particularmente a sinalização TLR4 discutida acima, temos também o sistema eCB. O sistema eCB além de modular muitas funções no SNC, como neuroplasticidade, homeostase celular e comportamento, também apresenta importante papel na regulação da resposta neuroimune, como controle da resposta de células da micróglia (Lisboa *et al.*, 2017).

A presença de sinalização eCB em núcleos sensíveis ao estresse, como as estruturas hipotalâmicas e límbicas (amígdala, hipocampo e CPF), sugere que ele exerce uma função essencial na regulação dos efeitos neuroendócrinos e comportamentais do estresse (Hill *et al.*, 2010). A amígdala, por exemplo, é uma das principais estruturas límbicas envolvidas na ativação do eixo HPA em resposta a estímulos estressantes (Hill *et al.*, 2010). Portanto, uma sinalização adequada do eCB no sistema límbico é fundamental para mitigar as consequências de situações estressantes aversivas, como amplamente relatado (Lisboa *et al.*, 2017).

O sistema eCB compreende mensageiros/neurotransmissores lipídicos endógenos (os eCBs), receptores e enzimas anabólicas e catabólicas (Cristino *et al.*, 2020). Os eCBs mais bem compreendidos são AEA e 2-AG. A Fosfolipase D específica da N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE-PLD) e a amida hidrolase de ácido graxo (FAAH) são responsáveis pela biossíntese e hidrólise de AEA, respectivamente. A diacilglicerol lipase α (DAGL α)/DAGL β , e a monoacilglicerol lipase (MAGL) e o domínio 6 da α/β -hidrolase (ABHD6) são responsáveis pela síntese e degradação do 2-AG, respectivamente. eCBs interagem com CB1Rs e CB2Rs, mas podem interagir com outros alvos, como o receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1) e os receptores α (PPAR α) ou γ (PPAR γ) ativados por proliferadores de peroxissoma (Cristino *et al.*, 2020).

Existem outros eCBs, como a *N*-palmitoiletanolamida (PEA) (Petrosino and Di Marzo, 2017), que possui várias propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras (Mattace Raso *et al.*, 2014; D'aloia *et al.*, 2021). Seus efeitos podem ser mediados, por exemplo, pela ativação de CB2, TRPV1 e PPAR α (Lutz *et al.*, 2015; Cristino *et al.*, 2020). Os eCBs são sintetizados por várias células e atuam em diferentes células cerebrais, incluindo neurônios e micróglia. Portanto, a ampla localização das moléculas do sistema eCB e suas ações multialvo permitem o controle de muitas funções, desde a modulação de vias celulares locais até grandes circuitos envolvidos no comportamento (Lisboa *et al.*, 2019).

CB1Rs são expressos na periferia, mas principalmente no SNC; eles são encontrados em regiões telencefálicas e cerebelares, principalmente em neurônios, mas também em células gliais. Eles são os receptores acoplados à proteína G mais expressos no cérebro (Kano *et al.*, 2009; Kasatkina *et al.*, 2021). A expressão neuronal de CB1 geralmente está localizada em elementos pré-sinápticos, onde eles são acoplados à proteína Gi. Portanto, a ativação neuronal do CB1 geralmente inibe a liberação de neurotransmissores (Kano *et al.*, 2009; Busquets-Garcia *et al.*, 2018). No corpo estriado, CB1R é expresso por interneurônios positivos para parvalbumina, enquanto no córtex cerebral, hipocampo e amígdala eles são predominantemente, mas não exclusivamente, expressos por interneurônios positivos para colecistoquinina (CCK); eles também podem ser expressos por neurônios glutamatérgicos (Hill *et al.*, 2007; Kano *et al.*, 2009).

Os CB2Rs são expressos principalmente por células imunes na periferia, mas também por micróglia no cérebro (Onaivi *et al.*, 2006; Lisboa *et al.*, 2016; Mecha *et al.*, 2016). No entanto, há evidências de expressão neuronal nos neurônios pós-sinápticos, onde sua ativação poderia hiperpolarizar as células e inibir a transmissão do sinal (Zhang *et al.*, 2014; Stempel *et*

al., 2016) A sua expressão é muito inferior à do CB1 e pode ser aumentada por vários estímulos, incluindo infecções e doenças autoimune (Onaivi *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014; Stempel *et al.*, 2016; Ishiguro *et al.*, 2022). A sinalização disfuncional do eCB em situações estressantes pode contribuir para aumentar a excitabilidade neuronal e facilitar os efeitos inflamatórios do estresse nos circuitos neuronais.

A relação entre eCB, estresse e sistema inflamatório tem sido extensamente estudada na área neuroimune. Vários estudos sustentam que os eCBs têm efeitos antiestresse em modelos animais, possivelmente devido às suas propriedades anti-inflamatórias (Kasatkina *et al.*, 2021). Por exemplo, o estresse subcrônico em camundongos levou a um aumento do perfil pró-inflamatório no córtex frontal, mas essa resposta foi atenuada pela ativação farmacológica ou superexpressão de receptores CB1 ou CB2. Além disso, a superativação de células microgлияis após a estimulação de LPS, juntamente com respostas ansiogênicas e condicionamento do medo sensibilizado após exposição repetida ao estresse em camundongos, foram reduzidas ou evitadas por um agonista CB1/CB2 não seletivo durante o estresse (Lisboa *et al.*, 2018). Assim, os eCBs parecem atuar como um sistema tampão contra estressores, atenuando respostas comportamentais em situações estressantes e limitando a resposta inflamatória a diferentes estímulos (Lisboa *et al.*, 2016).

Há também evidências que apoiam uma interação entre os receptores canabinoides e a via TLR4 (para revisão, ver (Souza-Junior *et al.*, 2022)). Por exemplo, estudos mostram que a ativação de CB2 por 2-AG pode diminuir a sinalização de TLR4, sugerindo um mecanismo de proteção (Xiang *et al.*, 2018). Além disso, a ativação de receptores canabinoides tem sido relatada em estudos *in vitro* para atenuar os efeitos inflamatórios da ativação de TLR4 (Lou *et al.*, 2018; Espinosa-Riquer *et al.*, 2019).

3. HIPÓTESE

As informações apresentadas anteriormente sugerem que durante a resposta a um estresse agudo, a ativação da via do receptor TLR4 no CPF resultaria na liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, estando envolvida na gênese para alterações comportamentais ocasionadas pelo estresse. Ainda, que esse aumento da ativação do TLR4 poderia influenciar em componentes do sistema endocanabinoide. Dessa forma, neste trabalho testamos a hipótese

de que a inibição farmacológica da sinalização TLR4 com TAK-242 diretamente no CPFm de ratos submetidos a um estresse agudo atenuaria as consequências comportamentais e moleculares do estresse. Ainda, que tais efeitos poderiam ser, em parte, envolver a sinalização endocanabinoide.

OBJETIVOS

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar o envolvimento da via do receptor TLR4 no CPFm nas consequências comportamentais do estresse agudo e a possível participação da sinalização endocanabinoide local.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar as respostas comportamentais **sugestivas de ansiedade e depressão em modelo animal** ocasionadas pelo estresse agudo de restrição.
- Avaliar se a inibição local da via do TLR4 no CPFm atenua os efeitos comportamentais do estresse, bem com alterações moleculares, **na expressão de genes como TLR4, HMGB1, MYD88, IL-1 β , CB-1, CB-2, FAAH, NAPE-PLD, MAGL, DAGL, PPAR γ .**
- Avaliar a expressão dos receptores TLR4 e canabinoides e moléculas envolvidas nessas vias de sinalização no CPF após exposição a estresse.

MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais de experimentação

Foram usados Ratos machos Wistar Hannover (adquiridos com 6-7 semanas de vida). Os animais foram alojados e divididos em três por gaiola e mantidos em biotério uma temperatura constante de 24 ± 2 ° C e um ciclo claro-escuro de 12 horas (6:00-18:00). Todos os animais tiveram comida e água ad *libitum*. Após chegarem, os animais passaram por um período de pelo menos uma semana de habituação no biotério do laboratório antes de iniciarem os procedimentos experimentais, quando os animais estavam entre 8-9 semanas de vida. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sob número 21.1.539.60.3.

5.2 Soluções e drogas

Foi utilizada o (6R) -6- [N- (2-cloro-4-fluorofenil) sulfamoil] ciclohex-1-eno-1-carboxilato de etil), Resatorvid (TAK-242, MedChemExpress), um inibidor seletivo de TLR4 que funciona bloqueando seu domínio intracelular TIR (Toll / Receptor IL-1) sem afetar o docking extracelular com seu principal ligante, o lipopolissacarideo (LPS). Assim, o TAK-242 inibe a sinalização intracelular do TLR4, impedindo a ligação às suas moléculas adaptadoras (Takashima *et al.*, 2009). Foram utilizadas três doses de TAK-242 com base em dados da literatura (0,3, 3, 9 µg/0,2 µl) para administração bilateralmente no CPFm PL (Tramullas *et al.*, 2014; Hua *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2020). TAK-242 foi dissolvido em 100% DMSO.

5.3 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotaxia para implantação bilateral de cânulas no CPFm, porção prélimbica (PL), conforme previamente descrito por nosso grupo (Vila-Verde *et al.*, 2016). Sete dias antes do início do experimento (sessão de estresse), os ratos foram anestesiados com ketamina+xilazina (80 e 7mg/kg, respectivamente), intraperitonealmente (i.p.) e após perderem o reflexo e tônus postural, foram fixados ao aparelho estereotáxico. Cada animal recebeu uma injeção intramuscular do antibiótico (0,27 g/kg; Pentabiótico; Fort Dodge Brasil) e um anti-inflamatório não esteroide (0,025 g/kg via Ip.; Banamine; Schering Plough, Brasil). Após anestesia local no couro cabeludo com lidocaína a 3%, no crânio foi feita uma incisão de aproximadamente 1 cm, a calota foi exposta e limpa para localização das coordenadas em que foram introduzidas as cânulas. Foram feitos dois furos com auxílio de uma broca na calota nas coordenadas da região de interesse, bem como um terceiro furo para colocar um parafuso que ajuda na fixação do capacete. As cânulas-guia de

ação inoxidável (9 mm) foram implantadas bilateralmente na porção PL do CPFm, usando o aparelho estereotáxico (Stoelting, Illinois, EUA). As coordenadas estereotáxicas para implantação da cânula no CPFm PL foram escolhidas com base no atlas do cérebro de rato Paxinos e Watson, (AP:+ 3,3 mm de Bregma, L: 1,9 mm; profundidade: 2,8 mm; ângulo: 22°) e de acordo com resultados prévios do nosso grupo de pesquisa. A posição da barra incisiva foi fixada em -2,5 mm. As cânulas foram fixadas ao crânio com cimento dentário e um parafuso de metal.

Ao final da cirurgia, os animais foram acondicionados em uma gaiola com aquecimento, onde permaneceram sob observação por 30 minutos. Após esse período, os animais retornaram às suas gaiolas. Posteriormente, os animais foram submetidos ao protocolo experimental. A injeção intra-CPFm foi feita com auxílio de agulhas introduzidas bilateralmente através da cânula guia. Foi injetado volume fixo de 0,2 µl/lado, durante 20 segundos, usando micro-seringa por uma bomba de infusão.

5.4 Análise histológica dos sítios de administração de drogas

Ao término dos experimentos comportamentais, os animais foram anestesiados e logo em seguida submetidos a coleta de sangue e posterior perfusão, durante o processo de dissecação encefálica, foi realizado um corte coronal na região do CPF próximo as cânulas-guias, para todos os animais foram feitas fotografias em alta resolução. Além disso, durante a padronização do processo cirúrgico, com auxílio de uma agulha dentária foi inserido bilateralmente na cânula guia de alguns animais 0,2 µl/lado o corante azul de metileno, e posteriormente esses animais foram perfundidos com salina isotônica, seguida por uma solução de formalina 10%. Os encéfalos foram removidos e imersos em uma solução de formalina 10%, a fim de serem seccionados em criostato (Cryocut 1800, -18°C) em espessura de 40 µm.

5.5 Protocolo de estresse por restrição (ER)

Inicialmente os animais foram submetidos ao protocolo de estresse de restrição (ER) em tubos metálicos (6,3 × 19,3 cm), com teto ajustável ventilado por orifícios, durante 3h em temperatura ambiente, de acordo com procedimento padronizado em nosso grupo de pesquisa (Vila-Verde *et al.*, 2016). Considerando que o alojamento pós-estresse pode interferir nas mudanças comportamentais tardias do ER (Andrade and Guimarães, 2003), os animais permaneceram isolados após o estresse até o momento dos testes. Os animais naives também foram mantidos isolados, mimetizando a condição dos estressados.

5.6 Análise Comportamental

5.6.1 Testes do campo aberto (TCA)

O teste do campo aberto, foi realizado um dia antes do ER para avaliar a atividade locomotora basal dos animais e detectar possíveis diferenças pré-existentes, o que permite à randomização dos animais de acordo com os grupos experimentais. O aparato consiste em um cilindro de acrílico com formato redondo (diâmetro: 97 cm) circundado por parede acrílica 42 cm de altura. Os animais foram colocados individualmente no centro do aparato através do qual o seu comportamento é gravado para posterior análise da distância total percorrida através do software ANYMAZE.

5.6.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado foi utilizado para avaliar o comportamento relacionado a ansiedade, na manhã seguinte após o término do protocolo de estresse. O LCE consiste em dois braços abertos opostos (34×6.5 cm) interceptados perpendicularmente por dois braços fechados (paredes de 15 cm de altura), de iguais dimensões às dos braços abertos. O labirinto é elevado 50 cm do chão. Os ratos foram colocados individualmente no centro do labirinto, com a face voltada para um dos braços abertos, para livre exploração durante 5 min. O comportamento foi filmado e posteriormente avaliado com software Any-Maze (V. 4.5, Stoelting, IL, USA). Nesse teste, os seguintes parâmetros foram avaliados: a percentagem de entrada, tempo nos braços abertos, e o número de entradas nos braços fechados, como índice da atividade locomotora, índice de ansiedade e tempo no centro. A redução da exploração dos braços abertos sem alteração no número de entradas nos braços fechados e índice de atividade locomotora indica um comportamento do tipo ansiogênico (Komada *et al.*, 2008).

5.6.3 Teste do nado forçado (TNF)

Foi realizado imediatamente após o término do LCE para avaliar a estratégia de enfrentamento (passiva ou ativa) dos animais durante a situação inescapável do nado, de forma similar ao que padronizamos recentemente no laboratório em animais Hannover (teste do campo aberto seguido do TNF). Após o teste no LCE, os animais foram colocados por 5 minutos em um tubo cilíndrico transparente (medidas: 30cm de diâmetro e 40cm de altura, com 30cm de água a temperatura controlada 23-25° C). A água do cilindro foi trocada entre cada animal para evitar que possíveis pistas olfativas interferissem na resposta comportamental exibida no teste. O comportamento foi gravado para análise posterior do tempo de imobilidade, natação e

escaladas (Can *et al.*, 2012). Os comportamentos foram avaliados manualmente, mas com auxílio para registro do software *Scoring*, desenvolvido na Universidade de Aarhus, Dinamarca, de modo “cego” e randomizado.

5.7 Coleta de material e análises

5.7.1 Coleta de sangue

Cerca de 20 minutos após o término das avaliações comportamentais (TCA; LCE; TNF), os animais receberam anestesia profunda para coleta do sangue da aorta abdominal. Em seguida, o sangue foi adicionado em tubos com EDTA para obtenção do plasma por centrifugação a 2.500 rpm por 15 minutos. Posteriormente o plasma foi congelado para a determinação de níveis de corticosterona (CORT).

5.7.2 Eutanásia e obtenção dos tecidos

Concomitante a coleta de sangue, foi realizado o método de exsanguinação por punção cardíaca, que garantiu a morte do animal. Através de um cateter na crossa aórtica, os animais foram perfundidos sem fixação de tecido com 100 ml com PBS (tampão fosfato salino) 1X gelado. Após a perfusão, os encéfalos foram removidos da calota craniana, foi feito um corte coronal com auxílio de uma lâmina para verificar as posições das cânulas e dos sítios de injeções. Em seguida, o CPFm e o HIP foram dissecados, foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenados à -80°C para análises posteriores (Western blotting e PCR em tempo real).

5.8 Análises moleculares

5.8.1 ELISA

Os níveis de CORT plasmáticos foram avaliados usando um kit comercial (Corticosterona EIA ADI-901-097, Enzo Inc.) seguindo as instruções do fabricante. Os ensaios foram realizados em duplicata. As amostras foram descongeladas imediatamente antes do uso e mantidas em gelo. O fator de diluição utilizado foi de 1:40.

5.8.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

O RNA das amostras de CPF foi isolado através do método de Trizol, para avaliar a expressão de genes de interesse (TLR4, HMGB1, MYD88, IL-1 β , CB-1, CB-2, FAAH, NAPE-PLD, MAGL, DAGL, PPARg). A fita complementar de DNA (cDNA) foi sintetizada a partir de transcrição reversa utilizando kit High Capacity RT PCR (ThermoFisher) com 2 μ g de RNA. As alterações nos níveis de mRNA foram determinadas pelo sistema de PCR em tempo real (Step One; ThermoFisher), usando o ensaio da expressão gênica qPCRBIO probe mix Hi-Rox

(Cat. N° PB20.22-05) e 50 ng de cDNA, de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação relativa da expressão dos genes foi realizada empregando o método 2- $\Delta\Delta$ CT, sendo representado como *fold induction* em relação aos animais controle.

As sondas utilizadas foram: TLR4 (Rn00569848_m1), HMGB-1 (Rn02377062_g1), MYD88 (Rn01640049_m1), IL1-B (Rn00580432), CB-1 (Rn00562880_m1), CB-2 (Rn01637601_m1), FAAH (Rn00577086_m1), NAPE-PLD (Rn01786262_m1), PPAR γ (Rn00440945_m1), MAGL (Rn00593287_m1) DAGL (Rn01454303_m1).

5.9 Análise estatística

Os parâmetros comportamentais considerados nas análises estatísticas foram: percentuais de entrada e tempo nos braços abertos, número de entradas nos braços fechados, distância total percorrida (LCE), tempo de imobilidade, natação e escalada (TNF). Outras variáveis analisadas foram alterações em parâmetros bioquímicos (corticosterona) e na expressão de genes (qPCR). Os grupos naive-veículo e estresse-veículo foram comparados por teste t de Student e, posteriormente, os grupos estressados foram comparados entre si (condição, tratamento), e analisados por One-way ANOVA, pós test Dunnett's. O nível de significância assumido foi de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 9.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA).

5.10 Procedimentos experimentais

5.10.1 Experimento 1.1: Avaliação das respostas comportamentais e moleculares após bloqueio de receptores TLR4 no CPFm de animais submetidos ao estresse de restrição agudo

Neste experimento foram avaliadas as consequências da administração do TAK-242 e veículo no CPFm de animais submetidos ao estresse agudo. Sete dias após a cirurgia para implante de cânulas-guia, os animais foram submetidos ao TCA para avaliar possíveis diferenças na locomoção basal, através da distância total percorrida. No dia posterior um grupo de animais foi submetido ao estresse de restrição, conforme descrito na metodologia, enquanto os animais naives foram mantidos em suas caixas-moradia e apenas manipulados.

Os animais receberam injeção local do inibidor de TLR4 (TAK-242) ou veículo (0,2 μ L) 10 minutos antes de serem submetidos ao estresse. O comportamento foi avaliado no dia seguinte no LCE, seguido do TNF, conforme descrito anteriormente. Logo após o término da avaliação comportamental, os animais ficaram 15 min em repouso e em seguida foram

anestesiados para a coleta de sangue. Após, os animais foram eutanasiados, os encéfalos coletados para visualização dos sítios de injeção no CPFm e, a seguir o CPF foi coletado, conforme descrito na metodologia. De acordo com a percentagem de erros na cirurgia, experimentos adicionais foram realizados para completar o tamanho amostral.

Tabela 1: Grupos experimentais.

	Experimento	Nº total de animais
Tratamento	NAIVE Veículo	13
	ESTRESSE Veículo	13
	ESTRESSE TAK-242 0,3	13
	ESTRESSE TAK-242 3,0	13
	ESTRESSE TAK-242 9,0	13

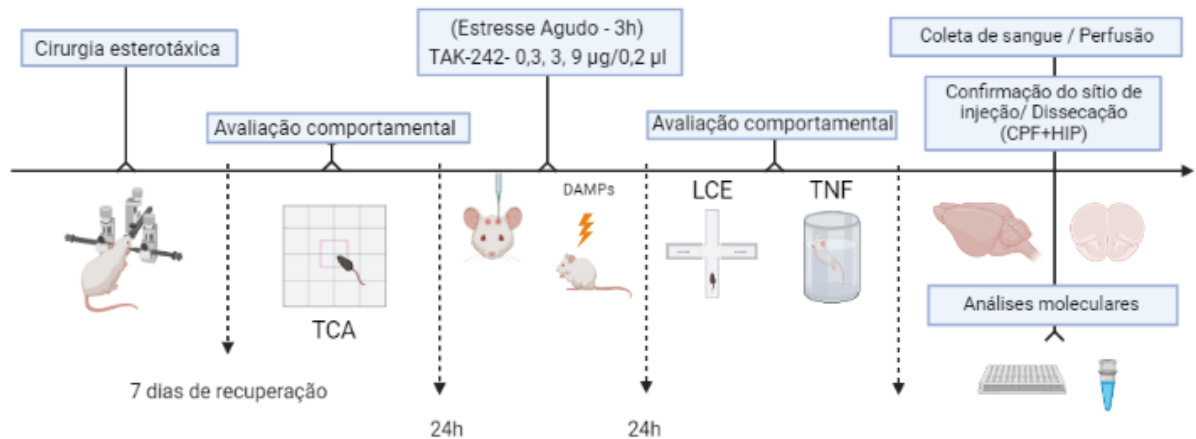


Figura 2: Imagem representativa do delineamento experimental. Criado com auxílio da ferramenta BioRender.co

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Localização dos sítios de injeção

No presente estudo, os sítios de injeção foram analisados com o auxílio do Atlas de Paxinos e Watson (2005) (fig. 3A) e identificados a partir de fotografias (fig. 3B). Inicialmente, foi realizada a padronização da cirurgia para ajustes das coordenadas utilizadas. Os dados dos animais cujos sítios de injeção estavam corretamente posicionados no CPFm PL estão representados pelos pontos vermelhos; pontos em preto representam as injeções fora CPFm PL e estes dados foram excluídos das análises estatísticas.

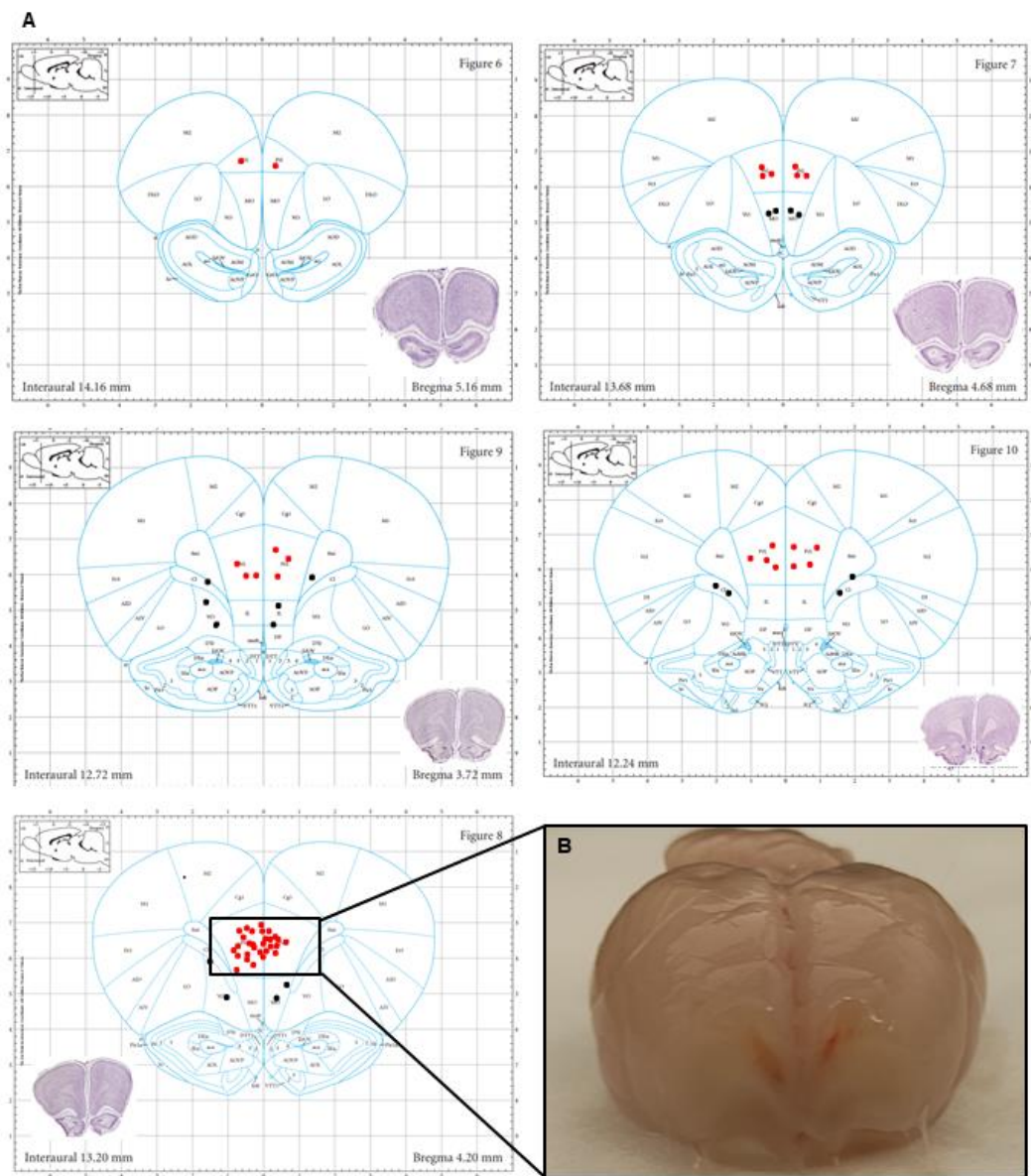


Figura 3: Figura-atlas da região de microinjeção no CPFm na porção pré-limbica, para verificar o alcance da agulha, com base no atlas Paxinos e Watson (2005). Para todos os animais foram feitas as fotografias da região.

6.2 Avaliação das respostas comportamentais e moleculares de animais submetidos ao estresse de restrição agudo após implantação de cânulas-guia direcionadas ao CPFm.

Sete dias após a cirurgia para implante de cânulas-guia, todos animais foram submetidos ao TCA para avaliar possíveis diferenças na locomoção basal. Para avaliar a deambulação dos animais foi considerado somente a distância total percorrida de cada animal no teste. Inicialmente todos os animais foram considerados naives divididos em cinco grupos (fig. 4A). Ao analisar a distância total percorrida dos animais operados, não foram identificadas alterações na locomoção. Esses dados evidenciam a ausência de possíveis alterações na locomoção ocasionadas pela cirurgia.

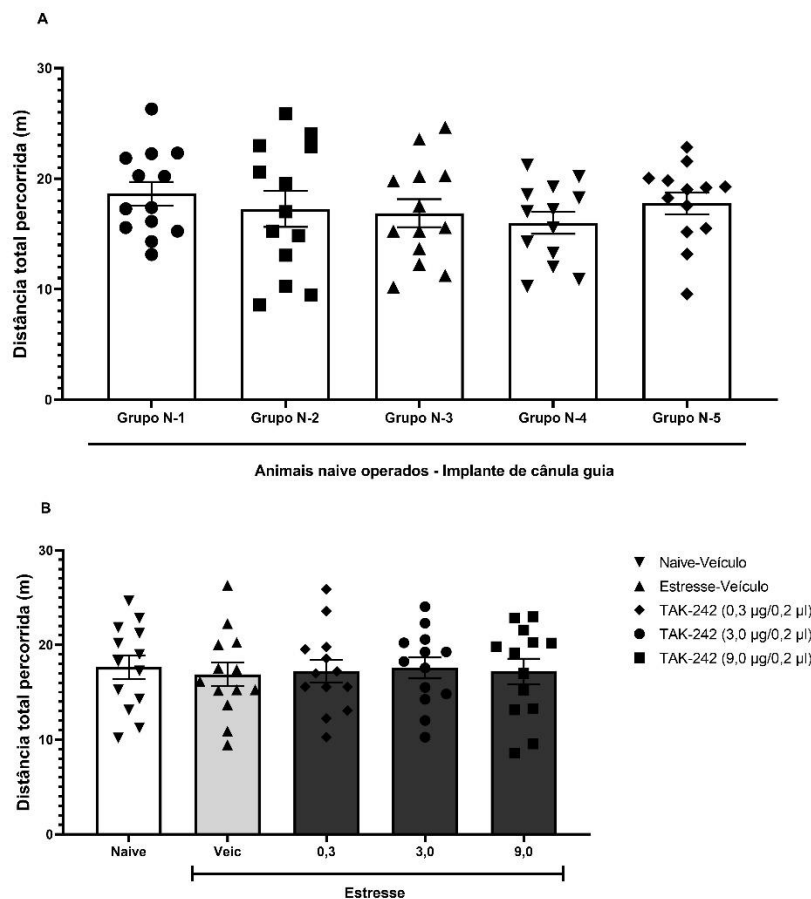


Figura 4: Animais submetidos ao TCA 24h antes do protocolo de ER para avaliar possíveis alterações na locomoção ocasionadas pelo processo cirúrgico. (A) Animais naives divididos em 5 grupos pós cirúrgicos, considerando o média da distância total percorrida entre os grupos, e comparados entre si. (B) Reorganização dos grupos experimentais considerando animais de alta deambulação e baixa deambulação em todos os grupos experimentais (nesse momento ainda não há nenhum tratamento farmacológico).

Ao identificar a média da distância total percorrida de cada grupo e comparar as médias entre os grupos, e verificar que os valores estavam próximos (fig. 4A), foi possível identificar os animais que estavam abaixo da média, considerados de baixa deambulação e animais acima da média, considerados de alta deambulação, sendo possível reorganizá-los nos grupos experimentais que posteriormente receberiam as drogas (fig. 4B). Com isso, foi possível redistribuir os animais entre os grupos (naive-veículo, estresse-veículo, estresse-droga), reduzindo o viés de alteração na locomoção e, portanto, tornando os grupos experimentais mais homogêneos possíveis.

6.2.1 Efeitos do ER e da modulação farmacológica na via do TLR4 CPFm-PL nos comportamentos avaliados no labirinto em cruz elevado .

No LCE foram avaliados o percentual de entradas (%entrada) e tempo (%tempo) de permanência nos braços abertos (fig. 5A, B), número de entradas nos braços fechados (fig. 5C) e a distância total percorrida (fig. 5D). Inicialmente foi feita a comparação entre os grupos naive-veículo e estresse-veículo e não foram observadas diferenças significativas (teste t de Student, $p > 0,05$). Quando avaliada a influência da administração das diferentes doses do TAK-242 nos parâmetros mensurados no LCE também não foram observadas diferenças entre os grupos (%entradas e %tempo $p > 0,05$). Não houve alteração no número de entradas nos braços fechados e distância total percorrida ($p > 0,05$).

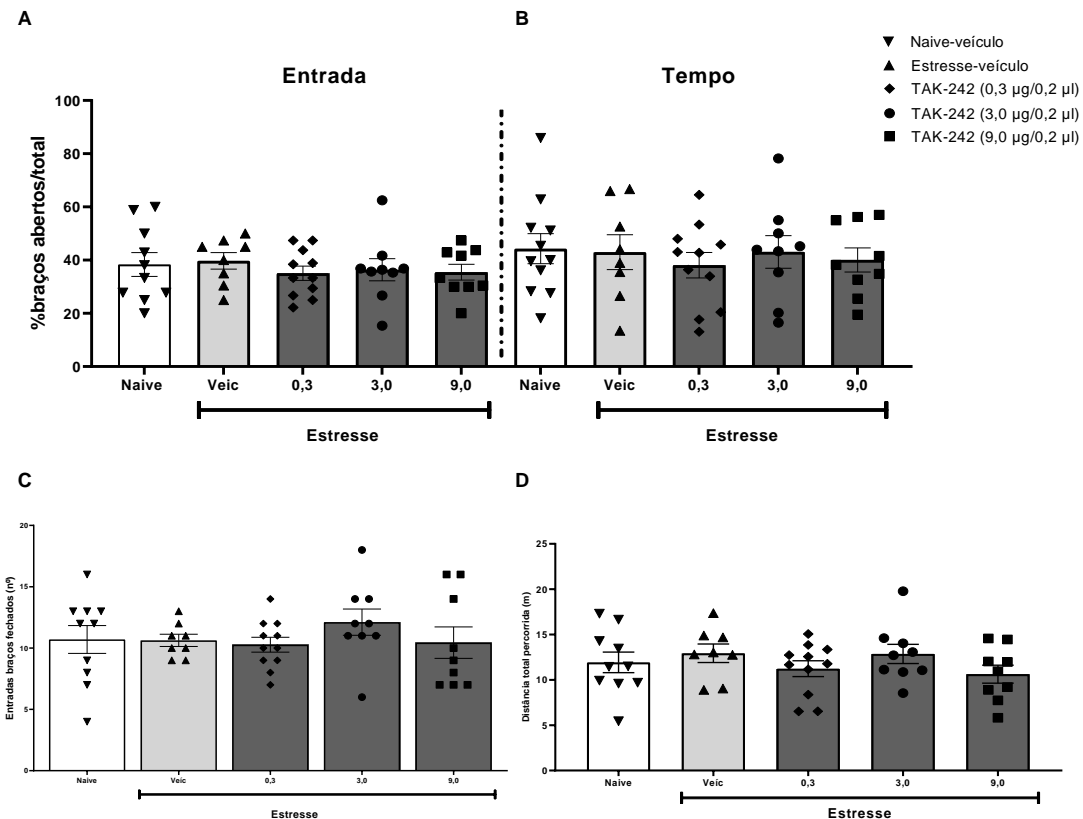


Figura 5: Avaliação dos efeitos do estresse de restrição (3 horas) em ratos machos Wistar Hannover submetidos ao tratamento na intra-porção pré-límbica do CPF com veículo ou TAK242 (inibidor da via do TLR4) e após 24 horas, testados no LCE. (A, B) Efeitos do estresse na % de tempo e entradas nos braços abertos, (C) Número de entradas nos braços fechados (D) Distância total percorrida. Os resultados foram expressos com a média \pm EPM. N = 8-13 animais/grupo.

6.2.2 Efeitos do ER e da modulação farmacológica na via do TLR4 CPFm-PL nos comportamentos avaliados no teste do nado forçado.

No TNF (fig. 6), foram avaliados o tempo de imobilidade (A), escalada (B) e nado (C). O grupo estresse apresentou aumento no tempo de imobilidade ($t=2.854$, $df=16$, $p= 0.0115$ teste t de Student; fig. 6A), diminuição no tempo de escalada ($t= 2.195$, $df=16$, $p= 0.0433$ teste t de Student; fig. 6B) e natação ($t=2.426$, $df=15$, $p= 0.0283$ teste t de Student; fig. 6C) quando comparado ao grupo naïve.

O tratamento com o TAK-242 nas doses 0,3 e 9,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ diretamente CPFm PL foi capaz de prevenir o aumento do tempo de imobilidade induzido pela exposição ao estresse ($F(3, 32) = 3.521$, $p=0.0446$, $p=0.0271$ $p<0,05$ Dunnett's). No parâmetro de escalada (fig. 6B), foi possível observar o efeito da droga, prevenindo a redução induzida pelo estresse ($F(3, 30) = 2.253$, $p=0,0459$ dose 9 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ Dunnett's). No tempo de nado houve uma tendência ao efeito das diferentes doses de TAK-242 em atenuar a redução induzida pelo estresse ($p>0,05$).

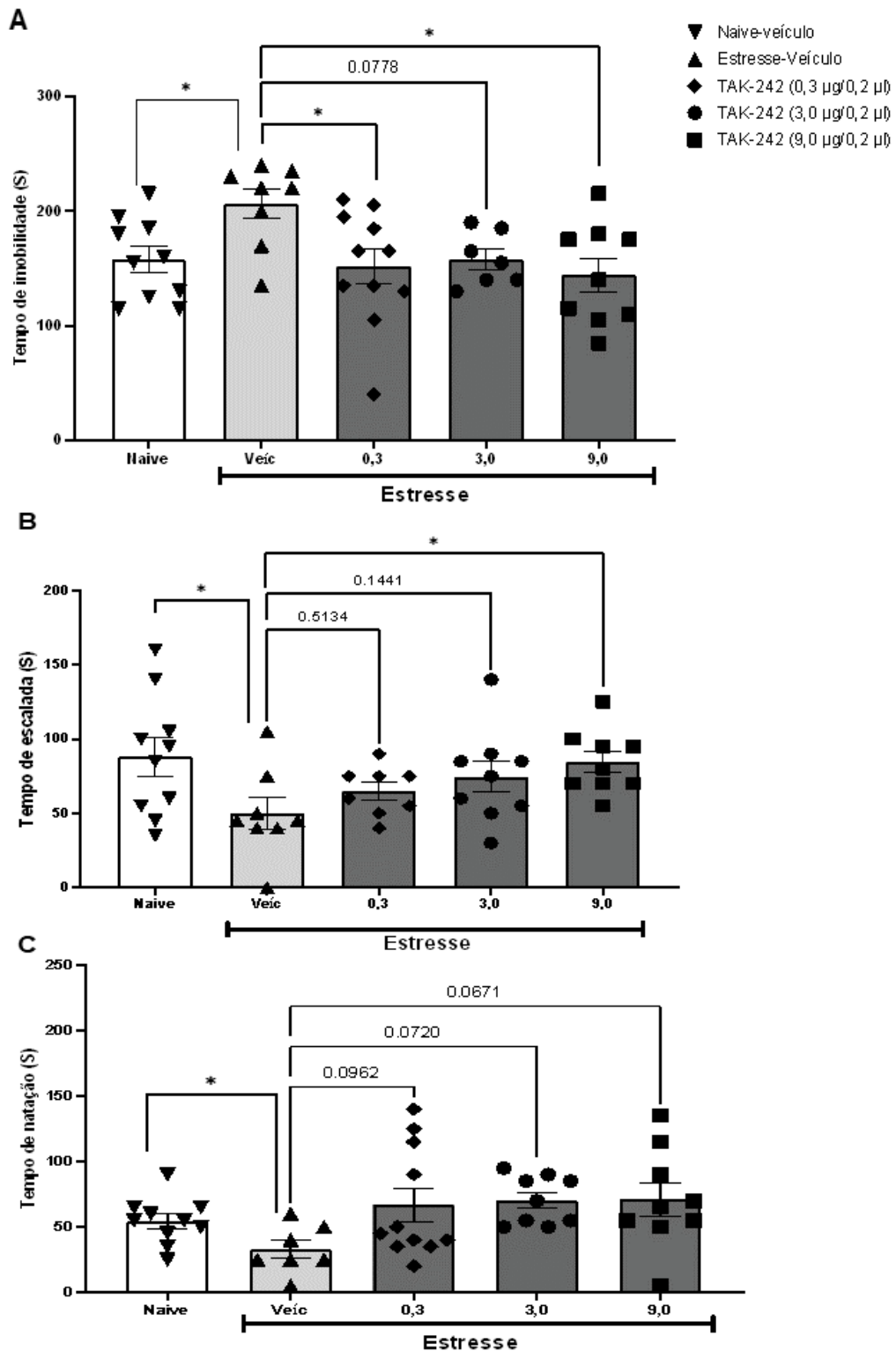


Figura 6: Avaliação dos efeitos do estresse de restrição (3 horas) em ratos machos wistar hannover submetidos ao tratamento intra-porção pré-límbica do CPF com veículo ou TAK242 (inibidor da via do TLR4) após 24 horas, testados no TNF. A) Tempo de imobilidade. B) Tempo de escalada e C) Tempo de natação. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle (naïve vs estresse veículo: teste t de Student; Estresse veículo vs TAK242: pós-teste Dunnett's). Os resultados foram expressos com a média \pm EPM. N = 8-13 animais/grupo.

6.2.3 Efeitos do estresse agudo de restrição e da modulação farmacológica pelo TAK-242 na ativação da via de sinalização do TLR4 no CPF.

A fim de elucidar elementos da via de sinalização do TLR4, foi analisada a expressão dos seguintes genes: TLR4, MyD88, HMGB-1, IL1 β . O ER foi capaz de aumentar de forma significativa os níveis da expressão gênica de TLR4 (fig. 7A) no CPF ($t=2.653$, $df=17$ $p=0.0167$). No entanto, não observamos diferenças significativas na expressão dos outros genes avaliados (fig. 7B, C, D; teste t de Student, $p>0,05$). Em relação ao efeito do TAK-242, foi possível observar uma prevenção do aumento na expressão de TLR4 induzida pelo estresse (fig. 7A) nas doses de 0,3 e 3,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ ($F(3, 34) = 3.417$, $p=0.0323$, $p=0.0197$ $p<0,05$ Dunnett's) quando comparado ao grupo estresse veículo, e uma tendência estatística na dose 9,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ ($p=0.0734$). Além disso, o TAK-242 diminuiu a expressão de IL1 β (fig. 7D) na dose de 0,3 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ ($F(3,33) = 3.881$, $p=0.0220$ $p<0,05$ Dunnett's), quando comparada ao grupo estresse-veículo. Não houve diferenças nos demais componentes da via do TLR4 (Myd88, HMGB-1) com as doses de TAK-242 utilizadas ($p>0,05$).

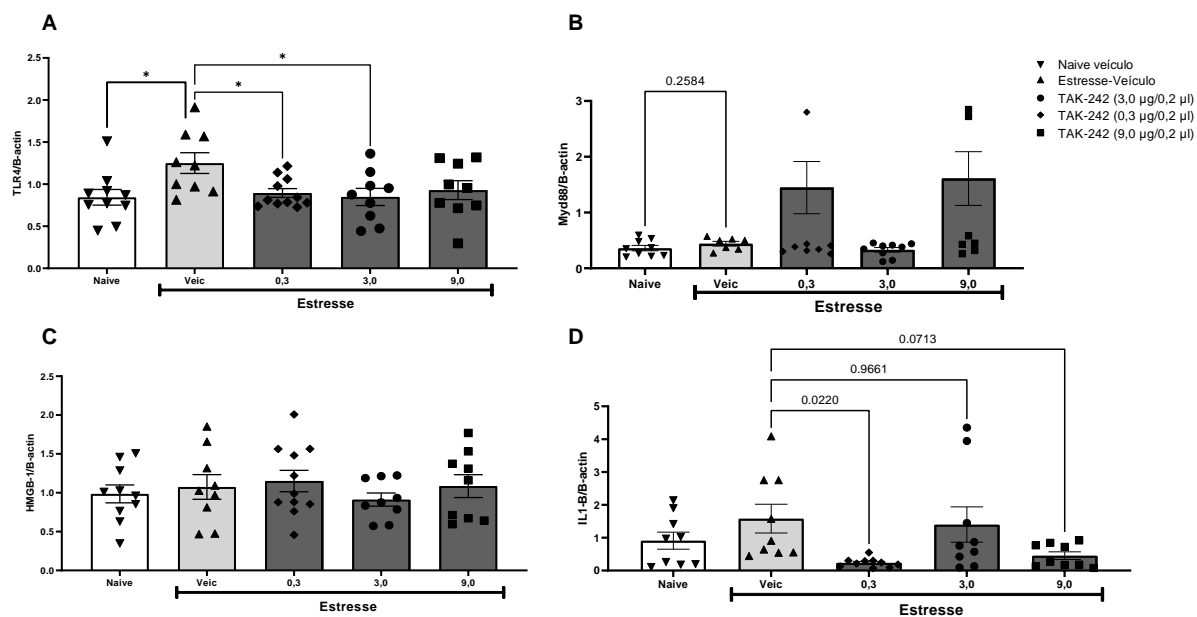


Figura 7: Efeitos do estresse agudo de restrição e do TAK-242 (0,3; 3,0; 9,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$) administrado no córtex pré-frontal de ratos na ativação da via de sinalização do receptor tool-like 4 (TLR4). A) Expressão dos genes de TLR4, B) Expressão dos genes Myd88, C) Expressão dos genes HMGB-1, D) Expressão dos genes DA IL1-B. * $p<0,05$ em relação ao respectivo controle (naïve vs estresse veículo: teste t de Student; Estresse veículo vs TAK242: pós-teste Dunnett's). Os resultados foram expressos com a média \pm EPM. N = 8-11 animais/grupo.

6.2.4 Efeitos do estresse agudo de restrição e da modulação farmacológica pelo TAK-242 em componentes do sistema endocanabinoide.

Adicionalmente, foi avaliada a expressão gênica de componentes do sistema endocanabinoide, CB1, CB2, FAAH, NAPE-PLD, MAGL, DAGL, PPAR α . Inicialmente foi feita a comparação entre os grupos naive-veículo e estresse-veículo e não observamos diferenças significativas (teste t de Student, $p > 0,05$) na expressão dos genes avaliados (fig. 8). A seguir avaliamos a influência da administração das diferentes doses do TAK-242 e também não foram observadas diferenças significativas.

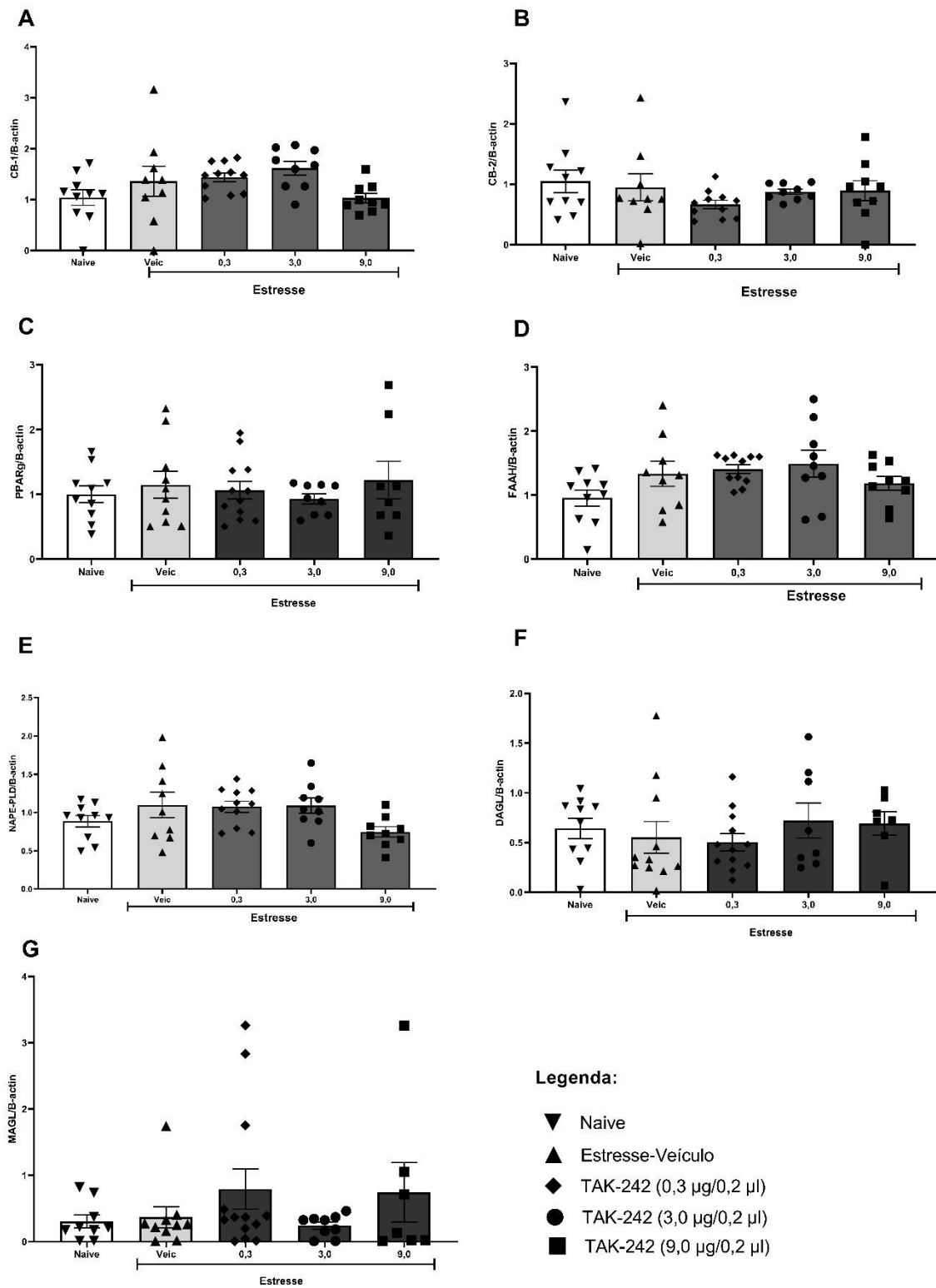


Figura 8: Efeitos do estresse agudo de restrição ou do TAK-242 (0,3; 3,0; 9,0 µg/0,2 µl) administrado no córtex pré-frontal medial-PL de ratos na expressão de componentes do sistema endocanabinoide. A) Expressão dos genes de CB-1 B) Expressão dos genes de CB-2. C) Expressão dos genes de PPARγ D) Expressão dos genes FAAH, E) Expressão dos genes de NAPE-PLD F) Expressão dos genes DAGL, G) Expressão dos genes de MAGL. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle (naïve vs estresse veículo: teste t de Student; Estresse veículo vs

TAK242: pós-teste Dunnett's). Os resultados foram expressos com a média \pm EPM. N = 8-13 animais/grupo.

6.2.5 Efeitos do estresse agudo de restrição e da modulação farmacológica pelo TAK-242 nos níveis plasmáticos de corticosterona.

O ER foi capaz de aumentar os níveis plasmáticos de corticosterona ($t=2.276$, $df=17$ $p=0.0360$), comparando grupo naive-veículo com estresse veículo (teste t de Student, $p>0,05$). A administração do TAK-242 (0,3; 3,0; 9,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$) foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de corticosterona induzido pelo estresse ($F(3, 34) = 3.714$, $p=0.0171$, $p=0.0310$, $p=0.0325$ $p<0,05$ Dunnett's).

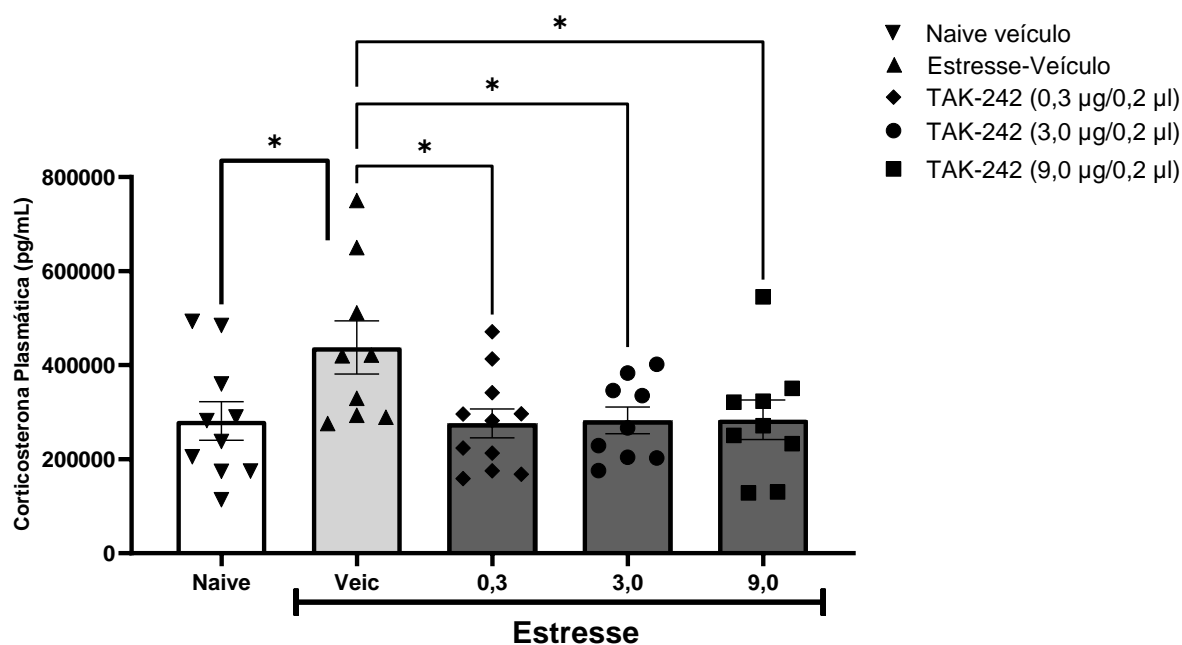


Figura 9: O ER levou a um aumento significativo de corticosterona plasmática, o que não observado nos grupos que receberam diferentes doses do TAK-242. Os resultados foram expressos com a média \pm EPM. N = 8-11/grupo. * $p<0,05$.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o possível envolvimento da sinalização TLR4 no CPFm, porção pré-límbica, na resposta ao estresse em ratos Wistar Hannover, incluindo mudanças comportamentais relacionadas a transtornos psiquiátricos, e se poderiam envolver a modulação do sistema eCB local. Em nossos achados, o estresse de restrição (ER) agudo foi capaz de promover alterações comportamentais significativas no TNF, com aumento no tempo de imobilidade, diminuição no tempo de escalada e natação. Curiosamente, não observamos alterações nas respostas comportamentais desses animais quando submetidos ao LCE, o que difere dos aspectos comportamentais ansiogênicos descritos anteriormente por nosso grupo em ratos Wistar submetidos ao mesmo protocolo de estresse (Vila-Verde *et al.*, 2016).

Uma possível explicação para ausência de modulação comportamental no LCE ocasionadas pelo ER pode estar relacionada a linhagem animal empregada, em que o protocolo de ER empregado não foi um estressor suficientemente intenso para induzir alterações comportamentais ansiogênicas no paradigma do LCE nos Wistar Hannover, contrastando com a resposta em Wistar (Padovan and Guimarães, 2000; Walf and Frye, 2007; Vila-Verde *et al.*, 2016; Figueiredo Cerqueira *et al.*, 2023). Várias linhagens de ratos mostram diferenças marcantes em testes de emocionalidade, o que pode afetar os resultados do teste (Liebsch *et al.*, 1998; Bonuti and Morato, 2022).

Por exemplo, algumas linhagens podem ser mais propensas a demonstrar comportamentos de ansiedade ou depressão em determinadas situações, enquanto outras podem apresentar respostas diferentes (Liebsch *et al.*, 1998). Além disso, existem vários outros fatores que podem modular a resposta de ansiedade em animais, como hormônios, neurotransmissores e fatores ambientais. Pode ser que a interação desses fatores com o estresse de restrição de 3 horas de duração, com efeitos avaliados 24 horas depois, tenha influenciado a resposta comportamental, resultando na ausência de um efeito ansiogênico observável em decorrência de uma resposta adaptativa (Figueiredo Cerqueira *et al.*, 2023).

As alterações observadas no TNF são corroboradas pelo descrito na literatura, que ratos submetidos ao TNF normalmente possuem imobilidade maior após sessões de estresse agudo de restrição em ratos Wistar (Bernal-Morales *et al.*, 2009; Suvrathan *et al.*, 2010). É interessante destacar que a pesquisa em modelos animais desempenha um papel crucial no avanço da compreensão dos mecanismos e hipóteses subjacentes ao TDM e o desenvolvimento de

métodos confiáveis para avaliar comportamentos depressivos são de extrema importância na pesquisa translacional.

Neste sentido, o TNF é amplamente utilizado para avaliar comportamentos do tipo-depressivo em animais, apresentando uma boa validade preditiva, sendo considerado um dos principais paradigmas comportamentais nesse campo (Porsolt *et al.*, 1977; Cryan and Holmes, 2005; Slattery and Cryan, 2012), embora existam críticas em relação à interpretação do comportamento avaliado (Commons *et al.*, 2017). Sendo assim, é possível inferir que o ER, desencadeou alterações nas respostas fisiológicas e comportamentais da linhagem de animais utilizada, evidenciado pelo aumento na imobilidade, bem como redução nos comportamentos ativos de natação e escalada, no TNF. Essas alterações possivelmente são influenciadas pela alteração no eixo HPA ocasionado pelo estresse agudo, podendo ser explicadas como desadaptativas, em decorrência da aversividade ocasionada pelo TNF (Bogdanova *et al.*, 2013; De Kloet and Molendijk, 2016).

O eixo HPA desempenha um papel central na resposta ao estresse, envolvendo a liberação de hormônios do estresse, como o cortisol em humanos e corticosterona em animais. Vale salientar, que os estressores agudos ativam estruturas límbicas no tronco cerebral e/ou prosencéfalo. Dessa forma, o tronco cerebral é capaz de desencadear respostas rápidas do eixo HPA e SNA por meio de projeções diretas para neurônios hipofisiotróficos no PVN ou para neurônios autonômicos pré-ganglionares (responsáveis pela resposta ao estresse) (Ulrich-Lai and Herman, 2009). Em condições normais, o eixo HPA regula e modula o equilíbrio imunológico através dos glicocorticoides. No entanto, eventos estressantes podem levar à hiperatividade do eixo HPA e desencadear aumento da resposta imunológica central e periférica (para revisão ver (Souza-Junior *et al.*, 2022).

Evidências indicam que o estresse agudo, como 3 h de restrição, pode induzir um aumento na corticosterona, resultando em aumento da neurogênese no giro denteado de ratos (Kirby *et al.*, 2013). Vale ressaltar que durante a neurogênese no giro denteado, a corticosterona induzida pelo estresse ativa a micróglia para manter a homeostase da neurogênese no hipocampo, ao modularem a proliferação e sobrevivência neuronal (Aarum *et al.*, 2003). A ativação de receptores de glicocorticoides no hipocampo medeia a ativação microglial, resultando em neuroinflamação do hipocampo e comportamentos do tipo depressivo em ratos (Feng, X. *et al.*, 2019).

Estudos utilizando modelos animais têm demonstrado que a ativação microglial está associada a comportamentos do tipo depressivo, como a redução da atividade locomotora, anedonia e desamparo aprendido, frente a estressores agudos (Wang, Y.-L. *et al.*, 2018; Afridi and Suk, 2023). Evidências mostram que a exposição a estressores agudos em animais de laboratório induzem a expressão de moléculas da via TLR4 em áreas cerebrais relacionadas a distúrbios neuropsiquiátricos, particularmente no CPFm, apoiando um papel essencial para TLR4 em transtornos do humor (Gárate, Garcia-Bueno B Fau - Madrigal, *et al.*). Dessa forma, podemos sugerir, que as alterações comportamentais ocasionadas pelo ER no TNF também podem estar associadas em partes ao aumento da expressão e ativação dos receptores TLR4 no CPF, mediada pela ligação de DAMPs, moléculas endógenas descritas como “alarminas”, como HMBG-1 e/ou proteínas de choque térmico, liberadas em durante a situação de estresse (Antón *et al.*, 2017; Quave *et al.*, 2021; Shirayama *et al.*, 2022).

Além disso, o aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona observados nos animais submetidos ao ER também pode estar envolvido nas alterações comportamentais observadas, uma vez que a ativação da sinalização do TLR4 é capaz de estimular o eixo HPA (Báez and Volosin, 1994; Vargas-López *et al.*, 2015). Como evidenciado, a interrupção da função normal do eixo HPA é descrita em diversos transtornos neuropsiquiátricos. Normalmente o estresse agudo promove respostas neurocomportamentais necessárias que melhoram as chances de sobrevivência em ambientes desafiadores (De Kloet and Molendijk, 2016). No entanto, o comprometimento nas respostas normais e adaptativas ao estresse indicam falha subjacentes no sistema neuroendócrino, que regula o processo de reatividade ao estresse (De Kloet and Molendijk, 2016). Além do aumento de corticosterona, uma única exposição ao ER também é capaz de alterar a homeostase do glutamato, aumentando a concentração extracelular desse aminoácido excitatório em diversas estruturas límbicas, inclusive no CPF (Moghaddam, 1993; Amat *et al.*, 2005). Durante situações de aumento da sinalização neuroimune esse processo também é alterado, desencadeando neurotoxicidade do glutamato e subsequente morte neuronal (Varodayan *et al.*, 2018).

Outros achados de nosso estudo evidenciaram aumento na expressão gênica de TLR4 neste protocolo de estresse. Estes dados vão de acordo com dados da literatura que mostram que 2 horas de exposição ao ER já é capaz de aumentar a expressão gênica de TLR4 (Gárate *et al.*, 2014). O antagonismo com TAK-242, nas doses de 0,3 e 3,0 µg/0,2 µl, também promoveu redução na expressão gênica dos níveis de TLR4 no CPF, evidenciando a participação do TLR4 como importante fator regulador na resposta fisiológica ao estresse. Embora em nosso estudo

não tenha sido observado um aumento significativo nos níveis do mRNA de HMGB-1 24h após o ER, as respostas inflamatórias do estresse provavelmente já estavam sendo mediadas pela ativação do NF- κ B e síntese de citocinas inflamatórias (Wang, B. *et al.*, 2018).

A modulação farmacológica da via TLR4 pela administração de TAK-242 (0,3 e 9,0 μ g/0,2 μ l) no mPFC-PL foi capaz de prevenir as alterações comportamentais observadas no TNF 24h após o ER. Além disso, a maior dose também aumentou de forma significativa o tempo de escalada, evidenciando uma modulação na resposta de comportamento ativo durante o TNF. Interessantemente, o tratamento com antidepressivos que interferem com a neurotransmissão da norepinefrina aumenta seletivamente a escalada no TNF, enquanto drogas que influenciam a neurotransmissão da serotonina melhoram o comportamento de natação (Detke *et al.*, 1995; Du *et al.*, 2020). Esses achados podem dar indícios sobre vias de neurotransmissores que são influenciadas pela inibição do TLR4 no CPFm-PL.

Outros efeitos descritos do TAK-242 em modelos comportamentais de depressão também já foram associados a moléculas envolvidas com a resposta ao estresse e efeitos antidepressivos. Por exemplo, a infusão aguda de TAK-242 na dose de 10 μ g/0,2 μ l no ventrículo cerebral induziu efeito do tipo-antidepressivo no modelo de desamparo aprendido em ratos. Neste trabalho, os efeitos antidepressivos do antagonista TAK-242 envolvem a sinalização BDNF-TrkB e a ativação do receptor AMPA (Shirayama *et al.*, 2022).

Em estudos utilizando o modelo de estresse crônico imprevisível (CUMS), o TAK-242 administrado de forma aguda de forma intraperitoneal restaurou a preferência por sacarose e melhorou comportamentos relacionados à depressão (Fu *et al.*, 2019). Além disso, o tratamento com TAK-242 reduziu comportamentos de desamparo e a expressão de TNF- α no hipocampo em resposta ao estresse de derrota social crônica (CSDS) (Fu *et al.*, 2019; Shirayama *et al.*, 2022). O tratamento crônico com TAK-242 também reverteu o comportamento do tipo depressivo induzido por CUMS em camundongos C57bl/6 e ob/ob (camundongo mutante para o gene da leptina), revertendo o aumento de TNF- α , IL-6 e IL-1 β no hipocampo e no córtex frontal (Wang, Yihe *et al.*, 2018). Além disso, o TAK-242 também preveniu mediadores inflamatórios e oxidativos induzidos por estresse de restrição aguda (NF- κ B, COX-2, IL-1 β) no córtex frontal do cérebro de ratos (Gárate *et al.*, 2014). O bloqueio do TLR4 pelo TAK-242, e nocaute do TLR4, respectivamente, reduziram o tempo de imobilidade dos camundongos no teste de natação forçada, mas não o comportamento de esquiva social ou ansiedade induzido por estresse crônico de derrota social (Zhang *et al.*, 2020). Por fim, além dos modelos de

estresse, o TAK-242 também reverteu alterações comportamentais e o aumento de TNF- α no hipocampo após a administração intracerebroventricular das formas reduzidas de HMGB (dissulfeto HMGB1 - ds-HMGB1 - e HMGB1 totalmente reduzido - fr-HMGB1) (Lian *et al.*, 2017). Esses resultados sugerem que a modulação do receptor TLR4 com o TAK-242 pode ter efeitos antidepressivos através da modulação de mediadores inflamatórios.

O aumento de citocinas pro-inflamatórias em decorrência de um estímulo agudo no CPF está relacionada ao aumento da atividade do HPA e à produção elevada de corticosterona. Por outro lado, a redução da inflamação no CPF, seja por meio de intervenções farmacológicas ou modificações no ambiente, tem mostrado a capacidade de normalizar a atividade do HPA e reduzir a produção de corticosterona. Esses achados sugerem que a inflamação no PFC desempenha um papel importante na regulação do eixo HPA e na produção de corticosterona, fornecendo insights sobre as interações entre inflamação, estresse e regulação hormonal no cérebro (Herman *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017). Em nosso estudo todas as doses do TAK-242, foram capazes de prevenir o aumento de corticosterona plasmática frente a situação de estresse. Esses dados sugerem que níveis elevados de corticosterona, produzidos pela exposição ao estresse, podem sensibilizar o microambiente neuroimune pela suprarregulação da expressão de TLR4 em células imunes inatas do SNC (Weber *et al.*, 2013; Frank *et al.*, 2016).

Interessantemente, a dose de 0,3 μ g/0,2 do TAK-242 foi capaz de diminuir os níveis do RNAm da IL1- β . Tal redução pode ser porque ao bloquear TLR4, há menor ativação de NF- κ B e, conseqüentemente, de produção do RNAm da pro-IL-1 β , ou pela ação da corticosterona plasmática induzida pelo estresse, que é capaz de induzir a transcrição de NLRP3 através da atividade em TLR4 via 'alarminas' endógenas, como HMGB-1. (Busillo *et al.*, 2011; Frank *et al.*, 2016). De modo geral, o desencadeamento da cascata de sinalização intracelular da via do TLR4 leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Essas citocinas podem desempenhar um papel crucial na disfunção neuronal e na regulação dos processos neurobiológicos associados à depressão e à ansiedade. Além disso, estudos têm sugerido a interação entre o TLR4 e outras vias neurobiológicas, como o sistema serotoninérgico e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que podem contribuir para a interconexão entre a inflamação e os distúrbios psiquiátricos (Liu *et al.*, 2014).

Além disso, nem o estresse nem a modulação farmacológica com TAK-242 afetou a expressão de MyD88, o que pode ser em decorrência da ativação de outras vias de transdução de sinal independentes de TLR-4/MyD88, como a via dependente de TRIF, que também possam

ser ativadas por estresse (Woo *et al.*, 2012; Muralidharan and Mandrekar, 2013; Muralidharan *et al.*, 2018). Finalmente, uma interpretação plausível é que as vias TLR4 podem ter sido preparadas para ativação, mas não são realmente ativas nessas condições (Gárate *et al.*, 2014; Kawasaki, Takumi and Kawai, Taro, 2014).

A presença de sinalização eCB em núcleos sensíveis ao estresse, como estruturas hipotalâmicas e límbicas (amígdala, hipocampo e CPF) sugere que ela desempenha um papel essencial na regulação dos efeitos neuroendócrinos e comportamentais do estresse. A amígdala é uma das principais estruturas límbicas envolvidas na ativação do eixo HPA em resposta a estímulos estressantes. Em contraste, o hipocampo e o CPF foram identificados como inibidores do eixo HPA e também estão envolvidos no feedback negativo mediado por glicocorticoides. Conseqüentemente, a sinalização adequada do eCB no sistema límbico é essencial para mitigar as conseqüências de situações estressantes aversivas, conforme amplamente relatado (Lisboa *et al.*, 2017).

A exposição ao estresse afeta o sistema eCB no cérebro. Por exemplo, o estresse agudo ou homotípico crônico ativo a FAAH e reduz os níveis de AEA; em contraste, os níveis de 2-AG são aumentados. O estresse homotípico repetido potencializa esses efeitos nos níveis de eCB e reduz a expressão de CB1 na maioria das áreas do cérebro, como hipocampo e amígdala, enquanto aumenta no CPF (Patel and Hillard, 2008).

Apesar da ausência de diferença estatística na expressão gênica de componentes do sistema eCB, a exposição ao estresse é capaz de afetar esse sistema em regiões encefálicas. Como descrito, há uma interação entre os receptores canabinoides e a via TLR4. Em que, a ativação de CB2 por 2-AG pode diminuir a sinalização de TLR4, sugerindo um mecanismo de proteção (Xiang *et al.*, 2018), assim como estressores agudos ou crônicos que são capazes de reduzir níveis de AEA e aumentar os 2-AG (Deroon-Cassini *et al.*, 2020). Além disso, a ativação de receptores canabinoides tem sido relatada em estudos *in vitro* para atenuar os efeitos inflamatórios da ativação de TLR4 (Lou *et al.*, 2018; Espinosa-Riquer *et al.*, 2019). Essas evidências, demonstram que sinalização disfuncional dos eCB em situações estressantes e pode contribuir para aumentar a excitabilidade neuronal e facilitar os efeitos inflamatórios do estresse nos circuitos neuronais.

Ademais, a elucidação dos mecanismos pelos quais os DAMPs liberados em situações de estresse agudo, que podem ativar a via de sinalização do TLR4 no SNC, precisa ser melhor investigada, assim como o envolvimento do sistema endocanabinoide nesse processo

Vale salientar, que dados prévios do nosso grupo de pesquisa, concomitante com dados disponíveis na literatura acadêmica evidenciam que os efeitos do DMSO em altas concentrações diretamente no cérebro, não são capazes de ocasionar alterações comportamentais (Blevins *et al.*, 2002). É importante destacar que, apesar das alterações ocasionadas pelo estresse e dos efeitos do TAK-242, algumas limitações do estudo precisam ser destacadas, como padronização de um único ponto de corticosterona, sendo que, evidências que aumento nos níveis de corticosterona plasmática também pode ocorrer após exposição a uma única sessão no TNF (Bogdanova *et al.*, 2013). Com isso, estudos adicionais precisam ser realizados para melhor elucidar esses efeitos.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Em suma, os dados sugerem que uma única exposição ao ER é capaz de promover alterações no sistema neuroimunológico no CPFm por meio da ativação da via do TLR4, desencadeando mudanças no fenótipo comportamental, que também podem ter sido influenciadas pelo aumento da corticosterona plasmática e pelo aumento da expressão de mRNA de TLR4 no CPF de ratos. O uso de TAK-242, que interfere na via de sinalização TLR-4, evidenciou que a modulação farmacológica desta via no CPFm PL é capaz de prevenir as alterações comportamentais ocasionadas pelo estresse, assim como a diminuição dos níveis de corticosterona plasmática, expressão de mRNA de TLR4 e IL1-B. Portanto, a modulação do TLR4 é um alvo interessante para entender as doenças neuropsiquiátricas caracterizadas por um processo neuroinflamatório. Apesar da ausência de efeitos significativos na expressão de genes de componentes do sistema endocanabinoide, estudos adicionais precisam ser realizados para melhor elucidar envolvimento desse sistema nesse processo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AARUM, J. et al. Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 26, p. 15983-8, Dec 23 2003. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424.

ABOUL-FOTOUH, S. et al. Behavioral effects of toll-like receptor-4 antagonist 'eritoran' in an experimental model of depression: role of prefrontal and hippocampal neurogenesis and γ -aminobutyric acid/glutamate balance. **Behav Pharmacol**, v. 29, n. 5, p. 413-425, 08 2018. ISSN 1473-5849. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29561292> >.

AFRIDI, R.; SUK, K. Microglial Responses to Stress-Induced Depression: Causes and Consequences. **Cells**, v. 12, n. 11, May 31 2023. ISSN 2073-4409.

AMAT, J. et al. Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 3, p. 365-71, Mar 2005. ISSN 1097-6256 (Print)

1097-6256.

ANDRADE, C. S.; GUIMARÃES, F. S. Anxiolytic-like effect of group housing on stress-induced behavior in rats. **Depress Anxiety**, v. 18, n. 3, p. 149-52, 2003. ISSN 1091-4269 (Print)

1091-4269.

ANTONELLI, F. et al. Alterations in Morphology and Adult Neurogenesis in the Dentate Gyrus of Patched1 Heterozygous Mice. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 11, p. 168-168, 2018. ISSN 1662-5099. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29875630> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5974030/> >.

ANTÓN, M. et al. Oleylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF- κ B danger signaling in rat frontal cortex and depressive-like behavior induced by ethanol binge administration. **Addiction Biology**, v. 22, n. 3, p. 724-741, 2017/05/01 2017. ISSN 1355-6215. Available at: < <https://doi.org/10.1111/adb.12365> >. Accessed on: 2022/03/31.

ARCURI, C. et al. The Pathophysiological Role of Microglia in Dynamic Surveillance, Phagocytosis and Structural Remodeling of the Developing CNS. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, 2017. ISSN 1662-5099. Available at: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2017.00191> >.

BAROCHIA, A. et al. Eritoran tetrasodium (E5564) treatment for sepsis: review of preclinical and clinical studies. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 7, n. 4, p. 479-494, 2011. ISSN 1744-7607

1742-5255. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21323610> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3065179/> >.

BECKING, K. et al. The association between immune activation and manic symptoms in patients with a depressive disorder. **Translational psychiatry**, v. 3, n. 10, p. e314-e314, 2013. ISSN 2158-3188. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24150223> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3818012/> >.

BELLEAU, E. L.; TREADWAY, M. T.; PIZZAGALLI, D. A. The Impact of Stress and Major Depressive Disorder on Hippocampal and Medial Prefrontal Cortex Morphology. **Biol Psychiatry**, v. 85, n. 6, p. 443-453, Mar 15 2019. ISSN 0006-3223 (Print)

0006-3223.

BERNAL-MORALES, B.; CONTRERAS, C. M.; CUETO-ESCOBEDO, J. Acute restraint stress produces behavioral despair in weanling rats in the forced swim test. **Behav Processes**, v. 82, n. 2, p. 219-22, Oct 2009. ISSN 0376-6357.

BLEVINS, J. E.; STANLEY, B. G.; REIDELBERGER, R. D. DMSO as a vehicle for central injections: tests with feeding elicited by norepinephrine injected into the paraventricular nucleus. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 71, n. 1-2, p. 277-82, Jan-Feb 2002. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057.

BOGDANOVA, O. V. et al. Factors influencing behavior in the forced swim test. **Physiol Behav**, v. 118, p. 227-39, Jun 13 2013. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384.

BONUTI, R.; MORATO, S. Bidirectional genetic selection of behaviors involved in social interaction of Wistar rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 55, p. e11979, 2022. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879x.

BRUNO, K. et al. Targeting toll-like receptor-4 (TLR4)-an emerging therapeutic target for persistent pain states. **Pain**, v. 159, n. 10, p. 1908-1915, Oct 2018. ISSN 1872-6623. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29889119> >.

BUSILLO, J. M.; AZZAM, K. M.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoids sensitize the innate immune system through regulation of the NLRP3 inflammasome. **J Biol Chem**, v. 286, n. 44, p. 38703-38713, Nov 4 2011. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

BUSQUETS-GARCIA, A.; BAINS, J.; MARSICANO, G. CB(1) Receptor Signaling in the Brain: Extracting Specificity from Ubiquity. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 1, p. 4-20, Jan 2018. ISSN 0893-133X (Print)

0893-133x.

BÁEZ, M.; VOLOSIN, M. Corticosterone influences forced swim-induced immobility. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 3, p. 729-736, 1994/11/01/ 1994. ISSN 0091-3057. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0091305794900930> >.

CALCIA, M. A. et al. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 9, p. 1637-1650, 2016. ISSN 1432-2072

0033-3158. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26847047> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4828495/> >.

CAN, A. et al. The mouse forced swim test. **J Vis Exp**, n. 59, p. e3638, Jan 29 2012. ISSN 1940-087x.

CASO, J. R. et al. Toll-Like Receptor 4 Is Involved in Subacute Stress-Induced Neuroinflammation and in the Worsening of Experimental Stroke. **Stroke**, v. 39, n. 4, p. 1314-1320, 2008/04/01 2008. Available at: < <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.498212> >. Accessed on: 2022/03/31.

CASTRÉN, E.; HEN, R. Neuronal plasticity and antidepressant actions. **Trends Neurosci**, v. 36, n. 5, p. 259-67, May 2013. ISSN 0166-2236 (Print)

0166-2236.

CATALE, C. et al. Microglial Function in the Effects of Early-Life Stress on Brain and Behavioral Development. **J Clin Med**, v. 9, n. 2, Feb 8 2020. ISSN 2077-0383 (Print)

2077-0383.

CHENG, Y. et al. Stress-induced neuroinflammation is mediated by GSK3-dependent TLR4 signaling that promotes susceptibility to depression-like behavior. **Brain Behav Immun**, v. 53, p. 207-222, Mar 2016. ISSN 0889-1591 (Print)

0889-1591.

CHU, X. et al. 24-hour-restraint stress induces long-term depressive-like phenotypes in mice. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 32935, 2016/09/09 2016. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://doi.org/10.1038/srep32935> >.

COMMONS, K. G. et al. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 955-960, 2017/05/17 2017. Available at: < <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.7b00042> >.

CRISTINO, L.; BISOGNO, T.; DI MARZO, V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 16, n. 1, p. 9-29, 2020/01/01 2020. ISSN 1759-4766. Available at: < <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z> >.

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 9, p. 775-790, 2005/09/01 2005. ISSN 1474-1784. Available at: < <https://doi.org/10.1038/nrd1825> >.

D'ALLOIA, A. et al. Palmitoylethanolamide Modulation of Microglia Activation: Characterization of Mechanisms of Action and Implication for Its Neuroprotective Effects. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 6, p. 3054, 2021. ISSN 1422-0067. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33802689> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8002502/> >.

DE KLOET, E. R.; MOLENDIJK, M. L. Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism. **Neural Plast**, v. 2016, p. 6503162, 2016. ISSN 2090-5904 (Print)
1687-5443.

DEAK, T. et al. Neuroimmune mechanisms of stress: sex differences, developmental plasticity, and implications for pharmacotherapy of stress-related disease. **Stress**, v. 18, n. 4, p. 367-380, 2015/07/04 2015. ISSN 1025-3890. Available at: < <https://doi.org/10.3109/10253890.2015.1053451> >.

DEROON-CASSINI, T. A. et al. Meet Your Stress Management Professionals: The Endocannabinoids. **Trends in Molecular Medicine**, v. 26, n. 10, p. 953-968, 2020/10/01/ 2020. ISSN 1471-4914. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491420301775> >.

DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 121, n. 1, p. 66-72, Sep 1995. ISSN 0033-3158 (Print)
0033-3158.

DEVANE, W. A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-9, Dec 18 1992. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075.

DOROFEIKOVA, M. et al. Effects of footshock stress on social behavior and neuronal activation in the medial prefrontal cortex and amygdala of male and female mice. **PLOS ONE**, v. 18, n. 2, p. e0281388, 2023. Available at: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281388> >.

DU, X. et al. Reduction of depression-like behavior in rat model induced by ShRNA targeting norepinephrine transporter in locus coeruleus. **Transl Psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 130, May 4 2020. ISSN 2158-3188.

DUNN, G. A.; LOFTIS, J. M.; SULLIVAN, E. L. Neuroinflammation in psychiatric disorders: An introductory primer. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 196, p. 172981-172981, 2020. ISSN 1873-5177

0091-3057. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32621927> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7430067/> >.

EL-ZAYAT, S. R.; SIBAIL, H.; MANNAA, F. A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, p. 187, 2019/12/12 2019. ISSN 2522-8307. Available at: < <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2> >.

ESPINOSA-RIQUER, Z. P. et al. TLR4 Receptor Induces 2-AG-Dependent Tolerance to Lipopolysaccharide and Trafficking of CB2 Receptor in Mast Cells. **J Immunol**, v. 202, n. 8, p. 2360-2371, 04 15 2019. ISSN 1550-6606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30814309> >.

FELGER, J. C.; LOTRICH, F. E. Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications. **Neuroscience**, v. 246, p. 199-229, Aug 29 2013. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522.

FEMENIA, T. et al. Toll-like receptor-4 regulates anxiety-like behavior and DARPP-32 phosphorylation. n. 1090-2139 (Electronic),

FENG, X. et al. Glucocorticoid-Driven NLRP3 Inflammasome Activation in Hippocampal Microglia Mediates Chronic Stress-Induced Depressive-Like Behaviors. **Front Mol Neurosci**, v. 12, p. 210, 2019. ISSN 1662-5099 (Print)

1662-5099.

_____. Glucocorticoid-Driven NLRP3 Inflammasome Activation in Hippocampal Microglia Mediates Chronic Stress-Induced Depressive-Like Behaviors. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, 2019. ISSN 1662-5099. Available at: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2019.00210> >.

FIGUEIREDO CERQUEIRA, M. M. D. et al. Comparative analysis between Open Field and Elevated Plus Maze tests as a method for evaluating anxiety-like behavior in mice. **Heliyon**, v. 9, n. 4, p. e14522, 2023/04/01/ 2023. ISSN 2405-8440. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844023017292> >.

FRANK, M. G. et al. Microglia: Neuroimmune-sensors of stress. **Semin Cell Dev Biol**, v. 94, p. 176-185, Oct 2019. ISSN 1084-9521 (Print)

1084-9521.

_____. Acute stress induces chronic neuroinflammatory, microglial and behavioral priming: A role for potentiated NLRP3 inflammasome activation. **Brain Behav Immun**, v. 89, p. 32-42, Oct 2020. ISSN 0889-1591 (Print)

0889-1591.

_____. Stress sounds the alarmin: The role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming. **Brain Behav Immun**, v. 48, p. 1-7, Aug 2015. ISSN 0889-1591 (Print)

0889-1591.

_____. Stress-induced neuroinflammatory priming: A liability factor in the etiology of psychiatric disorders. **Neurobiol Stress**, v. 4, p. 62-70, Oct 2016. ISSN 2352-2895 (Print)

2352-2895.

FRANKLIN, T. C.; XU, C.; DUMAN, R. S. Depression and sterile inflammation: Essential role of danger associated molecular patterns. **Brain Behav Immun**, v. 72, p. 2-13, 08 2018. ISSN 1090-2139. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29102801> >.

FU, S. et al. Tetramethylpyrazine ameliorates depression by inhibiting TLR4-NLRP3 inflammasome signal pathway in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 236, n. 7, p. 2173-2185, Jul 2019. ISSN 1432-2072. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30847567> >.

GARCÍA BUENO, B. et al. Innate immune receptor Toll-like receptor 4 signalling in neuropsychiatric diseases. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 64, p. 134-47, May 2016. ISSN 0149-7634.

GARCÍA-BUENO, B. et al. Evidence of activation of the Toll-like receptor-4 proinflammatory pathway in patients with schizophrenia. **J Psychiatry Neurosci**, v. 41, n. 3, p. E46-55, Apr 2016. ISSN 1180-4882 (Print)

1180-4882.

GODOY, L. D. et al. A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, 2018. ISSN 1662-5153. Available at: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2018.00127> >.

GUO, L. T. et al. Baicalin ameliorates neuroinflammation-induced depressive-like behavior through inhibition of toll-like receptor 4 expression via the PI3K/AKT/FoxO1 pathway. **J Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 95, May 08 2019. ISSN 1742-2094. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31068207> >.

GÁRATE, I. et al. Stress-induced neuroinflammation: role of the Toll-like receptor-4 pathway. n. 1873-2402 (Electronic),

_____. Stress-induced neuroinflammation: role of the Toll-like receptor-4 pathway. **Biol Psychiatry**, v. 73, n. 1, p. 32-43, Jan 1 2013. ISSN 0006-3223.

_____. Stress-Induced Neuroinflammation: Role of the Toll-Like Receptor-4 Pathway. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 1, p. 32-43, 2013. ISSN 0006-3223. Available at: < <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.07.005> >. Accessed on: 2022/03/22.

_____. Origin and consequences of brain Toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. n. 1742-2094 (Electronic),

_____. Toll-like 4 receptor inhibitor TAK-242 decreases neuroinflammation in rat brain frontal cortex after stress. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 8, 2014/01/11 2014. ISSN 1742-2094. Available at: < <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-8> >.

HAJ-MIRZAIAN, A. et al. Role of hypothalamic-pituitary adrenal-axis, toll-like receptors, and macrophage polarization in pre-atherosclerotic changes induced by social isolation stress in mice. **Sci Rep**, v. 11, n. 1, p. 19091, 09 27 2021. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34580342> >.

HEMMATI, S. et al. The antidepressant effects of GM-CSF are mediated by the reduction of TLR4/NF-κB-induced IDO expression. **Journal of neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 117-117, 2019. ISSN 1742-2094. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31153376> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6545198/> >.

HERKENHAM, M. et al. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. **J Neurosci**, v. 11, n. 2, p. 563-83, Feb 1991. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474.

HERMAN, J. P. Neural pathways of stress integration: relevance to alcohol abuse. **Alcohol Res**, v. 34, n. 4, p. 441-7, 2012. ISSN 2168-3492 (Print)

2168-3492.

HERMAN, J. P. et al. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 2, p. 603-621, 2016. ISSN 2040-4603.

Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27065163> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4867107/> >.

HILL, E. L. et al. Functional CB1 Receptors Are Broadly Expressed in Neocortical GABAergic and Glutamatergic Neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 97, n. 4, p. 2580-2589, 2007/04/01 2007. ISSN 0022-3077. Available at: < <https://doi.org/10.1152/jn.00603.2006> >. Accessed on: 2022/10/09.

HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB(1) receptor agonist HU-210 following chronic stress. **Eur J Pharmacol**, v. 499, n. 3, p. 291-5, Sep 24 2004. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999.

HILL, M. N.; MCEWEN, B. S. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 791-7, Jun 30 2010. ISSN 0278-5846 (Print) 0278-5846.

HILL, M. N. et al. Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 45, p. 14980-14986, 2010. ISSN 1529-2401 0270-6474. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21068301> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3073528/> >.

HODES, G. E.; MÉNARD, C.; RUSSO, S. J. Integrating Interleukin-6 into depression diagnosis and treatment. **Neurobiology of Stress**, v. 4, p. 15-22, 2016/10/01/ 2016. ISSN 2352-2895. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352289515300461> >.

HUA, F. et al. TAK-242, an antagonist for Toll-like receptor 4, protects against acute cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 35, n. 4, p. 536-542, 2015. ISSN 1559-7016 0271-678X. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25586141> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4420883/> >.

ISHIGURO, H. et al. Potential Role of Cannabinoid Type 2 Receptors in Neuropsychiatric and Neurodegenerative Disorders. **Front Psychiatry**, v. 13, p. 828895, 2022. ISSN 1664-0640 (Print) 1664-0640.

IWATA, M. et al. Psychological Stress Activates the Inflammasome via Release of Adenosine Triphosphate and Stimulation of the Purinergic Type 2X7 Receptor. **Biol Psychiatry**, v. 80, n. 1, p. 12-22, Jul 1 2016. ISSN 0006-3223.

KANO, M. et al. Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 1, p. 309-380, 2009/01/01 2009. ISSN 0031-9333. Available at: < <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2008> >. Accessed on: 2022/05/20.

KASATKINA, L. A.; RITTCHEN, S.; STURM, E. M. Neuroprotective and Immunomodulatory Action of the Endocannabinoid System under Neuroinflammation. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 11, May 21 2021. ISSN 1422-0067.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Semin Immunol**, v. 19, n. 1, p. 24-32, Feb 2007. ISSN 1044-5323 (Print)

1044-5323.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00461> >.

_____. Toll-like receptor signaling pathways. **Front Immunol**, v. 5, p. 461, 2014. ISSN 1664-3224 (Print)

1664-3224.

KELLEY, N. et al. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 13, Jul 6 2019. ISSN 1422-0067.

_____. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 13, p. 3328, 2019. ISSN 1422-0067. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31284572> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6651423/> >.

KESSLER, R. C. et al. Short screening scales to monitor population prevalences and trends in non-specific psychological distress. **Psychol Med**, v. 32, n. 6, p. 959-76, Aug 2002. ISSN 0033-2917 (Print)

0033-2917.

KETCHESIN, K. D.; STINNETT, G. S.; SEASHOLTZ, A. F. Corticotropin-releasing hormone-binding protein and stress: from invertebrates to humans. **Stress**, v. 20, n. 5, p. 449-464, Sep 2017. ISSN 1025-3890 (Print)

1025-3890.

KIANK, C. et al. Psychological stress-induced, IDO1-dependent tryptophan catabolism: implications on immunosuppression in mice and humans. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e11825, Jul 28 2010. ISSN 1932-6203.

KIRBY, E. D. et al. Acute stress enhances adult rat hippocampal neurogenesis and activation of newborn neurons via secreted astrocytic FGF2. **Elife**, v. 2, p. e00362, Apr 16 2013. ISSN 2050-084X (Print)

2050-084x.

KOMADA, M.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Elevated plus maze for mice. **J Vis Exp**, n. 22, Dec 22 2008. ISSN 1940-087x.

KOOLE, S. L. The psychology of emotion regulation: An integrative review. **Cognition and Emotion**, v. 23, n. 1, p. 4-41, 2009/01/01 2009. ISSN 0269-9931. Available at: < <https://doi.org/10.1080/02699930802619031> >.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, Oct 16 2008. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836.

LANGER, K.; WOLF, O. T.; JENTSCH, V. L. Delayed effects of acute stress on cognitive emotion regulation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 125, p. 105101, 2021/03/01/ 2021. ISSN 0306-4530. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306453020305242> >.

LASSELIN, J. et al. Comparison of bacterial lipopolysaccharide-induced sickness behavior in rodents and humans: Relevance for symptoms of anxiety and depression. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 115, p. 15-24, Aug 2020. ISSN 0149-7634.

LI, L. et al. Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 91, p. 740-755, 2021/01/01/ 2021. ISSN 0889-1591. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159120318961> >.

LIAN, Y. J. et al. Ds-HMGB1 and fr-HMGB induce depressive behavior through neuroinflammation in contrast to nonoxid-HMGB1. **Brain Behav Immun**, v. 59, p. 322-332, Jan 2017. ISSN 0889-1591.

LIEBSCH, G. et al. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. **Behav Brain Res**, v. 94, n. 2, p. 301-10, Aug 1998. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328.

LISBOA, S. F. et al. Microglial Cells as a Link between Cannabinoids and the Immune Hypothesis of Psychiatric Disorders. **Frontiers in Neurology**, v. 7, 2016. ISSN 1664-2295. Available at: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2016.00005> >.

_____. The Endocannabinoid System and Anxiety. **Vitam Horm**, v. 103, p. 193-279, 2017. ISSN 0083-6729 (Print)

0083-6729.

_____. Repeated social defeat-induced neuroinflammation, anxiety-like behavior and resistance to fear extinction were attenuated by the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 9, p. 1924-1933, Aug 2018. ISSN 0893-133X (Print) 0893-133x.

_____. Tempering aversive/traumatic memories with cannabinoids: a review of evidence from animal and human studies. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 236, n. 1, p. 201-226, Jan 2019. ISSN 0033-3158.

LIU, J.; BUISMAN-PIJLMAN, F.; HUTCHINSON, M. R. Toll-like receptor 4: innate immune regulator of neuroimmune and neuroendocrine interactions in stress and major depressive disorder. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, 2014. ISSN 1662-453X. Available at: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2014.00309> >.

LIU, W.-Z. et al. Identification of a prefrontal cortex-to-amygdala pathway for chronic stress-induced anxiety. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 2221, 2020/05/06 2020. ISSN 2041-1723. Available at: < <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15920-7> >.

LIU, Y.-Z.; WANG, Y.-X.; JIANG, C.-L. Inflammation: The Common Pathway of Stress-Related Diseases. **Frontiers in human neuroscience**, v. 11, p. 316-316, 2017. ISSN 1662-5161. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28676747> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5476783/> >.

LOU, Z.-Y. et al. The inhibition of CB₁ receptor accelerates the onset and development of EAE possibly by regulating microglia/macrophages polarization. **Journal of Neuroimmunology**, v. 317, p. 37-44, 2018. ISSN 0165-5728. Available at: < <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.02.001> >. Accessed on: 2022/07/18.

LUTZ, B. et al. The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. In: (Ed.). **Nat Rev Neurosci**, v.16, 2015. p.705-18. ISBN 1471-0048 (Electronic)

1471-003X (Print)

1471-003X (Linking).

MARTINI, P. et al. Transcriptional Profiling of Rat Prefrontal Cortex after Acute Inescapable Footshock Stress. **Genes (Basel)**, v. 14, n. 3, Mar 17 2023. ISSN 2073-4425.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, D. et al. Chronic Mild Stress Alters Kynurenine Pathways Changing the Glutamate Neurotransmission in Frontal Cortex of Rats. **Mol Neurobiol**, v. 56, n. 1, p. 490-501, Jan 2019. ISSN 0893-7648.

MATSUDA, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561-564, 1990/08/01 1990. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://doi.org/10.1038/346561a0> >.

MATTACE RASO, G. et al. Palmitoylethanolamide in CNS health and disease. **Pharmacol Res**, v. 86, p. 32-41, Aug 2014. ISSN 1043-6618.

MAYDYCH, V. The Interplay Between Stress, Inflammation, and Emotional Attention: Relevance for Depression. **Front Neurosci**, v. 13, p. 384, 2019. ISSN 1662-4548 (Print) 1662-453x.

MCCOY, K. L. Interaction between Cannabinoid System and Toll-Like Receptors Controls Inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2016, p. 5831315, 2016. ISSN 0962-9351 (Print) 0962-9351.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Res**, v. 886, n. 1-2, p. 172-189, Dec 15 2000. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993.

_____. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. **Eur J Pharmacol**, v. 583, n. 2-3, p. 174-85, Apr 7 2008. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999.

MCEWEN, B. S.; NASCA, C.; GRAY, J. D. Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 3-23, 2016. ISSN 1740-634X

0893-133X. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26076834> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4677120/> >.

MCLAUGHLIN, K. A.; SHERIDAN, M. A.; LAMBERT, H. K. Childhood adversity and neural development: deprivation and threat as distinct dimensions of early experience. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 47, p. 578-91, Nov 2014. ISSN 0149-7634 (Print) 0149-7634.

MECHA, M. et al. Microglia activation states and cannabinoid system: Therapeutic implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 166, p. 40-55, 2016/10/01/ 2016. ISSN 0163-7258. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725816301012> >.

MIFSUD, K. R.; REUL, J. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated control of genomic responses to stress in the brain. **Stress**, v. 21, n. 5, p. 389-402, Sep 2018. ISSN 1025-3890.

MOGHADDAM, B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. **J Neurochem**, v. 60, n. 5, p. 1650-7, May 1993. ISSN 0022-3042 (Print)
0022-3042.

MOUIHATE, A.; MEHDAWI, H. Toll-like receptor 4-mediated immune stress in pregnant rats activates STAT3 in the fetal brain: role of interleukin-6. **Pediatr Res**, v. 79, n. 5, p. 781-7, May 2016. ISSN 0031-3998.

MURALIDHARAN, S. et al. Human Binge Alcohol Intake Inhibits TLR4-MyD88 and TLR4-TRIF Responses but Not the TLR3-TRIF Pathway: HspA1A and PP1 Play Selective Regulatory Roles. **J Immunol**, v. 200, n. 7, p. 2291-2303, 04 01 2018. ISSN 1550-6606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29445009> >.

MURALIDHARAN, S.; MANDREKAR, P. Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 94, n. 6, p. 1167-84, Dec 2013. ISSN 0741-5400 (Print)
0741-5400.

MUSAZZI, L. et al. Acute Inescapable Stress Rapidly Increases Synaptic Energy Metabolism in Prefrontal Cortex and Alters Working Memory Performance. **Cereb Cortex**, v. 29, n. 12, p. 4948-4957, Dec 17 2019. ISSN 1047-3211.

MÉNARD, C. et al. Immune and Neuroendocrine Mechanisms of Stress Vulnerability and Resilience. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 62-80, Jan 2017. ISSN 0893-133X (Print)
0893-133x.

NANDAM, L. S. et al. Cortisol and Major Depressive Disorder-Translating Findings From Humans to Animal Models and Back. **Front Psychiatry**, v. 10, p. 974, 2019. ISSN 1664-0640 (Print)
1664-0640.

NIE, X. et al. The Innate Immune Receptors TLR2/4 Mediate Repeated Social Defeat Stress-Induced Social Avoidance through Prefrontal Microglial Activation. **Neuron**, v. 99, n. 3, p. 464-479.e7, 08 08 2018. ISSN 1097-4199. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30033154> >.

OKUN, E. et al. Evidence for a developmental role for TLR4 in learning and memory. 2012. ISSN 1932-6203.

ONAIVI, E. S. et al. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1074, p. 514-36, Aug 2006. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923.

PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, 2000. ISSN 0100-879X.

PAN, Y. et al. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 β -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 41, p. 90-100, 2014/10/01/ 2014. ISSN 0889-1591. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159114001202> >.

PANDEY, G. N. et al. Innate immunity in the postmortem brain of depressed and suicide subjects: Role of Toll-like receptors. **Brain, behavior, and immunity**, v. 75, p. 101-111, 2019. ISSN 1090-2139

0889-1591. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30266463> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6476429/> >.

_____. Toll-like receptors in the depressed and suicide brain. **J Psychiatr Res**, v. 53, p. 62-8, Jun 2014. ISSN 0022-3956 (Print)

0022-3956.

PATEL, S.; HILLARD, C. J. Adaptations in endocannabinoid signaling in response to repeated homotypic stress: a novel mechanism for stress habituation. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 11, p. 2821-9, Jun 2008. ISSN 0953-816X (Print)

0953-816x.

PETROSINO, S.; DI MARZO, V. The pharmacology of palmitoylethanolamide and first data on the therapeutic efficacy of some of its new formulations. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1349-1365, 2017/06/01 2017. ISSN 0007-1188. Available at: < <https://doi.org/10.1111/bph.13580> >. Accessed on: 2022/03/31.

POPOLI, M. et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 1, p. 22-37, Nov 30 2011. ISSN 1471-003X (Print)

1471-003x.

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.

QUAVE, C. B. et al. Immune receptor toll-like receptor 4 contributes to stress-induced affective responses in a sex-specific manner. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 14, p. 100248, 2021/07/01/ 2021. ISSN 2666-3546. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S266635462100051X> >.

RADLEY, J. et al. Chronic stress and brain plasticity: Mechanisms underlying adaptive and maladaptive changes and implications for stress-related CNS disorders. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 58, p. 79-91, Nov 2015. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634.

RADLEY, J. J. et al. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. **Cereb Cortex**, v. 16, n. 3, p. 313-20, Mar 2006. ISSN 1047-3211 (Print)

1047-3211.

RICE, T. W. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis. **Crit Care Med**, v. 38, n. 8, p. 1685-94, Aug 2010. ISSN 0090-3493.

SAVVA, A.; ROGER, T. Targeting Toll-Like Receptors: Promising Therapeutic Strategies for the Management of Sepsis-Associated Pathology and Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00387> >.

SHIRAYAMA, Y. et al. The Toll-like receptor 4 antagonist TAK-242 induces antidepressant-like effects in a rat learned helplessness model of depression through BDNF-TrkB signaling and AMPA receptor activation. **Behavioural Brain Research**, v. 423, p. 113769, 2022/04/09/ 2022. ISSN 0166-4328. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432822000377> >.

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nat Protoc**, v. 7, n. 6, p. 1009-14, May 3 2012. ISSN 1750-2799.

SOUZA-JUNIOR, F. J. C.; CUNHA, L. C.; LISBOA, S. F. Toll-like receptor 4 in the interface between neuroimmune response and behavioral alterations caused by stress. **Exploration of Neuroprotective Therapy**, v. 2, n. 5, p. 182-209, 2022. Available at: < <https://www.explorationpub.com/Journals/ent/Article/100428> >.

STEMPEL, A. V. et al. Cannabinoid Type 2 Receptors Mediate a Cell Type-Specific Plasticity in the Hippocampus. **Neuron**, v. 90, n. 4, p. 795-809, May 18 2016. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273.

SUGIURA, T. et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 215, n. 1, p. 89-97, Oct 4 1995. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

SUN, R. et al. Hippocampal activation of microglia may underlie the shared neurobiology of comorbid posttraumatic stress disorder and chronic pain. **Molecular pain**, v. 12, p. 1744806916679166, 2016. ISSN 1744-8069. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27852966> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5117253/> >.

SUVRATHAN, A.; TOMAR, A.; CHATTARJI, S. Effects of chronic and acute stress on rat behaviour in the forced-swim test. **Stress**, v. 13, n. 6, p. 533-40, Nov 2010. ISSN 1025-3890.

TAKASHIMA, K. et al. Analysis of binding site for the novel small-molecule TLR4 signal transduction inhibitor TAK-242 and its therapeutic effect on mouse sepsis model. **Br J Pharmacol**, v. 157, n. 7, p. 1250-62, Aug 2009. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188.

TAM, J. S. Y. et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists as potential therapeutics for intestinal inflammation. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 40, n. 1, p. 5-21, 2021/02/01 2021. ISSN 0975-0711. Available at: < <https://doi.org/10.1007/s12664-020-01114-y> >.

TANG, L. et al. Acute stress induces an inflammation dominated by innate immunity represented by neutrophils in mice. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1014296> >.

TRAMULLAS, M. et al. Toll-like receptor 4 regulates chronic stress-induced visceral pain in mice. **Biol Psychiatry**, v. 76, n. 4, p. 340-8, Aug 15 2014. ISSN 0006-3223.

TRECCANI, G. et al. Acute stress rapidly increases the readily releasable pool of glutamate vesicles in prefrontal and frontal cortex through non-genomic action of corticosterone. **Mol Psychiatry**, v. 19, n. 4, p. 401, Apr 2014. ISSN 1359-4184.

TROUBAT, R. et al. Neuroinflammation and depression: A review. **Eur J Neurosci**, v. 53, n. 1, p. 151-171, Jan 2021. ISSN 0953-816x.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 397-409, Jun 2009. ISSN 1471-003X (Print)

1471-003x.

VARGAS-LÓPEZ, V. et al. Acute restraint stress and corticosterone transiently disrupts novelty preference in an object recognition task. **Behavioural Brain Research**, v. 291, p. 60-66, 2015/09/15/ 2015. ISSN 0166-4328. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432815003356> >.

VARODAYAN, F. P. et al. Role of TLR4 in the Modulation of Central Amygdala GABA Transmission by CRF Following Restraint Stress. **Alcohol Alcohol**, v. 53, n. 6, p. 642-649, Nov 01 2018. ISSN 1464-3502. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29309503> >.

VILA-VERDE, C. et al. Nitric oxide in the prelimbic medial prefrontal cortex is involved in the anxiogenic-like effect induced by acute restraint stress in rats. **Neuroscience**, v. 320, p. 30-42, Apr 21 2016. ISSN 0306-4522.

VIVEROS, M. P.; MARCO, E. M.; FILE, S. E. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, n. 2, p. 331-42, Jun 2005. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057.

WAKE, H.; FIELDS, R. D. Physiological function of microglia. **Neuron Glia Biol**, v. 7, n. 1, p. 1-3, Feb 2011. ISSN 1740-925X (Print)

1740-925x.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nat Protoc**, v. 2, n. 2, p. 322-8, 2007. ISSN 1754-2189 (Print)

1750-2799.

WALKER, F. R.; NILSSON, M.; JONES, K. Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. **Current drug targets**, v. 14, n. 11, p. 1262-1276, 2013. ISSN 1873-5592

1389-4501. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24020974> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3788324/> >.

_____. Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. **Curr Drug Targets**, v. 14, n. 11, p. 1262-76, Oct 2013. ISSN 1389-4501 (Print)

1389-4501.

WANG, B. et al. HMGB1 mediates depressive behavior induced by chronic stress through activating the kynurenine pathway. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 72, p. 51-60, 2018/08/01/ 2018. ISSN 0889-1591. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159117305184> >.

WANG, F. et al. Stress Induced Neuroplasticity and Mental Disorders 2018. **Neural Plasticity**, v. 2018, p. 5382537, 2018/08/16 2018. ISSN 2090-5904. Available at: < <https://doi.org/10.1155/2018/5382537> >.

WANG, J. et al. Association of the TLR4 gene with depressive symptoms and antidepressant efficacy in major depressive disorder. **Neuroscience Letters**, v. 736, p. 135292, 2020/09/25/2020. ISSN 0304-3940. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394020305620> >.

WANG, Y. et al. TLR4-NF- κ B Signal Involved in Depressive-Like Behaviors and Cytokine Expression of Frontal Cortex and Hippocampus in Stressed C57BL/6 and ob/ob Mice. **Neural Plasticity**, v. 2018, p. 7254016, 2018/03/22 2018. ISSN 2090-5904. Available at: < <https://doi.org/10.1155/2018/7254016> >.

_____. TLR4-NF- κ B Signal Involved in Depressive-Like Behaviors and Cytokine Expression of Frontal Cortex and Hippocampus in Stressed C57BL/6 and ob/ob Mice. **Neural Plast**, v. 2018, p. 7254016, 2018. ISSN 2090-5904 (Print)

1687-5443.

WANG, Y.-L. et al. Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 21, 2018/01/17 2018. ISSN 1742-2094. Available at: < <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1054-3> >.

WANG, Y. L. et al. Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats. **J Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 21, Jan 17 2018. ISSN 1742-2094.

WEBER, M. D. et al. Blocking toll-like receptor 2 and 4 signaling during a stressor prevents stress-induced priming of neuroinflammatory responses to a subsequent immune challenge. **Brain Behav Immun**, v. 32, p. 112-21, Aug 2013. ISSN 0889-1591 (Print)

0889-1591.

WILKINSON, C. S. et al. **Brain Monoamine Dysfunction in Response to Predator Scent Stress Accompanies Stress-Susceptibility in Female Rats.** *Biomolecules*. 13 2023.

WITTEBOLE, X.; CASTANARES-ZAPATERO, D.; LATERRE, P. F. Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis. **Mediators of inflammation**, v. 2010, p. 568396-568396, 2010. ISSN 1466-1861

0962-9351. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20396414> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2855078/> >.

WOLF, S. A.; BODDEKE, H. W.; KETTENMANN, H. Microglia in Physiology and Disease. **Annu Rev Physiol**, v. 79, p. 619-643, Feb 10 2017. ISSN 0066-4278.

WON, E.; KIM, Y. K. Neuroinflammation-Associated Alterations of the Brain as Potential Neural Biomarkers in Anxiety Disorders. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 18, Sep 7 2020. ISSN 1422-0067.

WOO, C. W. et al. Toll-like receptor activation suppresses ER stress factor CHOP and translation inhibition through activation of eIF2B. **Nat Cell Biol**, v. 14, n. 2, p. 192-200, Jan 8 2012. ISSN 1465-7392 (Print)

1465-7392.

WOO, E. et al. Chronic Stress Weakens Connectivity in the Prefrontal Cortex: Architectural and Molecular Changes. **Chronic Stress**, v. 5, p. 24705470211029254, 2021/01/01 2021. ISSN 2470-5470. Available at: < <https://doi.org/10.1177/24705470211029254> >. Accessed on: 2022/03/22.

XIANG, W. et al. Monoacylglycerol lipase regulates cannabinoid receptor 2-dependent macrophage activation and cancer progression. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2574, 2018/07/03 2018. ISSN 2041-1723. Available at: < <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04999-8> >.

XU, X. et al. Antidepressive Effect of Arctiin by Attenuating Neuroinflammation via HMGB1/TLR4- and TNF- α /TNFR1-Mediated NF- κ B Activation. **ACS Chem Neurosci**, v. 11, n. 15, p. 2214-2230, 08 05 2020. ISSN 1948-7193. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32609480> >.

YAMANISHI, K. et al. Acute stress induces severe neural inflammation and overactivation of glucocorticoid signaling in interleukin-18-deficient mice. **Translational Psychiatry**, v. 12, n. 1, p. 404, 2022/09/23 2022. ISSN 2158-3188. Available at: < <https://doi.org/10.1038/s41398-022-02175-7> >.

YANG, J. et al. Fast Green FCF Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior and Downregulates TLR4/Myd88/NF- κ B Signal Pathway in the Mouse Hippocampus. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019. ISSN 1663-9812. Available at: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2019.00501> >.

YUEN, E. Y. et al. Acute stress enhances glutamatergic transmission in prefrontal cortex and facilitates working memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 33, p. 14075-14079, 2009/08/18 2009. Available at: < <https://doi.org/10.1073/pnas.0906791106> >. Accessed on: 2023/07/17.

ZAFFARONI, L.; PERI, F. Recent advances on Toll-like receptor 4 modulation: new therapeutic perspectives. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 461-476, 2018/02/01

2018. ISSN 1756-8919. Available at: < <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0172> >. Accessed on: 2022/03/19.

ZHANG, H. et al. HMGB1 involved in stress-induced depression and its neuroinflammatory priming role: a systematic review. **General Psychiatry**, v. 32, n. 4, p. e100084, 2019. Available at: < <http://gpsych.bmj.com/content/32/4/e100084.abstract> >.

ZHANG, H. Y. et al. Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 46, p. E5007-15, Nov 18 2014. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424.

ZHANG, K. et al. Effect of Toll-like receptor 4 on depressive-like behaviors induced by chronic social defeat stress. **Brain Behav**, v. 10, n. 3, p. e01525, 03 2020. ISSN 2162-3279. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31945269> >.

ZHANG, Y. et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors: Current research and prospective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 235, p. 114291, 2022/05/05/ 2022. ISSN 0223-5234. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523422001933> >.

ZOPPI, S. et al. Regulatory role of the cannabinoid CB2 receptor in stress-induced neuroinflammation in mice. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 11, p. 2814-26, Jun 2014. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188.

_____. Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 4, p. 805-818, 2011. ISSN 1740-634X

0893-133X. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21150911> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3055736/> >.

ZOU, S.; KUMAR, U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 3, p. 833, 2018. ISSN 1422-0067. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29533978> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5877694/> >.

ANEXOS

Anexo I



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A U T O R I Z A Ç Ã O

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação das consequências comportamentais da administração de um inibidor da via do TLR4 no córtex pré-frontal medial após exposição ao estresse e possível envolvimento do sistema endocanabinoide.", registrada sob nº 21.1.539.60.3, sob a responsabilidade de Fábio José Coelho de Souza Junior e Sabrina Francesca de Souza Lisbôa, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto ° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada *ad referendum* em 01º/02/2022 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Colaboradores: Arthur Alves Coelho, Laura Colete Cunha.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica	
Vigência da Autorização	04/02/2022 a 03/02/2024	
Espécie/Linhagem/Raça	Rato heterogêneo Wistar Hannover	
Nº de animais	306	306
Peso/Idade	230-250g/ 7-8 semanas	230-250g/ 7-8 semanas
Sexo	Macho	Fêmea
Origem	Biotério Central do Campus USP RP	

Ribeirão Preto, 01º de fevereiro de 2022.

Danielle Palma de Oliveira
Coordenadora da CEUA-FCFRP



Toll-like receptor 4 in the interface between neuroimmune response and behavioral alterations caused by stress

Fábio José Coelho Souza-Junior^{1,2†} , Laura Colete Cunha^{1,2†} , Sabrina Francesca Lisboa^{1,2*} 

¹Graduate Program in Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, São Paulo, Brazil

²Department of Biomolecular Science, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, São Paulo, Brazil

[†]These authors contributed equally to the work.

***Correspondence:** Sabrina Francesca Lisboa, Department of Biomolecular Science, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, São Paulo, Brazil. sabrinalisboa@usp.br

Academic Editor: Raymond Chuen-Chung Chang, The University of Hong Kong, China

Received: April 6, 2022 **Accepted:** August 22, 2022 **Published:** October 31, 2022

Cite this article: Souza-Junior FJC, Cunha LC, Lisboa SF. Toll-like receptor 4 in the interface between neuroimmune response and behavioral alterations caused by stress. *Explor Neuroprot Ther.* 2022;2:182–209. <https://doi.org/10.37349/ent.2022.00028>

Abstract

Different stressors can elicit neuroinflammatory responses modulated by innate immunity receptors, such as the family of Toll-like receptors (TLRs). The TLR4, a pattern recognition receptor (PRR), is involved in many diseases, such as inflammatory and central nervous system (CNS) diseases. Stress exposure can regulate the expression of PRRs, including TLR4, in the brain of animals, especially in the hippocampus and prefrontal cortex. Moreover, TLR4 modulates behavior and neuroinflammatory responses in the brain. In addition, to TLR4, the endocannabinoid (eCB) system plays a role in stress response and immunity, acting as a regulatory, stress-buffer system. This system is involved in many TLRs-mediated immune responses, such as microglia activation. Therefore, pharmacological approaches targeting the eCB system could modulate neuroinflammatory responses to stress by interfering with the TLR4 pathway. Although the connection between TLR4, stress, and neuroinflammation is well documented, almost no pre-clinical studies investigate the possible direct relationship between TLR4, behavior, stress, and the eCB system. Studies exploring the relationship between stress, neuroinflammation, TLR4, and the eCB system were searched using Pubmed, Web of Science, and Embase databases. Based on this search, this review is focused on the involvement of TLR4 receptors and signaling in neuroinflammation and the behavioral consequences of stress exposure. Moreover, evidence of the eCB system modulating TLR4-mediated responses was brought to the attention, pointing out a possible regulatory role of these responses by eCBs in behavior changes related to mood disorders.

Keywords

Stress, Toll-like receptor 4, microglia, behavior, endocannabinoid system

© The Author(s) 2022. This is an Open Access article licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, for any purpose, even commercially, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.



Introduction

Stress is a physiological response of the organism to any external or internal challenge, called stressor. The physiological alterations induced by stress exposure include behavioral and cognitive changes, and the inability to overcome stress is related to the development of pathologies, including those associated with the central nervous system (CNS) [1, 2]. Acute or chronic exposure to several psychosocial stressors in lab animals, for example, can promote morphological and neuroplastic alterations in the brain, especially in limbic areas [3, 4].

Different neuronal networks are engaged by different types of stressors, although they overlap at some points. Physical stressors, such as infections and hemorrhage, induce the activation of brain regions such as the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), the nucleus of the solitary tract (NTS), and locus coeruleus (LC) [5]. Psychological stressors, such as exposure to aversive stimuli and predator-related cues, engage components of the limbic system, including the prefrontal cortex (PFC), amygdala, hippocampus, ventral tegmental area (VTA), and nucleus accumbens (NAc). Limbic-PVN connections are relayed specially by gamma-aminobutyric acidergic (GABAergic) neurons. Chronic stress affects this circuitry resulting in enhanced PVN excitability, and considering corticotropin-releasing hormone (CRH) neurons are expressed in the PVN, this could result in hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis activation [5, 6].

Several neurotransmitter systems, including the noradrenergic, glutamatergic, serotonergic, nitroergic, and cannabinoid systems, are involved in neuroplasticity processes after stress. Moreover, alterations in the cytoarchitecture of the amygdala, hippocampus, and PFC [7–11] are also involved. Among these brain regions, the medial PFC is extremely sensitive to stress and suffers significant changes in its morphology and function after chronic stress [7–11].

Besides the neural alterations, stress activates microglial cells, the resident macrophages of CNS, a phenomenon proposed to contribute to and shape the responses of the organism to threats [12]. Microglia cells are vulnerable to both infectious and sterile stimuli, such as psychological stress, so their actions range from maintaining homeostasis to induced neuroinflammation, depending on the type, intensity, and duration of the stimulus [13, 14]. The collection of microglial receptors allows these cells to detect and respond to signals of stress deflagrated by the neuroendocrine, immunologic and nervous systems [12, 15].

Therefore, microglial cells act as sensors of the environment and are highly responsive to local disturbances, which could lead to different reactive states [16]. Microglial activation has a complex classification but is generally designated as microglial M1, or proinflammatory, and microglial M2, or anti-inflammatory [13, 16–18]. Several studies demonstrated that exposure to acute or chronic stress induces behavioral changes and also induces the expansion of microglial processes in many cerebral areas, including the hippocampus and PFC [13, 19, 20]. Moreover, stress exposure also induces other alterations in molecules associated with the immune response in the brain, particularly in the PFC, such as increased expression of the enzymes inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), the transcription factor nuclear factor kappa B (NFκB), and Toll-like receptors (TLRs) such as the TLR4 [2, 21, 22].

The TLR4 is a pattern recognition receptor (PRR) expressed in the membrane, mostly by innate immune cells, such as in microglia in the brain [23]. As a PRR, TLR4 can detect pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), such as lipopolysaccharide (LPS), and damage-associated molecular patterns (DAMPs), such as heat shock proteins (HSPs) and high mobility group box 1 (HMGB1) [24].

Activation of TLR4 depends on the myeloid differentiation factor 2 (MD-2) co-receptor and the recruitment of adaptor proteins, such as myeloid differentiation factor 88 (MyD88). This process triggers an intracellular signaling cascade that culminates in phosphorylation and consequent degradation of inhibitor of NFκB (IκB) kinase via the proteasome; IκB kinase is an inhibitor of the NFκB transcription factor in the cytoplasm. The activated NFκB then translocates to the nucleus, where it binds to gene promoter regions, initiating the transcription of several pro-inflammatory genes which originate proteins such as COX-2, iNOS, interleukin 1β (IL-1β), IL-6, and tumor necrosis factor α (TNF-α) [25]. Pharmacological inhibition of the TLR4 pathway by systemic administration of TAK-242

(resatorvid) reduce neuroinflammation in the PFC of rats exposed to acute restraint stress [26]. However, whether TLR4 receptors in the PFC directly participate in the behavioral consequences of stress remains to be investigated. Studies evaluating TLR4 in stress response will be discussed further.

The endocannabinoid (eCB) system is another important system activated by stress response and that modulates this response is the eCB system [27, 28]. Stress increases glutamate release, which through *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors increases neuronal activity. Activation of NMDA and metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) receptors by glutamate results in intracellular calcium influx in the postsynaptic terminal, culminating in activation of eCB synthesis enzymes, leading to their production and release by the postsynaptic terminal in the synaptic cleft [29]. Cannabinoid type 1 (CB1) and CB2 receptors (CB2Rs), the eCBs anandamide (AEA, also known as *N*-arachidonylethanolamine), and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) are the most studied components of the eCB system [30–34].

The eCB system can also modulate the neuroimmune response, including in stressful conditions. For example, repeated stress-induced neuroinflammation in the PFC of mice was attenuated by CB1 and CB2 agonists [35, 36]. Furthermore, a non-selective CB1/CB2 agonist administered for six days during social defeat stress decreased neuroinflammation and the anxiogenic response, and prevented the later sensitized conditioned fear response [37].

In addition, several works, including from our research group, demonstrate that eCB signaling in the medial PFC has an important role in responses related to stress and anxiety, including controlling the HPA axis [29]. The presence of CB1Rs in corticolimbic circuits that regulate the HPA axis, the anti-stress properties of cannabis use, and several other pieces of evidence, including from animal models, support the eCB signaling involvement in the inhibition of stress response [37, 38]. Moreover, the presence of the eCB system, mainly CB2Rs, in immune cells, especially in microglia cells, and the involvement of this system in neuroimmune modulation [39, 40] strengthen the idea that eCB effects in modulating behavioral responses could involve the modulation of neuroimmune mechanisms.

Neuroinflammation has been discussed to play a central role in the neurobiology of neuropsychiatric disorders [41]. Several targets are involved in neuroinflammatory responses, including some induced by stress exposure, such as TLR4 and eCB signaling. However, fewer studies have evaluated the interaction between these systems in regulating neuroinflammation and behavior changes after stress [42, 43]. Therefore, it was hypothesized that the TLR4 signaling involvement in stress response, including behavioral changes related to psychiatric disorders, could be modulated by the eCB system. Before summarizing the findings of the TLR4 receptors in stress response and evidence of relationship with the eCB system, it is noteworthy to give a brief overview of how stress exposure can impact the immune system and neuroinflammation. Also, it is important to briefly address the TLR4 pathway to understand how the impact of stress on this signaling could result in behavioral changes. The studies mentioned in this review were obtained in PubMed, Embase, or Web of Science. Only full-text articles in English were considered.

An overview of neuroimmune effects of stress exposure

The sympathetic nervous system and the HPA axis, activated during a stress response, are the main drivers of the physiological systems, including the immune system [44]. In turn, the immune system is affected by acute and chronic stressors, resulting in various cellular changes and humoral responses both in the periphery and CNS [45]. The understanding of these mechanisms is essential to comprehend the consequences of stress [46].

The immune system in the brain, for example, develops several responses to stressful situations in the brain, including morphological and functional changes [47]. There is bidirectional communication between the brain and the immune system, which involves efferent and afferent pathways through which the brain and the periphery exchange information about the body's homeostatic state. This process is an essential element of the response to environmental, physiological, and psychological factors that affect homeostasis [45].

Exposure to acute or chronic stress can have several immune consequences, such as increased cortisol levels, increased circulating pro-inflammatory cytokines/chemokines (IL-6 and TNF- α), and other molecules such as DAMPs and prostaglandins [24]. Some of these mediators can be found in the brain, where they could mediate neuroinflammation and be involved in several behavioral changes [45, 48]. The neurochemical alterations in the brain arising from inflammation include activation of the kynurenine pathway, which affects tryptophan metabolism and serotonin levels, reduction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) production, among others [49, 50]. These changes are mostly associated with mood disorders such as anxiety and depression [51], but not all patients with mood disorders will present signs of immune activation [52]. Therefore, stressful experiences can induce activation of many aspects of peripheral immunity and central neuroimmune processes, contributing to various forms of host defense, stress recovery, and, ultimately, disease susceptibility [37, 45]. There are, therefore, a variety of neuroimmune signaling pathways that can be activated in response to stressful experiences. In animal studies, these effects often depend on specific individual characteristics of the subjects [46]. It is beyond the scope of the present review to address all these pathways; there are excellent reviews about this topic (for example, [53]).

In addition to the observed changes in the expression of cytokines and other inflammatory signaling molecules, exposure to stress is often accompanied by cellular changes manifestations of neuroimmune activation, such as dynamic changes in the state of microglial activation. These cells are the primary brain source of immune mediators [54]. Several human studies suggest that microglial changes could be related to mood disorders [55–59]. Moreover, inhibition of microglia with minocycline, a tetracycline antibiotic that inhibits microglial activation at low doses [60], was beneficial to depressive patients [60–62] and demonstrated to improve antidepressant response in treatment-resistant patients [62]. However, the exact role of microglia cells in mood disorders remains uncertain. More recent data, almost exclusively from lab animal studies, suggest that PRRs in microglia, namely the nucleotide oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) and the TLR4, are involved in the behavioral consequences of stress exposure [63–70]. This review will focus on evidence pointing out the involvement of TLR4, therefore is essential to give a brief overview of this pathway.

TLR4 pathway

As described in the [Introduction](#), the activation of TLR4 by PAMPs, such as LPS, or DAMPs, such as HMGB1, HSPs, and fibrinogen, can activate two pathways, MyD88-dependent pathway and MyD88-independent pathway [71].

The MyD88-dependent pathway leads to the recruitment and activation of IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) and TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) proteins, which activates transforming growth factor β -activated kinase 1 [TAK1, also known as mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase kinase 7 (MKK7)]. This molecule leads to the activation of MAPK pathways, promoting the nuclear translocation of activator protein 1 (AP-1) [71]. TAK1 can also activate I κ B-kinase (IKK) complex [formed by NF κ B essential modulator (NEMO), IKK α , and IKK β], which phosphorylates the inhibitor protein of NF κ B complex (subunits p65 and p50) and the I κ B α . Phosphorylated I κ B α (p-I κ B α) is degraded by the proteasome and releases NF κ B to translocate to the nucleus, where it will promote the transcription of several proinflammatory genes, including those necessary for the NLRP3 inflammasome [71, 72] (see [Figure 1](#)).

The activation of the MyD88-independent pathway promotes the endocytosis of TLR4 dimer, which through Toll/IL-1 receptor-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) and TRAF3 proteins leads to the activation of the transcription factor interferon regulatory factor 3 (IRF3), which favors the expression of type I interferons [e.g., interferon α (IFN α) and IFN β] [71, 72].

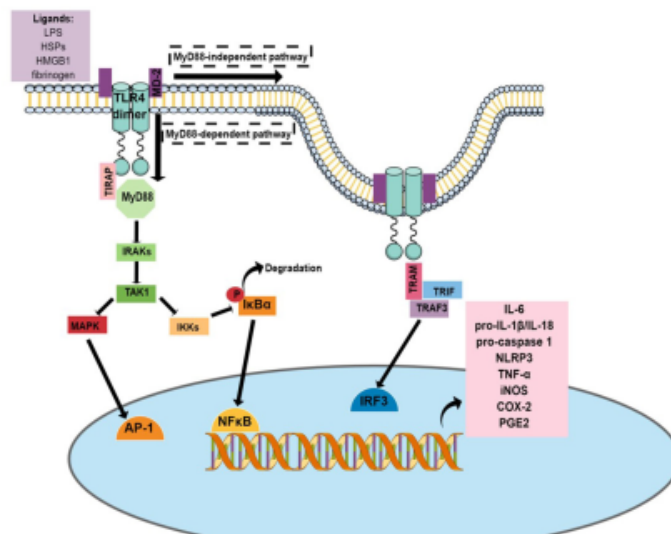


Figure 1. TLR4 pathway. The activation of the TLR4 pathway results in the translocation of transcription factors related to inflammation to the nucleus, such as AP-1, NFκB, and IRF3. These transcription factors bind to specific regulatory regions in the DNA, leading to the transcription of several inflammatory genes, resulting in the synthesis of messenger RNA (mRNA) of proinflammatory mediators, including IL-6, pro-IL-1β, pro-caspase-1, NLRP3, and iNOS. P: phosphorylation site; TIRAP: Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein; TRAM: TRIF-related adaptor molecule; PGE2: prostaglandin E2

Experimental approaches to study TLR4-related mechanisms in stress response

Genetic, chemical, and pharmacological approaches are used to study the influence involvement of TLR4 in stress response and behavior. Some of these strategies will be briefly discussed below.

LPS from Gram-negative bacteria, a TLR4 activator, is extensively used to evaluate sickness behavior, cognitive deficits, and depressive-like behaviors in animals [73–76]. Overall, LPS-induced behavioral changes and neuroinflammation are attenuated by antidepressants from different classes [selective noradrenaline reuptake inhibitors, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs), and tricyclic antidepressants] [75, 77–79]. Therefore, this model is helpful for investigating mechanisms involved in the consequences of LPS exposure, as demonstrated for the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enzyme [80–82] and the NLRP3 inflammasome [83]. Moreover, the LPS model is used to evaluate the potential effect of drugs in attenuating depressive-like behavior in the context of immune system activation. Ketamine [84–86], agonists of CB2Rs [86], and the phytocannabinoid cannabidiol [87], for example, attenuated the behavioral consequences of LPS administration in lab rodents. Therefore, these data are relevant to the study of depression associated with immune changes because in this case, the condition can be resistant to conventional treatments [88–90].

Some drugs were designed as inhibitors of the TLR4 pathway, including E-5531, eritoran, and TAK-242, mainly for the treatment of sepsis [91–93]. However, they fail to present therapeutic effects in this condition [42, 94]. These compounds aim to block the activation of the TLR4 pathway by DAMPs and PAMPs, blocking the induction of chronic and sterile inflammation, which can be involved in neuropsychiatric diseases [70, 95]; therefore, they are essential experimental tools.

TAK-242 is a cell-permeable compound that selectively binds to the cysteine residue of TLR4, disrupting its interaction with the adaptor molecules TIRAP and TRAM. TAK-242 attenuated neuroinflammation and behavioral changes induced by LPS challenge [96] and acute restraint stress [26]. Recently, Shirayama, et al. [70] showed an antidepressant effect of TAK-242 in a learned helplessness

model after intracerebroventricular administration. Interestingly, this effect was attenuated by local administration of a glutamate AMPA receptors antagonist (NBQX) or an inhibitor of BDNF-tropomyosin-related kinase receptor B (TrkB) signaling (ANA-12), highlighting the involvement of these receptors in the effects of TAK-242.

Eritoran, a synthetic analog of the lipid A portion of LPS, competes with LPS for binding to the MD-2 portion of the TLR4 receptor complex [97]. This drug attenuated depressive-like behaviors and neurochemical changes induced by chronic restraint stress (CRS) in a dose-dependent manner [98].

Genetic models are also widely used, such as the TLR4 knockout (KO) and C3H/HeJ mice; in the latter, TLR4 has a defective response to LPS [2]. Moreover, it is also possible to use interfering peptides that disrupt the beginning of the TLR4 pathway [99]. Several studies show that TLR4 KO is resistant to the behavioral effect of stress and has lower levels of neuroinflammation [100, 101]. However, contradictory data show no effect [102] or even an opposite effect, an anxiogenic behavior [103]. These data will be discussed in the next session.

New genetic models have emerged since microglia has gained importance in many neurological and psychiatric disorders [104, 105]. Conditional KO mice, such as C-X3-C motif chemokine receptor 1 (*CX3CR1*, *CX3CR1^{+/CreER}*), when crossed with mice with a floxed gene, can promote the deletion of specific gene targets in *CX3CR1*-positive cells, including microglia (*CX3CR1⁺* cells). After some weeks following the treatment with the estrogen receptor agonist tamoxifen, the deletion is obtained. These animals were not yet used to study the brain microglia's TLR4 in behavior but are helpful to study neurodegenerative diseases [106, 107]. Below we will discuss studies using these different approaches to study TLR4 in a stress context.

Involvement of the TLR4 pathway in stress-induced neuroinflammation and behavioral consequences

Several pieces of evidence show that exposure to stressors in lab animals alters TLR4 pathway molecules expression in brain areas related to neuropsychiatric disorders, supporting an essential role for TLR4 in mood disorders. Most importantly, pharmacological or genetic manipulation of the TLR4 pathway modifies animals' behavior and neuroinflammation after stress exposure. These studies are summarized in Table 1 and will be discussed below. Most of these studies use heterotypic stressors, such as exposure to chronic unpredictable mild stress (CUMS) (see Table 1, Figure 2).

Table 1. Involvement of the TLR4 pathway and related mediators in stress response, neuroinflammation, and behavioral effects in animal models

Animal (strain, sex, size/ age)	Stress model	Behavioral assessment	Major findings	Modulation of TLR4 pathway	Reference
C3H/HeN mice, male adult	Immobilization stress (1 eCB/7 days)	None	Stress induces ↑COX-2, ↑iNOS, and ↑lipid peroxidation in HeN but not in HeJ animals	C3H/HeJ mice	Caso et al., 2008 [126]
C57BL/6N mice, male 6–12 weeks old	Single or repeated social defeat stress (4 or 10 days)	Social interaction test, EPM	Repeated stress induces microglia activation, ↑IL-1α, ↑TNF-α, and social avoidance, all absent in TLR2/4 double KO mice	TLR2/4 KO mice	Nie et al., 2018 [129]
C57Bl/6 mice, male 8–12 weeks old	Footshock stress (one or two sessions of 180 inescapable footshocks, 0.3 mA duration of 6 s)	Learned helplessness; number of failures to escape footshocks	Stress in WT animals but not TLR4 KO promotes ↑HMGB1, ↑TNF-α, ↑IL-6, ↑IL-1β, ↑TLR4, and ↑NLRP3 in PFC TLR4 KO animals display resistance to learned helplessness depression-like behavior	TLR4 KO mice	Cheng et al., 2016 [100]

Table 1. Involvement of the TLR4 pathway and related mediators in stress response, neuroinflammation, and behavioral effects in animal models (*continued*)

Animal (strain, sex, size/ age)	Stress model	Behavioral assessment	Major findings	Modulation of TLR4 pathway	Reference
ICR mice, male Weighing 18–22 g	CUMS (8 weeks) LPS (5 days, 0.83 mg/kg, i.p./day)	SPT, OFT, TST, FST	Stress: ↑TNF- α , ↑IL-6, ↑IL-1 β , and ↑TLR4 in hippocampus and depressive-like behavior Stress effects were reversed by TAK-242 and baicalin	TAK-242 (3 mg/kg, i.p.) and baicalin (60 or 30 mg/kg, i.g.)	Guo et al., 2019 [96]
C57Bl/6 mice, male 8–10 weeks old	CUMS (6 weeks)	FST, TST, OFT, SPT	Stress ↑HMGB1, ↑Iba-1, ↑TNF- α , ↑TNFR1, ↑GM-CSF, ↑IL-1 β , ↑IL-5, ↑IL-6, ↑IL-7, ↑IL-9, ↑IL-13, ↑IFN γ , ↑NO, ↑IDO, ↓dopamine, ↓5-HT, ↑TLR4, ↑MyD88, ↑p-IkBa, and ↑p-NFkB p65 in PFC. Stress induced depressive-like behavior in WT but not TLR4 KO mice Stress effects were reversed by drug treatment	TLR4 KO mice and arctigenin (25, 50, or 100 mg/kg, i.p.)	Xu et al., 2020 [101]
C57Bl/6J mice, male 8 weeks old	LPS (1 mg/kg, i.p.)	TST, SPT, FST	LPS ↑IL-1 β , ↑Iba-1, ↑RANTES, and ↑MCP-1 in PFC	None	He et al., 2020 [74]
ICR mice, male weighing 18–22 g	CUMS (6 weeks)	SPT, TST, OFT, FST	Stress ↓5-HT, ↓NE, ↑TNF- α , ↑IL-6, ↑IL-1 β , ↑TLR4, ↑p-NFkB, ↑p-p38, ↑NLRP3, and ↑caspase-1 in PFC and hippocampus Stress ↓SOD, ↓GPx, and ↓MDA in the serum Stress promotes depressive-like behavior prevented by Cii-095	TAK-242 (referred as Cii-095 in this paper) (3 mg/kg, i.g.)	Fu et al., 2019 [110]
BALB/c mice, male 8 weeks old	CUMS (4 weeks); i.c.v. administration of fr-HMGB1 or non-oxid HMGB	SPT, TST, OFT	Stress ↑HMGB1 (serum and cortex) and depressive like behavior fr-HMGB1, but not non-oxid HMGB1, induced depressive-like behavior, ↑TNF- α , and ↓MBP in hippocampus, which was reversed by TAK-242	TAK-242 (3 mg/kg, i.p.)	Lian et al., 2017 [117]
C57Bl/6 mice and ob/ob mice, male 7–8 weeks old	CUMS (3 weeks)	SPT, OFT, Morris water maze	Stress induced depressive-like behavior and alterations in target quadrant in Morris water maze Stress ↑TNF- α , ↑IL-6, and ↑IL-1 β in hippocampus and frontal cortex TAK-242 reversed the depressive-like behavior in c57 and ob/ob mice Also, reversed stress effects in TNF- α , IL-6, and IL-1 β levels in the brain	TAK-242 (3 mg/kg, i.p.)	Wang et al., 2018 [43]
ICR mice, male 6–8 weeks old	LPS (0.83 mg/kg, i.p.)	OFT, TST, FST, SPT	LPS induced ↑TNF- α , ↑IL-6, ↑IL-1 β , ↑CD89, ↑TLR4, ↑p-IkBa, ↑NFkB p65, and ↑HMGB1 in hippocampus LPS also induced depressive-like behavior reversed by the drug used	Saikosaponin-d (1 mg/kg, i.g.)	Su et al., 2020 [112]

Table 1. Involvement of the TLR4 pathway and related mediators in stress response, neuroinflammation, and behavioral effects in animal models (continued)

Animal (strain, sex, size/ age)	Stress model	Behavioral assessment	Major findings	Modulation of TLR4 pathway	Reference
ICR mice, male 8–10 weeks old	LPS (1 mg/kg, i.p.)	FST, SPT, NSFT	LPS induced ↑Iba-1, ↑GFAP, ↑TNF-α, ↑IL-6, ↑IL-1β, ↑TLR4, ↑p-NFκB, ↑MyD88, ↓BDNF in hippocampus, and depressive-like behavior These effects are reversed by the pre-treatment with fast green FCF	Molecular docking simulation indicates possible interaction between TLR4 and fast green FCF (100 mg/kg, i.p.)	Yang et al., 2019 [73]
NMRI mice, male Adult Weighing 20–25 g	LPS (0,83 mg/kg, i.p.)	OFT, FST	LPS induced ↑expression of TLR4, p-NFκB, and IDO in mice hippocampus and depressive-like behavior GM-CSF inhibited the LPS effects	Modulation of TLR4 pathway with GM-CSF (30 µg/kg, i.p.)	Hemmati et al., 2019 [111]
Wistar rats, male Weighing 150–180 g	CRS (6 eCB/day, 28 days)	SPT, OFT, FST, social interaction test	CRS induced ↑TNF-α, ↑IL-6, ↑IL-1β, and ↓BDNF in rat hippocampus and PFC. CRS also induced alterations in neurotransmitters. ↓GABA, ↑glutamate, and ↓GAD in hippocampus and PFC CRS also promoted depressive-like behavior and ↓social interaction All effects were reversed in a dose-dependent manner by eritoran	TLR4 antagonist, eritoran (5 mg/kg, i.p.)	Aboul-Fotouh et al., 2018 [98]
Wistar rats, male adult Weighing 250–300g	LPS (20 µg or 80 µg, i.c.v.)	OFT, EPM, FST, Morris water maze	LPS induced ↑TNF-α, ↑IL-1β LPS induced depressive- and anxiety-like behaviors and cognitive impairments in Morris water maze	None	Na et al., 2021 [131]
Wistar Hannover rats, male Weighing 200–225g	CMS (21 days)	FST, SPT, splash test, EPM	CMS induces bacterial translocation, ↑plasma LPS and depressive-like behavior	None	Martin-Hernández et al., 2016 [130]
Offspring of C57BL/6 mice, male and female	MIA (single dose of LPS on embryonic day 12, 50 µg/kg, i.p.)	None	Pro-inflammatory profile of cytokines and ↑TLR4 in amygdala of MIA offspring	None	O'Loughlin et al., 2017 [114]

↑: increase; ↓: decrease; EPM: elevated plus-maze; WT: wild-type; SPT: sucrose preference test; OFT: open field test; TST: tail suspension test; FST: forced swim test; Iba-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; TNFR1: tumor necrosis factor receptor 1; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; NO: nitric oxide; 5-HT: 5-hydroxytryptamine; p-NFκB: phosphorylated NFκB; RANTES: regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; NE: norepinephrine; p-p38: phosphorylated p38; SOD: superoxide dismutase; GPx: glutathione peroxidase; MDA: malondialdehyde; MBP: myelin basic protein; NSFT: novelty suppressed feeding test; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; GABA: γ-aminobutyric acid; GAD: glutamate decarboxylase; CMS: chronic mild stress; MIA: maternal immune activation

However, fewer articles evaluate the effect of homotypic stress, such as footshock or restraint stress exposure. Several reports show differences in immune system activation after exposure to homotypic or heterotypic stressors, including microglial activation. This effect is related to habituation of the HPA activation in the first but not in the second condition [4, 108, 109].

As already briefly discussed, stress exposure can increase pro-inflammatory cytokines and enzymes in the brain, especially in the hippocampus and PFC, and decrease neurotrophic factors and monoamines in the same brain regions [13, 19, 100, 101, 110, 111]. Also, there is an alteration in microglial markers, suggesting the involvement of these cells in stress response [74, 101, 112] (see Table 1).

Acute or repeated homotypic stressors increase the expression of TLR4 pathway components in the brain, including TLR4, MyD88, and NFκB [2, 73, 102, 113–116]. One of the molecules responsible for

triggering the TLR4 response is HMGB1 [100, 101, 112, 117]. Several studies showed that severe stress increases HMGB1 levels in the brain and induces neuroinflammation [116, 118, 119]. Considering that HMGB1 binds to TLR4 and CD14, resulting in the release of several cytokines [120], and considering that behavioral changes after stress involve HMGB1 release [121, 122], this DAMP could be responsible for the behavioral consequences of TLR4 activation after stress exposure.

Moreover, several studies show that stress increases the expression of components of the microglial NLRP3 inflammasome in the brain [63, 64, 118]. This inflammasome is primed by activation of TLR4 (Figures 1 and 2). When primed, other stimuli can activate it, such as activating purinergic P2X7 receptors by ATP. NLRP3 inflammasome activation results in caspase-1 activation and conversion of pro-IL-1 β /pro-IL-18 in IL-1 β /IL-18 [73, 100, 101, 112] (see Table 1). Therefore, activation of this pathway could be one of the readouts of TLR4 activation.

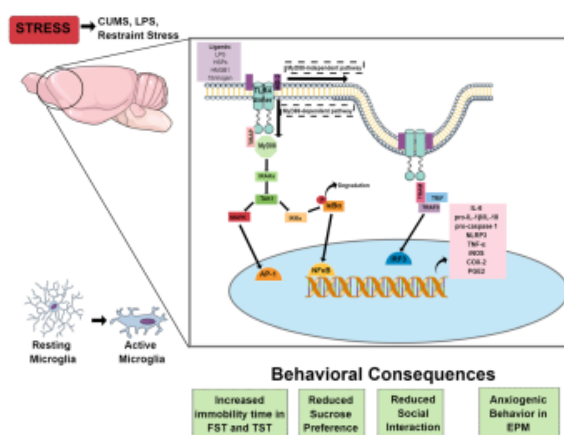


Figure 2. Behavioral and neuroimmune consequences of stress. In rodents, psychological and immunological stressors cause microglial activation, especially in limbic areas, such as the hippocampus and PFC. Microglia can be activated through the activation of the TLR4 pathway by PAMPs, like LPS, or DAMPs, like HSPs, HMGB1, and fibrinogen, leading to an increase in proinflammatory cytokines, such as IL-1 β and TNF- α , enzymes that mediate immune/inflammatory responses, such as iNOS, COX-2, and PGE2, and transcription of components of the NLRP3 inflammasome pathway (pro-IL-1 β , pro-IL-18, pro-caspase-1, and NLRP3). Stressors' exposure also induces depressive-like and anxiety-like behaviors, which could be related to the downstream activation of TLR4. Therefore, pharmacological or genetic inhibition of this pathway, by administering drugs that antagonize TLR4 or prevent its activation, such as TAK-242, or using TLR4 KO or transgenic mice, could prevent the development of behavioral consequences of stress exposure

The benefits of modulating the TLR4 pathway are described in several conditions such as Parkinson's and Alzheimer's diseases [123, 124] and traumatic brain injury [125]. Moreover, stress-induced inflammatory changes can be modulated by interfering with the TLR4 pathway. These data are summarized in Table 1 and discussed below.

TLR4 KO mice are resistant to depressive-like behavior in the learned helplessness paradigm and also have a blunted cytokine response to stress, with lower hippocampal levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β than wild-type mice [100]. These mice also present a protective phenotype after exposure to repeated homotypic restraint stress [126] or CUMS [101].

However, the data of TLR4 KO mice in models predictive of anxiolytic drugs are controversial, with reports of no effect [102, 127, 128] or anxiogenic effect [103, 116]. For example, the anxiogenic effect in TLR4 KO mice has been previously reported in different animal models, both in males and females [103]. However, one study [102] did not report this anxiogenic effect. These mice also showed deficits in the contextual conditioned fear paradigm, among other cognitive changes [102].

A recent work evaluated social interaction, but not anxiety behavior, in TLR4 KO and double TLR2/TLR4 KO mice exposed to repeated social defeat stress [129]. Stress-induced social interaction reduction depends

on TLR2/TLR4 receptors specifically expressed in medial PFC (mPFC) microglia. Furthermore, reduced neuronal activity, microglial activation, and dendritic atrophy in the mPFC after stress also depend on these receptors. Although TLR4 KO animals did not present changes related to anxiety behavior in this study, these animals' cellular responses to stress were not evaluated [129]. Furthermore, whether the deletion of TLR4 only in microglial cells participates in behavioral and cellular responses promoted by stress exposure is still an open question.

The pharmacological antagonism of TLR4 with TAK-242 restores sucrose preference and ameliorates depressive-like behavior after CUMS [110] and reduces helplessness behavior and expression of TNF- α in the hippocampus induced by chronic social defeat stress (CSDS) [116]. TAK-242 also reversed behavioral alterations and hippocampal increase of TNF- α after intracerebroventricular injection of reduced forms of HMGB [disulfide HMGB1 (ds-HMGB1) and fully reduced HMGB1 (fr-HMGB1)] [117]. In addition, TAK-242 reversed the CUMS-induced depressive-like behavior both in C57bl/6 and in ob/ob (mutant mouse for leptin gene) mice, reversing the increase of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in the hippocampus and frontal cortex [43]. Overall, these results suggest that blockade of the TLR4 pathway can be beneficial to coping after stress exposure, similar to several data obtained with TLR4 KO mice (Table 1).

Concerning anxiety behavior, to our knowledge, few studies have evaluated if pharmacological inhibition of TLR4 can modify this behavior after stress. Intracerebroventricular administration of a TLR4 antagonist, the inhibitory LPS from *Rhodobacter sphaeroides* (*R. sphaeroides*), in naive animals induced an anxiolytic-like effect [102], contrasting with some reports in TLR4 KO mice indicating an anxiogenic effect (Table 1).

Therefore, pharmacological and genetic tools used to study the role of TLR4 in behavior, particularly related to anxiety, can render contradictory effects. The exact role of TLR4 in behavioral responses to stress still needs to be further elucidated. The resultant effect observed with TLR4 KO mice, for example, could involve the absence of these receptors during brain development [128, 129].

Interestingly, CMS promotes intestinal translocation and depressive like-behavior [130], and intestinal decontamination prevents the increase of TLR4, COX-2, and iNOS expression in the rat frontal cortex after stress exposure which indicates an essential role of bacterial translocation in activating the TLR4 pathway after stress. These effects of intestinal decontamination can also be observed with other types of stressors, such as CMS [113] and repeated restraint/acoustic stress [2]. However, in these studies, the behavior was not evaluated. Therefore, it is still not completely clear how bacterial translocation impacts behavior, and this discussion is beyond the scope of this review.

Altogether, these experimental data support the involvement of the TLR4 pathway in the neuroinflammatory and behavioral responses triggered by stress. Therefore, these receptors could be a potential target for therapeutic intervention in conditions of overactivation of the immune system. It is crucial to evaluate if similar alterations are observed in humans and if drugs currently used to treat stress-related disorders, such as antidepressants, or drugs potentially used to treat these disorders, could change the TLR4 pathway [96].

TLR4 in mood disorders and evidence of antidepressant effects involving this pathway

Recent data indicate that major depressive disorder (MDD) patients present changes in TLRs expression, or components of their signaling pathway, in blood cells [131–137]. TLR4 expression, for example, is increased in several MDD patients [132, 134, 136–138]. Interestingly, postmortem evaluation of TLRs in the PFC and dorsolateral PFC (DLPFC) of suicide and non-suicide depressive patients found higher levels of TLR4 mRNA and other TLRs [26, 139, 140]. However, no changes were found in the DLPFC of MDD patients [50]. Some reports suggest that TLR4 levels could predict the severity of depressive symptoms in MDD [132, 137]. Patients with severe symptoms, for example, presented significantly lower levels of methylation (an epigenetic process related to repression of gene transcription) in the *tlr4* gene, specifically in the cytosine-phosphate-guanine (CpG) site cg05429895, when compared to patients with

mild symptoms; these findings were in line with the increased plasmatic levels of TLR4 mRNA [137]. However, there are also data showing no association between TLR4 levels and symptom severity [69]. In addition, single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *tlr4* gene could predict some traits, such as anxiety and psychomotor retardation, observed during the first episode of depression in MDD patients [68]. Also, in MDD patients, peripheral levels of TLR4 expression could predict anxiety traits and weight loss [69]. Accordingly, TLR4 levels could be a potential biomarker in MDD.

A recent review summarized animal and human studies investigating if SSRI and SNRI attenuate neuroinflammation by modulating immune pathways [141]. In fact, human studies evidence anti-inflammatory effects of antidepressants [132–137, 139, 140]. Part of these effects could be mediated by TLRs, because chronic treatment with antidepressants from different classes attenuated the expression levels of several TLRs [133–135], including increased TLR4 levels [134, 135], in blood cells from MDD patients.

In vitro and animal studies with antidepressants, such as amitriptyline, escitalopram, and fluoxetine, support that their effects can result from TLR4 expression modulation [142–144]. For instance, several studies showed that fluoxetine decreases TLR4 levels in various brain regions [145, 146], a mechanism that could be related to subsequent inhibition of the NFκB pathway and the NLRP3 inflammasome [49, 147, 148].

Furthermore, not only antidepressants, but other compounds can modulate the TLR4 pathway. Compounds from plants used in the traditional Chinese and Indian cultures can modulate the TLR4 pathway [95, 149]. For example, asperosaponin VI (ASA VI), isolated from the *Radix Dipsaci*, used in traditional Chinese medicine, improved LPS-induced depressive-like behavior in mice. ASA VI also suppressed microglia-mediated neuroinflammatory response by inhibiting the TLR4/NFκB signaling pathway [149]. Furthermore, arctiin, isolated from the plant *Fructus arctii*, induced a dose-dependent antidepressant effect in mice. This compound also reduced excessive microglia activation, decreased the release of HMGB1, and attenuated the expression of TLR4 in the PFC of mice exposed to CUMS; it also attenuated the inflammatory profile of primary microglia stimulated with HMGB1 and TNF-α [101]. Baicalin, a flavonoid compound isolated from *Scutellaria baicalensis*, has anti-inflammatory and antioxidant properties [150]. This flavonoid attenuated CUMS-induced depressive-like behaviors and attenuated the increase in HMGB1/TLR4/NFκB expression [151]. Other flavonoids, such as flavones, apigenin, and hesperidin, demonstrated antidepressant effects by inhibiting TLR4 signaling in animal models [70, 152, 153]. Finally, curcumin, the yellow pigment in Indian saffron, isolated from the rhizome of *Curcuma longa*, has been investigated as a neuroprotective agent in several pathological conditions [154]. In a traumatic brain injury model and in an *in vitro* model, curcumin attenuated microglial activation and the expression of the TLR4/MyD88/NFκB pathway, and reduced neuronal apoptosis [155]. Moreover, it also attenuated neuroinflammation and long-term cognitive deficits induced by a high dose of LPS [156].

Therefore, not only drugs already used in the clinic, such as antidepressants, but also other compounds primarily used in popular medicine could exert at least part of their effects by modulating neuroinflammation via inhibition of the TLR4 pathway. Considering all experimental data showing anti-inflammatory and anti-stress effects of drugs that interfere with the TLR4 pathway and evidence of changes in TLR4 in MDD patients, we suggest that drugs interfering with this pathway could be used as adjuvant treatment in stress-related disorders. Also, they could be an alternative treatment in treatment-resistant patients, especially when there are signs of immune alteration. Finally, considering evidence that some antidepressants modulate the TLR4 pathway, those antidepressants with an anti-inflammatory profile would be a better choice for patients with altered immune parameters.

The eCB system in neuroimmune and behavioral response to stress: potential link with the TLR4 pathway

The eCB system modulates many functions in the CNS, such as neuroplasticity, the release of cytokines by microglia, cell homeostasis, and behavior [29, 157]. This system comprises endogenous lipidic messengers/neurotransmitters (the eCBs), receptors, and anabolic and catabolic enzymes [158]. The most

well understood eCBs are AEA and 2-AG. The *N*-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase D (NAPE-PLD) and the fatty acid amide hydrolase (FAAH) are responsible for the biosynthesis and hydrolysis of AEA, respectively. The diacylglycerol lipase α (DAGL α) and DAGL β , monoacylglycerol lipase (MAGL), and α/β -hydrolase domain 6 (ABHD6) are responsible for the synthesis and degradation of 2-AG, respectively. eCBs interact with CB1Rs and CB2Rs; but they can interact with other targets, such as transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) and peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and PPAR γ receptors [157]. Other eCBs exist, such as the *N*-palmitoylethanolamide (PEA) [159], which has several anti-inflammatory and neuroprotective properties [160–162], and its effects can be mediated, for example, by activation of CB2, TRPV1, and PPAR α [157, 159].

eCBs are synthesized by several cells and act on different brain cells, including neurons and microglia [163, 164]. Therefore, the widespread localization of the eCB system molecules in brain cells and its multi-target actions allows the control of many functions, from controlling local cellular actions to big circuits involved in behavior.

CB1Rs are expressed in the periphery, but mostly in the CNS; they are found in telencephalic and cerebellar regions, mostly in neurons, but also in glial cells [165–167]. They are the most expressed G-protein coupled receptors in the brain [165–167]. The neuronal CB1 expression is generally located at presynaptic elements, where they are coupled to Gi protein [165, 166]. Therefore, neuronal CB1 activation usually inhibits neurotransmitter release [165, 167, 168]. In the striatum, CB1R is expressed by parvalbumin-positive interneurons, whereas in the cerebral cortex, hippocampus, and amygdala they are predominately, but not exclusively, expressed by cholecystokinin (CCK)-positive interneurons [165]; they can also be expressed by glutamatergic neurons [169]. CB2Rs are mostly expressed by immune cells in the periphery, but also by microglia in the brain [170]. However, there is evidence of neuronal expression in the postsynaptic neurons, where its activation could hyperpolarize cells and inhibit signal transmission [171, 172]. Their expression is much lower than that of CB1 and it can be increased by several stimuli [170, 173].

Stress exposure affects the eCB system in the brain. For instance, acute or chronic homotypic stress activate FAAH and reduce AEA levels; in contrast, 2-AG levels are increased [174]. Repeated homotypic stress potentiates these effects on eCB levels, and reduces the expression of CB1 in most brain areas, such as hippocampus and amygdala, whereas increases it in the PFC [174]. Impaired CB1 signaling by AEA result in a lack of adaptation to repeated stress and consequently, behavioral changes [175], and impaired CB2 signaling could contribute to neuroinflammation [173]. Data regarding heterotypic stressors on eCB levels are less consistent [176]. eCB tone also controls the HPA axis. For example, CB1 antagonists increase circulating levels of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) [176, 177].

The presence of eCB signaling in stress-sensitive nuclei, such as hypothalamic and upstream limbic structures (amygdala, hippocampus, and PFC) suggests it plays an essential role in regulating the stress's neuroendocrine and behavioral effects [178]. The amygdala is one of the primary limbic structures involved in activating the HPA axis in response to stressful stimuli. In contrast, hippocampus and PFC have been identified as inhibitors of the HPA axis and are also involved in glucocorticoid-mediated negative feedback [179]. Consequently, adequate eCB signaling in the limbic system is essential to mitigate the consequences of aversive stressful situations, as extensively reported [29].

The interplay between eCB, stress, and the inflammatory system has gained much attention in the neuroimmune area. Several works support that the anti-stress effects of eCBs in animal models could involve the anti-inflammatory properties of these compounds [35–37, 167]. For instance, subchronic stress in mice induced an increase in the pro-inflammatory profile in the frontal cortex, which was attenuated by pharmacological activation or overexpression of CB1Rs or CB2Rs [35, 36]. Moreover, overactivation of microglial cells to LPS stimulation, the anxiogenic response, and sensitized conditioned fear response after repeated stress exposure in mice were attenuated or prevented by a non-selective CB1/CB2 agonist during stress [37]. Accordingly, eCBs can attenuate behavioral responses in stressful situations and limit the inflammatory response to different stimuli, acting as a buffer system against stressors [29, 39].

Several data also support an interplay between cannabinoid receptors and the TLR4 pathway [180–183]. For example, TLR4 and CB2 are colocalized in peritoneal macrophages; exposure to LPS or to a CB2 antagonist decreased their interaction, whereas 2-AG increased it, suggesting CB2 activation by 2-AG could dampen TLR4 signaling [180]. Corroborating this idea, a recent study in mast cells indicated that persistent activation of TLR4 by LPS engages the eCB 2-AG, which activates CB2 and attenuates inflammatory response [181]. Moreover, several other *in vitro* studies demonstrated that inflammatory effects of TLR4 activation are attenuated by cannabinoid receptor agonists [181–183].

Altogether, the data mentioned above support the hypothesis that activation of the TLR4 pathway in microglia by stress mobilizes 2-AG, which would activate CB2 as a protective mechanism to attenuate further microglia activation and its consequences. However, considering that 2-AG is a full agonist at CBs receptors, exposure to increased 2-AG levels during repeated stress can result in CB1 downregulation, and decreased CB1 signaling impairs control of synaptic neurotransmission [174], resulting in behavioral changes. Moreover, we speculate if increased 2-AG during repeated stress could somehow impair neuronal CB2 signaling, contributing to impaired synaptic transmission.

Additional to CB1Rs/CB2Rs, behavioral, neuroprotective, and anti-inflammatory effects of eCBs in stress situations can be further mediated by nuclear PPARs, mainly PPAR α and PPAR γ [164]; the last one has the highest expression levels in the CNS, in different cell types [184]. PPARs act as transcription factors by binding to specific DNA regions and regulating gene expression [165]. PPAR α KO mice did not demonstrate anxiety or depressive-like behaviors but showed increased fear learning [170]. Moreover, exposure to CUMS increased PPAR α protein and mRNA in the hippocampus. It also induced behavioral changes, HPA axis activation, oxidative parameters, and reduced neurotrophic factors in the hippocampus. These changes were blocked by the eCB PEA in a dose-dependent manner, and the PEA effect was attenuated or prevented by an antagonist of PPAR α , MK886 [169].

Corroborating a potential protective role also for PPAR γ receptors, animals with PPAR γ deletion in neurons show an exacerbated anxiogenic effect after acute stress, similar to a PPAR γ antagonist [185]. Moreover, exposure to acute restraint stress (6 eCB) in rats increased the expression of PPAR γ in the PFC [186, 187], and activation of these receptors attenuated stress-induced neuroinflammation, oxidative/nitrosative consequences in the PFC [167], and the anxiogenic effect [171]. Reduced NMDA signaling and increased glutamate uptake by glia could be involved in those effects [166]. Contrary to acute, repeated (4 days to 7 days) homotypic stress reduced PPAR γ levels in the PFC [2] or amygdala [168]. These studies did not evaluate PPAR α involvement, nor if eCBs attenuated the observed changes.

Interestingly, PPAR activation can interfere with proinflammatory actions of HMGB via NF κ B inhibition and also inhibits HMGB transcription [188]. Therefore, PPAR could regulate and be regulated by TLR4 signaling. For instance, the reduced PPAR γ levels in the PFC after repeated stress was not observed in TLR4 KO mice [2] and was attenuated by repeated treatment with a microglia inhibitor during stress [168]. Similarly, in macrophages, LPS inhibited PPAR γ mRNA synthesis through a NF κ B-dependent mechanism, which was not observed after TLR4 pharmacological inhibition or in TLR4 KO mice [189]. We suggest that increased PPAR γ transcription levels by acute stressors could be a protective mechanism after TLR4 pathway activation, which could parallel the initial changes in the eCB signaling in the brain [176] to promote stress habituation (Figure 3A). However, after prolonged or repeated exposure to the same kind of stress, this mechanism would be dysregulated, with the intensification of changes in the eCB system [176], increased TLR4 signaling, and decreased levels of PPAR γ , which could contribute to behavioral consequences of stress (Figure 3B). Although there are still few studies evidencing a direct relationship between stress, eCB system, and TLR4 in the brain, the *in vitro* and *in vivo* evidence of anti-inflammatory effects of eCBs mentioned above and others [190–192], including with potential involvement of TLR4 [2, 180, 181, 185], suggest that these mechanisms are important in stress-related disorders and their modulation could be beneficial in these disorders, such as MDD.

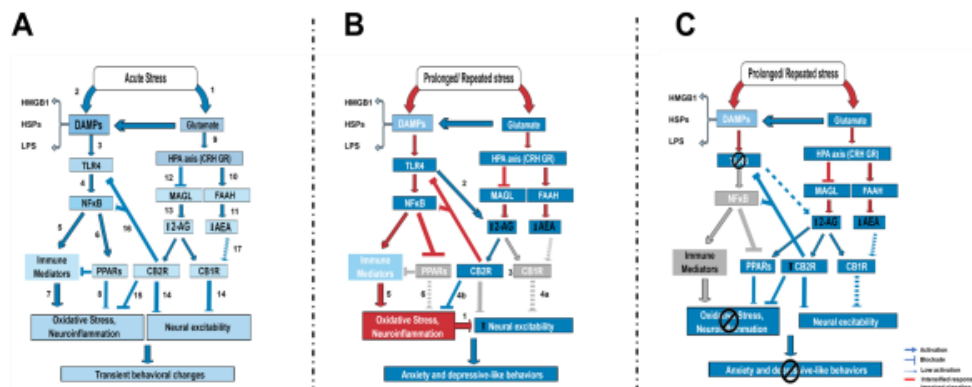


Figure 3. Schematic representation of TLR4 and eCB signaling interaction in the modulation of behavioral response to stress exposure. **A)** Short-term acute stress, including LPS, increase glutamate release (1) and release DAMPs (2), which can activate microglia. Microglia activation can result from the activation of TLR4 signaling. DAMPs such as HMGB1 activate TLR4 receptors (3) in brain areas, such as the PFC, resulting in NF κ B activation (4), transcription of proinflammatory-related genes (5), and also PPARs (6). PPARs can be activated by fatty acids, including its derivatives, such as the eCBs 2-AG, PEA, and oleylethanolamide (OEA, not shown). These mechanisms have opposite effects on oxidative stress and neuroinflammation induction, with immune mediators increasing them (7), whereas PPAR activation decreases it (8). Glutamate, also considered a DAMP, induces HPA axis activation (9), which consequently impacts the eCB signaling: CRH release increases FAAH activity (10) and decreases AEA levels (11), and glucocorticoid receptor (GR) activation by corticosterone could decrease MAGL activity (12) and increase 2-AG levels (13) in the brain. 2-AG is a full agonist at CB receptors, whereas AEA is a partial agonist. 2-AG action at CB1 and CB2 modulates neuronal excitability (14) and neuroinflammation (15), respectively, including by limiting TLR4 activation (16). The resultant expected effect would be transient behavioral changes, stress habituation, and coping behavior; **B)** under prolonged or repeated stress exposure, the TLR4 pathway activation and glutamate release are exacerbated. The proinflammatory profile is increased and PPAR γ expression is suppressed, which contributes to increasing oxidative stress and neuroinflammation, contributing to increased neuronal excitability (1). The eCB changes induced by stress are also exacerbated, with even lower levels of AEA and higher levels of 2-AG. Persistent TLR4 activation also recruits 2-AG (2). High levels of 2-AG can contribute to the downregulation of CB1Rs (3), impairing the control of neuronal excitability via CB1 (4a), but maintaining activation of microglia CB2Rs (4b). CB2R could be downregulated in neurons (no literature report about that), contributing to neuronal excitability (?). The higher oxidative stress/neuroinflammation (5) resultant from high TLR4 activation and decreased PPAR (6), along with impaired neuronal CB1 signaling (4) could contribute to higher neuronal excitability, impaired coping, and behavioral dysfunction; **C)** after pharmacological or genetic blockade of TLR4, the impact on eCB signaling and PPAR γ expression could be restored. TLR4 blockade can prevent impairment in microglia PPARs signaling by decreasing the NF κ B pathway, and decreasing oxidative damage and neuroinflammation. This blockade can contribute to decreasing the impact on the eCB signaling, which can now control the neuroimmune response by activating PPARs and CB2 or buffer the neuronal activity by acting on neuronal CB receptors

Thus, our current working hypothesis is that TLR4 pathway activation by DAMPs after acute or repeated homotypic stress exposure differently impacts eCB signaling through CB1, CB2, and PPAR γ effects, influencing behavioral response and stress habituation (Figure 3). A protective mechanism induced by TLR4 blockade after acute stress can be mediated by intensifying eCB signaling at PPAR γ and CB1Rs/CB2Rs, contributing to stress habituation. After prolonged or repeated stress, TLR4 blockade could prevent impairment in PPAR γ expression and limit increased levels of 2-AG during stress, potentially attenuating effects in the eCB signaling. The eCBs could then act via PPAR γ , CB1, and CB2 to counteract stress effects (Figure 3C). Considering that several studies evaluating neuroprotective and anti-inflammatory effects of cannabinoids, including AEA, 2-AG, PEA, OEA, synthetic agonists, and cannabidiol, in models of Alzheimer, multiple sclerosis, drug abuse, and cognition, for example, indicate that their effects are mediated by CB1/CB2 and PPAR receptors (for review, see [193]), adequate signaling via these receptors, and maybe others, can be essential for the overall anti-stress effects of eCBs in inflammatory conditions and psychiatric disorders.

In summary, dysfunctional eCB signaling under stressful situations can contribute to increased neuronal excitability and facilitation of the inflammatory effects of stress in neuronal circuits. Since there is a direct connection between eCB signaling during stress and the immune system, with crosstalk between TLR4 and eCB system, possibly involving different receptors, we propose that inhibiting TLR4 in microglia

would facilitate stress adaptation by decreasing the TLR4 pathway activation itself, but could also do so by regulating the eCB synthesis and signaling in microglia and neurons. These eCBs would act on microglia receptors, contributing to decreasing neuroinflammation, but could also regulate neuronal excitability by activating neuronal receptors. Therefore, the possible beneficial effects of inhibiting TLR4 signaling in stress could be, in part, through the facilitation of eCB signaling, mainly by CB1, CB2, and PPARs.

Conclusions

The current available therapy to treat neuropsychiatric disorders still faces a lack of efficacy or refractoriness. These problems are probably related to the complex neurobiology of these disorders. For instance, several pieces of evidence indicate that some, but not all, individuals suffering from psychiatric disorders have a proinflammatory profile. Some data indicate that this profile is related to symptom severity and could predict resistance to conventional antidepressant treatment [88, 194–196]. Moreover, several data show the antidepressant effects of anti-inflammatory drugs (for review, see [196]). Therefore, targeting immune system mechanisms could improve symptoms, allowing some patients to respond to treatment.

Based on the evidence discussed in this review, the overactivation of the TLR4 pathway by stress exposure and signs of its alteration in psychiatric patients indicate that it could contribute to neuropsychiatric disorders. Modulating the TLR4 pathway is expected to decrease the NF κ B activation and the NLRP3 inflammasome pathway, attenuating the expression of proinflammatory cytokines. Therefore, the imbalance in this system can trigger deleterious processes in the body by increasing the inflammatory response. Accordingly, modulation of this pathway could be a promising therapeutic strategy for those diseases.

Despite several studies proposing the modulation of this pathway to counteract stress effects, as discussed in this review, many aspects related to neuroinflammation remain unclear, and it is unlikely that one singular mechanism would promote clinically relevant effects. However, considering the potential relationship between the TLR4 pathway activation and eCB system actions, modulation of the TLR4 pathway could directly modulate its pathway and implicate eCB signaling, amplifying its potential effects.

Abbreviations

2-AG: 2-arachidonoylglycerol
AEA: anandamide
AP-1: activator protein 1
BDNF: brain-derived neurotrophic factor
CB1: cannabinoid type 1
CB2Rs: cannabinoid type 2 receptors
CMS: chronic mild stress
CNS: central nervous system
COX-2: cyclooxygenase-2
CRH: corticotropin-releasing hormone
CRS: chronic restraint stress
CUMS: chronic unpredictable mild stress
CX3CR1: C-X3-C motif chemokine receptor 1
DAMPs: damage-associated molecular patterns
eCB: endocannabinoid
EPM: elevated plus-maze
FAAH: fatty acid amide hydrolase
fr-HMGB1: fully reduced high mobility group box 1

FST: forced swim test
GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GR: glucocorticoid receptor
HMGB1: high mobility group box 1
HPA: hypothalamus-pituitary-adrenal
HSPs: heat shock proteins
Iba-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1
IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN α : interferon α
I κ B: inhibitor of nuclear factor kappa B
IKK: inhibitor of nuclear factor kappa B-kinase
IL-1 β : interleukin 1 β
iNOS: inducible nitric oxide synthase
IRAK: interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF3: interferon regulatory factor 3
KO: knockout
LPS: lipopolysaccharide
MAGL: monoacylglycerol lipase
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MD-2: myeloid differentiation factor 2
MDD: major depressive disorder
mRNA: messenger RNA
MyD88: myeloid differentiation factor 88
NF κ B: nuclear factor kappa B
NLRP3: nucleotide oligomerization domain-like receptor protein 3
NMDA: *N*-methyl-D-aspartate
OFT: open field test
PAMPs: pathogen-associated molecular patterns
PEA: palmitoylethanolamide
PFC: prefrontal cortex
PGE2: prostaglandin E2
p-I κ B α : phosphorylated inhibitor of nuclear factor kappa B α
p-NF κ B: phosphorylated nuclear factor kappa B
PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptor α
PRR: pattern recognition receptor
PVN: paraventricular nucleus of the hypothalamus
SPT: sucrose preference test
TAK1: transforming growth factor β -activated kinase 1
TIRAP: Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein
TLRs: Toll-like receptors
TNF- α : tumor necrosis factor α
TRAF6: tumor necrosis factor receptor-associated factor 6

TRAM: Toll/interleukin-1 receptor-domain-containing adapter-inducing interferon- β -related adaptor molecule
TRIF: Toll/interleukin-1 receptor-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TST: tail suspension test

Declarations

Author contributions

FJCSJ and LCC conceptualized the idea about this topic, created the figures and the Table. FJCSJ, LCC, and SFL searched the literature and wrote the original draft. SFL supervised FJCSJ and LCC writing, and performed the review and editing. All authors contributed to the final manuscript and approved the final version of the manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Ethical approval

Not applicable.

Consent to participate

Not applicable.

Consent to publication

Not applicable.

Availability of data and materials

Not applicable.

Funding

Sabrina Francesca Lisboa receives fellowship from The São Paulo Research Foundation-FAPESP [2017/19731-6], National Council for Scientific and Technological Development-CNPq [420818-2018-9], and L'Oreal/Brazilian Academy of Sciences-For Women in Science. Fábio José Coelho Souza-Junior receives a fellowship from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel-CAPES [88887.510048/2020-00]. Laura Colete Cunha received undergraduate student fellowships from CNPq [166068/2020-9, 2019-1444, 2021-1306]. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Copyright

© The Author(s) 2022.

References

1. Graeff FG. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. *Braz J Psychiatry*. 2007;29:S3-6. Portuguese.
2. Gárate I, Garcia-Bueno B, Madrigal JL, Caso JR, Alou L, Gomez-Lus ML, et al. Stress-induced neuroinflammation: role of the Toll-like receptor-4 pathway. *Biol Psychiatry*. 2013;73:32-43.
3. Castrén E, Hen R. Neuronal plasticity and antidepressant actions. *Trends Neurosci*. 2013;36:259-67.
4. Radley J, Morilak D, Viau V, Campeau S. Chronic stress and brain plasticity: mechanisms underlying adaptive and maladaptive changes and implications for stress-related CNS disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015;58:79-91.

5. Godoy LD, Rossignoli MT, Delfino-Pereira P, Garcia-Cairasco N, de Lima Umeoka EH. A comprehensive overview on stress neurobiology: basic concepts and clinical implications. *Front Behav Neurosci.* 2018;12:127.
6. Herman JP. Neural pathways of stress integration: relevance to alcohol abuse. *Alcohol Res.* 2012;34:441-7.
7. McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 2000;886:172-89.
8. Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci.* 2002;22:6810-8.
9. Shansky RM, Morrison JH. Stress-induced dendritic remodeling in the medial prefrontal cortex: effects of circuit, hormones and rest. *Brain Res.* 2009;1293:108-13.
10. Wilber AA, Walker AG, Southwood CJ, Farrell MR, Lin GL, Rebec GV, et al. Chronic stress alters neural activity in medial prefrontal cortex during retrieval of extinction. *Neuroscience.* 2011;174:115-31.
11. Radley JJ, Rocher AB, Miller M, Janssen WG, Liston C, Hof PR, et al. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex.* 2006;16:313-20.
12. Frank MG, Fonken LK, Watkins LR, Maier SF. Microglia: neuroimmune-sensors of stress. *Semin Cell Dev Biol.* 2019;94:176-85.
13. Walker FR, Nilsson M, Jones K. Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. *Curr Drug Targets.* 2013;14:1262-76.
14. Arcuri C, Mecca C, Bianchi R, Giambanco I, Donato R. The pathophysiological role of microglia in dynamic surveillance, phagocytosis and structural remodeling of the developing CNS. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:191.
15. Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in physiology and disease. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:619-43.
16. Catale C, Gironda S, Lo Iacono L, Carola V. Microglial function in the effects of early-life stress on brain and behavioral development. *J Clin Med.* 2020;9:468.
17. Sun R, Zhang Z, Lei Y, Liu Y, Lu C, Rong H, et al. Hippocampal activation of microglia may underlie the shared neurobiology of comorbid posttraumatic stress disorder and chronic pain. *Mol Pain.* 2016;12:1744806916679166.
18. Frank MG, Fonken LK, Watkins LR, Maier SF. Acute stress induces chronic neuroinflammatory, microglial and behavioral priming: a role for potentiated NLRP3 inflammasome activation. *Brain Behav Immun.* 2020;89:32-42.
19. Woo E, Sansing LH, Arnsten AFT, Datta D. Chronic stress weakens connectivity in the prefrontal cortex: architectural and molecular changes. *Chronic Stress (Thousand Oaks).* 2021;5:24705470211029254.
20. McEwen BS, Nasca C, Gray JD. Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology.* 2016;41:3-23.
21. Liu J, Buisman-Pijlman F, Hutchinson MR. Toll-like receptor 4: innate immune regulator of neuroimmune and neuroendocrine interactions in stress and major depressive disorder. *Front Neurosci.* 2014;8:309.
22. Mouihate A, Mehdawi ECB. Toll-like receptor 4-mediated immune stress in pregnant rats activates STAT3 in the fetal brain: role of interleukin-6. *Pediatr Res.* 2016;79:781-7.
23. Li L, Acioglu C, Heary RF, Elkabes S. Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases. *Brain Behav Immun.* 2021;91:740-55.
24. Franklin TC, Xu C, Duman RS. Depression and sterile inflammation: essential role of danger associated molecular patterns. *Brain Behav Immun.* 2018;72:2-13.

25. García-Bueno B, Gassó P, MacDowell KS, Callado LF, Mas S, Bernardo M, et al. Evidence of activation of the Toll-like receptor-4 proinflammatory pathway in patients with schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci*. 2016;41:E46–55.
26. Gárate I, García-Bueno B, Madrigal JL, Caso JR, Alou L, Gómez-Lus ML, et al. Toll-like 4 receptor inhibitor TAK-242 decreases neuroinflammation in rat brain frontal cortex after stress. *J Neuroinflammation*. 2014;11:8.
27. Hill MN, Gorzalka BB. Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB₁ receptor agonist HU-210 following chronic stress. *Eur J Pharmacol*. 2004;499:291–5.
28. Viveros MP, Marco EM, File SE. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005;81:331–42.
29. Lisboa SF, Gomes FV, Terzian AL, Aguiar DC, Moreira FA, Resstel LB, et al. The endocannabinoid system and anxiety. *Vitam Horm*. 2017;103:193–279.
30. Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988;34:605–13.
31. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990;346:561–4.
32. Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative *in vitro* autoradiographic study. *J Neurosci*. 1991;11:563–83.
33. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992;258:1946–9.
34. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, et al. 2-arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;215:89–97.
35. Zoppi S, Pérez Nievas BG, Madrigal JL, Manzanares J, Leza JC, García-Bueno B. Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36:805–18.
36. Zoppi S, Madrigal JL, Caso JR, García-Gutiérrez MS, Manzanares J, Leza JC, et al. Regulatory role of the cannabinoid CB₂ receptor in stress-induced neuroinflammation in mice. *Br J Pharmacol*. 2014;171:2814–26.
37. Lisboa SF, Niraula A, Resstel LB, Guimaraes FS, Godbout JP, Sheridan JF. Repeated social defeat-induced neuroinflammation, anxiety-like behavior and resistance to fear extinction were attenuated by the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43:1924–33.
38. Hill MN, McEwen BS. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34:791–7.
39. Lisboa SF, Gomes FV, Guimaraes FS, Campos AC. Microglial cells as a link between cannabinoids and the immune hypothesis of psychiatric disorders. *Front Neurol*. 2016;7:5.
40. Mecha M, Carrillo-Salinas FJ, Feliú A, Mestre L, Guaza C. Microglia activation states and cannabinoid system: therapeutic implications. *Pharmacol Ther*. 2016;166:40–55.
41. Dunn GA, Loftis JM, Sullivan EL. Neuroinflammation in psychiatric disorders: an introductory primer. *Pharmacol Biochem Behav*. 2020;196:172981.
42. Zhang Y, Liang X, Bao X, Xiao W, Chen G. Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors: current research and prospective. *Eur J Med Chem*. 2022;235:114291.
43. Wang Y, Xu J, Liu Y, Li Z, Li X. TLR4-NF- κ B signal involved in depressive-like behaviors and cytokine expression of frontal cortex and hippocampus in stressed C57BL/6 and ob/ob mice. *Neural Plast*. 2018;2018:7254016.

44. Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, et al. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr Physiol*. 2016;6:603–21.
45. Deak T, Quinn M, Cidlowski JA, Victoria NC, Murphy AZ, Sheridan JF. Neuroimmune mechanisms of stress: sex differences, developmental plasticity, and implications for pharmacotherapy of stress-related disease. *Stress*. 2015;18:367–80.
46. Haykin H, Rolls A. The neuroimmune response during stress: a physiological perspective. *Immunity*. 2021;54:1933–47.
47. Antonelli F, Casciati A, Tanori M, Tanno B, Linares-Vidal MV, Serra N, et al. Alterations in morphology and adult neurogenesis in the dentate gyrus of *Patched1* heterozygous mice. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:168.
48. Ménard C, Pfau ML, Hodes GE, Russo SJ. Immune and neuroendocrine mechanisms of stress vulnerability and resilience. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42:62–80.
49. Liu YZ, Wang YX, Jiang CL. Inflammation: the common pathway of stress-related diseases. *Front Hum Neurosci*. 2017;11:316.
50. Martín-Hernández D, Tendilla-Beltrán H, Madrigal JLM, García-Bueno B, Leza JC, Caso JR. Chronic mild stress alters kynurenine pathways changing the glutamate neurotransmission in frontal cortex of rats. *Mol Neurobiol*. 2019;56:490–501.
51. Hodes GE, Ménard C, Russo SJ. Integrating interleukin-6 into depression diagnosis and treatment. *Neurobiol Stress*. 2016;4:15–22.
52. Becking K, Boschloo L, Vogelzangs N, Haarman BC, Riemersma-van der Lek R, Penninx BW, et al. The association between immune activation and manic symptoms in patients with a depressive disorder. *Transl Psychiatry*. 2013;3:e314.
53. Chun EK, Donovan M, Liu Y, Wang Z. Behavioral, neurochemical, and neuroimmune changes associated with social buffering and stress contagion. *Neurobiol Stress*. 2022;16:100427.
54. Dantzer R. Neuroimmune interactions: from the brain to the immune system and vice versa. *Physiol Rev*. 2018;98:477–504.
55. Morimoto K, Nakajima K. Role of the immune system in the development of the central nervous system. *Front Neurosci*. 2019;13:916.
56. Haroon E, Raison CL, Miller AH. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37:137–62.
57. Steiner J, Walter M, Gos T, Guillemin GJ, Bernstein HG, Sarnyai Z, et al. Severe depression is associated with increased microglial quinolinic acid in subregions of the anterior cingulate gyrus: evidence for an immune-modulated glutamatergic neurotransmission? *J Neuroinflammation*. 2011;8:94. Erratum in: *J Neuroinflammation*. 2013;10:34.
58. Torres-Platas SG, Cruceanu C, Chen GG, Turecki G, Mechawar N. Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. *Brain Behav Immun*. 2014;42:50–9.
59. Holmes SE, Hinz R, Conen S, Gregory CJ, Matthews JC, Anton-Rodriguez JM, et al. Elevated translocator protein in anterior cingulate in major depression and a role for inflammation in suicidal thinking: a positron emission tomography study. *Biol Psychiatry*. 2018;83:61–9.
60. Soczynska JK, Mansur RB, Brietzke E, Swardfager W, Kennedy SH, Woldeyohannes HO, et al. Novel therapeutic targets in depression: minocycline as a candidate treatment. *Behav Brain Res*. 2012;235:302–17.
61. Dean OM, Kanchanatawan B, Ashton M, Mohebbi M, Ng CH, Maes M, et al. Adjunctive minocycline treatment for major depressive disorder: a proof of concept trial. *Aust N Z J Psychiatry*. 2017;51:829–40.

62. Husain MI, Chaudhry IB, Husain N, Khoso AB, Rahman RR, Hamirani MM, et al. Minocycline as an adjunct for treatment-resistant depressive symptoms: a pilot randomised placebo-controlled trial. *J Psychopharmacol.* 2017;31:1166–75.
63. Feng X, Zhao Y, Yang T, Song M, Wang C, Yao Y, et al. Glucocorticoid-driven NLRP3 inflammasome activation in hippocampal microglia mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors. *Front Mol Neurosci.* 2019;12:210.
64. Iwata M, Ota KT, Li XY, Sakaue F, Li N, Duthel S, et al. Psychological stress activates the inflammasome via release of adenosine triphosphate and stimulation of the purinergic type 2X7 receptor. *Biol Psychiatry.* 2016;80:12–22.
65. Pan Y, Chen XY, Zhang QY, Kong LD. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 β -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. *Brain Behav Immun.* 2014;41:90–100. Erratum in: *Brain Behav Immun.* 2021;97:455.
66. Du RH, Tan J, Sun XY, Lu M, Ding JH, Hu G. Fluoxetine inhibits NLRP3 inflammasome activation: implication in depression. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2016;19:pyw037.
67. Alcocer-Gómez E, Ulecia-Morón C, Marín-Aguilar F, Rybkina T, Casas-Barquero N, Ruiz-Cabello J, et al. Stress-induced depressive behaviors require a functional NLRP3 inflammasome. *Mol Neurobiol.* 2016;53:4874–82.
68. Wang J, Yang C, Liu Z, Li X, Liu M, Wang Y, et al. Association of the TLR4 gene with depressive symptoms and antidepressant efficacy in major depressive disorder. *Neurosci Lett.* 2020;736:135292.
69. Wu MK, Huang TL, Huang KW, Huang YL, Hung YY. Association between toll-like receptor 4 expression and symptoms of major depressive disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015;11:1853–7.
70. Shirayama Y, Iwata M, Fujita Y, Oda Y, Hashimoto K. The Toll-like receptor 4 antagonist TAK-242 induces antidepressant-like effects in a rat learned helplessness model of depression through BDNF-TrkB signaling and AMPA receptor activation. *Behav Brain Res.* 2022;423:113769.
71. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol.* 2007;19:24–32.
72. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014;5:461.
73. Yang J, Liu R, Lu F, Xu F, Zheng J, Li Z, et al. Fast green FCF attenuates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior and downregulates TLR4/Myd88/NF- κ B signal pathway in the mouse hippocampus. *Front Pharmacol.* 2019;10:501.
74. He MC, Shi Z, Qin M, Sha NN, Li Y, Liao DF, et al. Muscone ameliorates LPS-induced depressive-like behaviors and inhibits neuroinflammation in prefrontal cortex of mice. *Am J Chin Med.* 2020;48:559–77.
75. Yirmiya R, Pollak Y, Barak O, Avitsur R, Ovadia H, Bette M, et al. Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents. *Neuropsychopharmacology.* 2001;24:531–44.
76. Lasselin J, Schedlowski M, Karshikoff B, Engler H, Lekander M, Konsman JP. Comparison of bacterial lipopolysaccharide-induced sickness behavior in rodents and humans: relevance for symptoms of anxiety and depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 2020;115:15–24.
77. Yirmiya R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Res.* 1996;711:163–74.
78. Ohgi Y, Futamura T, Kikuchi T, Hashimoto K. Effects of antidepressants on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013;103:853–9.
79. Tomaz VS, Chaves Filho AJM, Cordeiro RC, Jucá PM, Soares MVR, Barroso PN, et al. Antidepressants of different classes cause distinct behavioral and brain pro- and anti-inflammatory changes in mice submitted to an inflammatory model of depression. *J Affect Disord.* 2020;268:188–200.
80. O'Connor JC, Lawson MA, André C, Briley EM, Szegedi SS, Lestage J, et al. Induction of IDO by bacille Calmette-Guérin is responsible for development of murine depressive-like behavior. *J Immunol.* 2009;182:3202–12.

81. O'Connor JC, André C, Wang Y, Lawson MA, Szegedi SS, Lestage J, et al. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guérin. *J Neurosci*. 2009;29:4200–9.
82. O'Connor JC, Lawson MA, André C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry*. 2009;14:511–22.
83. Zhang W, Xu X, Kao R, Mele T, Kvietys P, Martin CM, et al. Cardiac fibroblasts contribute to myocardial dysfunction in mice with sepsis: the role of NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One*. 2014;9:e107639.
84. Walker AK, Budac DP, Bisulco S, Lee AW, Smith RA, Beenders B, et al. NMDA receptor blockade by ketamine abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in C57BL/6J mice. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38:1609–16.
85. Zhao J, Liu X, Chang D, Zhang X, Lian H, Du X, et al. Low-dose ketamine improves LPS-induced depression-like behavior in rats by activating cholinergic anti-inflammatory pathways. *ACS Chem Neurosci*. 2020;11:752–62.
86. Sahu P, Mudgal J, Arora D, Kinra M, Mallik SB, Rao CM, et al. Cannabinoid receptor 2 activation mitigates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2019;236:1829–38.
87. Florensa-Zanuy E, Garro-Martínez E, Adell A, Castro E, Díaz Á, Pazos Á, et al. Cannabidiol antidepressant-like effect in the lipopolysaccharide model in mice: modulation of inflammatory pathways. *Biochem Pharmacol*. 2021;185:114433.
88. Beurel E, Toups M, Nemeroff CB. The bidirectional relationship of depression and inflammation: double trouble. *Neuron*. 2020;107:234–56.
89. Cattaneo A, Gennarelli M, Uher R, Breen G, Farmer A, Aitchison KJ, et al. Candidate genes expression profile associated with antidepressants response in the GENDEP study: differentiating between baseline 'predictors' and longitudinal 'targets'. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38:377–85.
90. Bauer ME, Papadopoulos A, Poon L, Perks P, Lightman SL, Checkley S, et al. Altered glucocorticoid immunoregulation in treatment resistant depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2003;28:49–65.
91. Tam JSY, Collier JK, Hughes PA, Prestidge CA, Bowen JM. Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists as potential therapeutics for intestinal inflammation. *Indian J Gastroenterol*. 2021;40:5–21.
92. Savva A, Roger T. Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. *Front Immunol*. 2013;4:387.
93. Wittebole X, Castanares-Zapatero D, Laterre PF. Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:568396.
94. Rice TW, Wheeler AP, Bernard GR, Vincent JL, Angus DC, Aikawa N, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis. *Crit Care Med*. 2010;38:1685–94.
95. Zaffaroni L, Peri F. Recent advances on Toll-like receptor 4 modulation: new therapeutic perspectives. *Future Med Chem*. 2018;10:461–76.
96. Guo LT, Wang SQ, Su J, Xu LX, Ji ZY, Zhang RY, et al. Baicalin ameliorates neuroinflammation-induced depressive-like behavior through inhibition of toll-like receptor 4 expression via the PI3K/AKT/FoxO1 pathway. *J Neuroinflammation*. 2019;16:95.
97. Barochia A, Solomon S, Cui X, Natanson C, Eichacker PQ. Eritoran tetrasodium (E5564) treatment for sepsis: review of preclinical and clinical studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011;7:479–94.
98. Aboul-Fotouh S, Habib M, Asaad T, Kassim SK, Ghanem MH. Behavioral effects of toll-like receptor-4 antagonist 'eritoran' in an experimental model of depression: role of prefrontal and hippocampal neurogenesis and γ -aminobutyric acid/glutamate balance. *Behav Pharmacol*. 2018;29:413–25.

99. Hines DJ, Choi HB, Hines RM, Phillips AG, MacVicar BA. Prevention of LPS-induced microglia activation, cytokine production and sickness behavior with TLR4 receptor interfering peptides. *PLoS One*. 2013;8:e60388.
100. Cheng Y, Pardo M, Armini RS, Martinez A, Mouhsine H, Zagury JF, et al. Stress-induced neuroinflammation is mediated by GSK3-dependent TLR4 signaling that promotes susceptibility to depression-like behavior. *Brain Behav Immun*. 2016;53:207–22.
101. Xu X, Zeng XY, Cui YX, Li YB, Cheng JH, Zhao XD, et al. Antidepressive effect of arctiin by attenuating neuroinflammation via HMGB1/TLR4- and TNF- α /TNFR1-mediated NF- κ B activation. *ACS Chem Neurosci*. 2020;11:2214–30.
102. Okun E, Barak B, Saada-Madar R, Rothman SM, Griffioen KJ, Roberts N, et al. Evidence for a developmental role for TLR4 in learning and memory. *PLoS One*. 2012;7:e47522.
103. Femenia T, Qian Y, Arentsen T, Forssberg H, Diaz Heijtz R. Toll-like receptor-4 regulates anxiety-like behavior and DARPP-32 phosphorylation. *Brain Behav Immun*. 2018;69:273–82.
104. Tay TL, Béchade C, D'Andrea I, St-Pierre MK, Henry MS, Roumier A, et al. Microglia gone rogue: impacts on psychiatric disorders across the lifespan. *Front Mol Neurosci*. 2018;10:421.
105. Mondelli V, Vernon AC, Turkheimer F, Dazzan P, Pariante CM. Brain microglia in psychiatric disorders. *Lancet Psychiatry*. 2017;4:563–72.
106. Wieghofer P, Prinz M. Genetic manipulation of microglia during brain development and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862:299–309.
107. Choi I, Zhang Y, Seegobin SP, Pruvost M, Wang Q, Purtell K, et al. Microglia clear neuron-released α -synuclein via selective autophagy and prevent neurodegeneration. *Nat Commun*. 2020;11:1386.
108. Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291:E965–73.
109. Flak JN, Ostrander MM, Tasker JG, Herman JP. Chronic stress-induced neurotransmitter plasticity in the PVN. *J Comp Neurol*. 2009;517:156–65.
110. Fu S, Wang J, Hao C, Dang H, Jiang S. Tetramethylpyrazine ameliorates depression by inhibiting TLR4-NLRP3 inflammasome signal pathway in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2019;236:2173–85.
111. Hemmati S, Sadeghi MA, Mohammad Jafari R, Yousefi-Manesh H, Dehpour AR. The antidepressant effects of GM-CSF are mediated by the reduction of TLR4/NF- κ B-induced IDO expression. *J Neuroinflammation*. 2019;16:117.
112. Su J, Pan YW, Wang SQ, Li XZ, Huang F, Ma SP. Saikosaponin-d attenuated lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors via inhibiting microglia activation and neuroinflammation. *Int Immunopharmacol*. 2020;80:106181.
113. Gárate I, García-Bueno B, Madrigal JL, Bravo L, Berrocoso E, Caso JR, et al. Origin and consequences of brain Toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. *J Neuroinflammation*. 2011;8:151.
114. O'Loughlin E, Pakan JMP, Yilmazer-Hanke D, McDermott KW. Acute in utero exposure to lipopolysaccharide induces inflammation in the pre- and postnatal brain and alters the glial cytoarchitecture in the developing amygdala. *J Neuroinflammation*. 2017;14:212.
115. Liu L, Zhao Z, Lu L, Liu J, Sun J, Dong J. Icaritin and icaritin ameliorated hippocampus neuroinflammation via mediating HMGB1 expression in social defeat model in mice. *Int Immunopharmacol*. 2019;75:105799.
116. Zhang H, Ding L, Shen T, Peng D. HMGB1 involved in stress-induced depression and its neuroinflammatory priming role: a systematic review. *Gen Psychiatr*. 2019;32:e100084.

117. Lian YJ, Gong H, Wu TY, Su WJ, Zhang Y, Yang YY, et al. Ds-HMGB1 and fr-HMGB induce depressive behavior through neuroinflammation in contrast to nonoxid-HMGB1. *Brain Behav Immun.* 2017;59:322–32.
118. Frank MG, Weber MD, Watkins LR, Maier SF. Stress sounds the alarm: the role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming. *Brain Behav Immun.* 2015;48:1–7.
119. Weber MD, Frank MG, Tracey KJ, Watkins LR, Maier SF. Stress induces the danger-associated molecular pattern HMGB-1 in the hippocampus of male Sprague Dawley rats: a priming stimulus of microglia and the NLRP3 inflammasome. *J Neurosci.* 2015;35:316–24.
120. Kim S, Kim SY, Pribis JP, Lotze M, Mollen KP, Shapiro R, et al. Signaling of high mobility group box 1 (HMGB1) through toll-like receptor 4 in macrophages requires CD14. *Mol Med.* 2013;19:88–98.
121. Antón M, Alén F, Gómez de Heras R, Serrano A, Pavón FJ, Leza JC, et al. Oleoylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF- κ B danger signaling in rat frontal cortex and depressive-like behavior induced by ethanol binge administration. *Addict Biol.* 2017;22:724–41.
122. Wang B, Lian YJ, Su WJ, Peng W, Dong X, Liu LL, et al. HMGB1 mediates depressive behavior induced by chronic stress through activating the kynurenine pathway. *Brain Behav Immun.* 2018;72:51–60.
123. Campolo M, Paterniti I, Siracusa R, Filippone A, Esposito E, Cuzzocrea S. TLR4 absence reduces neuroinflammation and inflammasome activation in Parkinson's diseases *in vivo* model. *Brain Behav Immun.* 2019;76:236–47.
124. Cui W, Sun C, Ma Y, Wang S, Wang X, Zhang Y. Inhibition of TLR4 induces M2 microglial polarization and provides neuroprotection via the NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease. *Front Neurosci.* 2020;14:444.
125. Wang J, Hou Y, Zhang L, Liu M, Zhao J, Zhang Z, et al. Estrogen attenuates traumatic brain injury by inhibiting the activation of microglia and astrocyte-mediated neuroinflammatory responses. *Mol Neurobiol.* 2021;58:1052–61.
126. Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Leza JC, Moro MA, Lizasoain I. Toll-like receptor 4 is involved in subacute stress-induced neuroinflammation and in the worsening of experimental stroke. *Stroke.* 2008;39:1314–20.
127. Pascual M, Baliño P, Aragón CM, Guerri C. Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology.* 2015;89:352–9.
128. Li C, Yan Y, Cheng J, Xiao G, Gu J, Zhang L, et al. Toll-like receptor 4 deficiency causes reduced exploratory behavior in mice under approach-avoidance conflict. *Neurosci Bull.* 2016;32:127–36.
129. Nie X, Kitaoka S, Tanaka K, Segi-Nishida E, Imoto Y, Ogawa A, et al. The innate immune receptors TLR2/4 mediate repeated social defeat stress-induced social avoidance through prefrontal microglial activation. *Neuron.* 2018;99:464–79.e7.
130. Martín-Hernández D, Caso JR, Bris ÁG, Maus SR, Madrigal JL, García-Bueno B, et al. Bacterial translocation affects intracellular neuroinflammatory pathways in a depression-like model in rats. *Neuropharmacology.* 2016;103:122–33.
131. Na S, Duan X, Wang R, Fan Y, Xue K, Tian S, et al. Chronic neuroinflammation induced by lipopolysaccharide injection into the third ventricle induces behavioral changes. *J Mol Neurosci.* 2021;71:1306–19.
132. Hung YY, Kang HY, Huang KW, Huang TL. Association between toll-like receptors expression and major depressive disorder. *Psychiatry Res.* 2014;220:283–6.
133. Hung YY, Huang KW, Kang HY, Huang GY, Huang TL. Antidepressants normalize elevated Toll-like receptor profile in major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl).* 2016;233:1707–14.

134. Hung YY. Antidepressants improve negative regulation of Toll-like receptor signaling in monocytes from patients with major depression. *Neuroimmunomodulation*. 2018;25:42–8.
135. Hou T-Y, Huang T-L, Lin C-C, Wu M-K, Hung Y-Y. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors and serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors on Toll-like-receptors expression profiles. *Neuropsychiatry*. 2018;8:243–8.
136. Kéri S, Szabó C, Kelemen O. Expression of Toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells and response to cognitive-behavioral therapy in major depressive disorder. *Brain Behav Immun*. 2014;40:235–43.
137. Rasmusson AJ, Gallwitz M, Soltanabadi B, Ciuculete DM, Mengel-From J, Christensen K, et al. Toll-like receptor 4 methylation grade is linked to depressive symptom severity. *Transl Psychiatry*. 2021;11:371.
138. Hung YF, Chen CY, Shih YC, Liu HY, Huang CM, Hsueh YP. Endosomal TLR3, TLR7, and TLR8 control neuronal morphology through different transcriptional programs. *J Cell Biol*. 2018;217:2727–42.
139. Pandey GN, Rizavi HS, Ren X, Bhaumik R, Dwivedi Y. Toll-like receptors in the depressed and suicide brain. *J Psychiatr Res*. 2014;53:62–8.
140. Pandey GN, Rizavi HS, Bhaumik R, Ren X. Innate immunity in the postmortem brain of depressed and suicide subjects: role of Toll-like receptors. *Brain Behav Immun*. 2019;75:101–11.
141. Dionisie V, Filip GA, Manea MC, Manea M, Riga S. The anti-inflammatory role of SSRI and SNRI in the treatment of depression: a review of human and rodent research studies. *Inflammopharmacology*. 2021;29:75–90.
142. Hutchinson MR, Loram LC, Zhang Y, Shridhar M, Rezvani N, Berkelhammer D, et al. Evidence that tricyclic small molecules may possess toll-like receptor and myeloid differentiation protein 2 activity. *Neuroscience*. 2010;168:551–63.
143. Sacre S, Medghalchi M, Gregory B, Brennan F, Williams R. Fluoxetine and citalopram exhibit potent antiinflammatory activity in human and murine models of rheumatoid arthritis and inhibit toll-like receptors. *Arthritis Rheum*. 2010;62:683–93.
144. Habib M, Shaker S, El-Gayar N, Aboul-Fotouh S. The effects of antidepressants “fluoxetine and imipramine” on vascular abnormalities and Toll like receptor-4 expression in diabetic and non-diabetic rats exposed to chronic stress. *PLoS One*. 2015;10:e0120559.
145. Trojan E, Chamera K, Bryniarska N, Kotarska K, Leśkiewicz M, Regulska M, et al. Role of chronic administration of antidepressant drugs in the prenatal stress-evoked inflammatory response in the brain of adult offspring rats: involvement of the NLRP3 inflammasome-related pathway. *Mol Neurobiol*. 2019;56:5365–80. Erratum in: *Mol Neurobiol*. 2019;56:5381.
146. Zhang K, Lin W, Zhang J, Zhao Y, Wang X, Zhao M. Effect of Toll-like receptor 4 on depressive-like behaviors induced by chronic social defeat stress. *Brain Behav*. 2020;10:e01525.
147. Li H, Lin S, Qin T, Li H, Ma Z, Ma S. Senegenin exerts anti-depression effect in mice induced by chronic un-predictable mild stress via inhibition of NF- κ B regulating NLRP3 signal pathway. *Int Immunopharmacol*. 2017;53:24–32.
148. Xue J, Li H, Deng X, Ma Z, Fu Q, Ma S. L-menthone confers antidepressant-like effects in an unpredictable chronic mild stress mouse model via NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines and central neurotransmitters. *Pharmacol Biochem Behav*. 2015;134:42–8.
149. Zhang J, Yi S, Li Y, Xiao C, Liu C, Jiang W, et al. The antidepressant effects of asperosaponin VI are mediated by the suppression of microglial activation and reduction of TLR4/NF- κ B-induced IDO expression. *Psychopharmacology (Berl)*. 2020;237:2531–45.
150. Sui X, Han X, Chen P, Wu Q, Feng J, Duan T, et al. Baicalin induces apoptosis and suppresses the cell cycle progression of lung cancer cells through downregulating Akt/mTOR signaling pathway. *Front Mol Biosci*. 2021;7:602282.

151. Liu L, Dong Y, Shan X, Li L, Xia B, Wang H. Anti-depressive effectiveness of baicalin *in vitro* and *in vivo*. *Molecules*. 2019;24:326.
152. Kwatra M, Ahmed S, Gawali B, Panda SR, Naidu V. Hesperidin alleviates chronic restraint stress and lipopolysaccharide-induced hippocampus and frontal cortex damage in mice: role of TLR4/NF- κ B, p38 MAPK/JNK, Nrf2/ARE signaling. *Neurochem Int*. 2020;140:104835.
153. Bijani S, Dizaji R, Sharafi A, Hosseini MJ. Neuroprotective effect of apigenin on depressive-like behavior: mechanistic approach. *Neurochem Res*. 2022;47:644–55.
154. Panaro MA, Corrado A, Benameur T, Paolo CF, Cici D, Porro C. The emerging role of curcumin in the modulation of TLR-4 signaling pathway: focus on neuroprotective and anti-rheumatic properties. *Int J Mol Sci*. 2020;21:2299.
155. Zhu HT, Bian C, Yuan JC, Chu WH, Xiang X, Chen F, et al. Curcumin attenuates acute inflammatory injury by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in experimental traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*. 2014;11:59.
156. Sorrenti V, Contarini G, Sut S, Dall'Acqua S, Confortin F, Pagetta A, et al. Curcumin prevents acute neuroinflammation and long-term memory impairment induced by systemic lipopolysaccharide in mice. *Front Pharmacol*. 2018;9:183.
157. Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2020;16:9–29.
158. Lutz B, Marsicano G, Maldonado R, Hillard CJ. The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16:705–18.
159. Petrosino S, Di Marzo V. The pharmacology of palmitoylethanolamide and first data on the therapeutic efficacy of some of its new formulations. *Br J Pharmacol*. 2017;174:1349–65.
160. D'Aloia A, Molteni L, Gullo F, Bresciani E, Artusa V, Rizzi L, et al. Palmitoylethanolamide modulation of microglia activation: characterization of mechanisms of action and implication for its neuroprotective effects. *Int J Mol Sci*. 2021;22:3054.
161. Mattace Raso G, Russo R, Calignano A, Meli R. Palmitoylethanolamide in CNS health and disease. *Pharmacol Res*. 2014;86:32–41.
162. Fidaleo M, Fanelli F, Ceru MP, Moreno S. Neuroprotective properties of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) and its lipid ligands. *Curr Med Chem*. 2014;21:2803–21.
163. Lisboa SF, Vila-Verde C, Rosa J, Uliana DL, Stern CAJ, Bertoglio LJ, et al. Tempering aversive/traumatic memories with cannabinoids: a review of evidence from animal and human studies. *Psychopharmacology (Berl)*. 2019;236:201–26.
164. Wilkerson JL, Bilbrey JA, Felix JS, Makriyannis A, McMahon LR. Untapped endocannabinoid pharmacological targets: pipe dream or pipeline? *Pharmacol Biochem Behav*. 2021;206:173192.
165. Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*. 2009;89:309–80.
166. Busquets-Garcia A, Bains J, Marsicano G. CB $_1$ receptor signaling in the brain: extracting specificity from ubiquity. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43:4–20.
167. Kasatkina LA, Rittchen S, Sturm EM. Neuroprotective and immunomodulatory action of the endocannabinoid system under neuroinflammation. *Int J Mol Sci*. 2021;22:5431.
168. Lee SH, Ledri M, Tóth B, Marchionni I, Henstridge CM, Dudok B, et al. Multiple forms of endocannabinoid and endovanilloid signaling regulate the tonic control of GABA release. *J Neurosci*. 2015;35:10039–57.
169. Hill EL, Gallopin T, Férézou I, Cauli B, Rossier J, Schweitzer P, et al. Functional CB $_1$ receptors are broadly expressed in neocortical GABAergic and glutamatergic neurons. *J Neurophysiol*. 2007;97:2580–9.

170. Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, et al. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1074:514–36.
171. Stempel AV, Stumpf A, Zhang HY, Özdoğan T, Pannasch U, Theis AK, et al. Cannabinoid type 2 receptors mediate a cell type-specific plasticity in the hippocampus. *Neuron.* 2016;90:795–809.
172. Zhang HY, Gao M, Liu QR, Bi GH, Li X, Yang HJ, et al. Cannabinoid CB₂ receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:E5007–15.
173. Ishiguro H, Kibret BG, Horiuchi Y, Onaivi ES. Potential role of cannabinoid type 2 receptors in neuropsychiatric and neurodegenerative disorders. *Front Psychiatry.* 2022;13:828895.
174. deRoos-Cassini TA, Stollenwerk TM, Beatka M, Hillard CJ. Meet your stress management professionals: the endocannabinoids. *Trends Mol Med.* 2020;26:953–68.
175. Patel S, Hillard CJ. Adaptations in endocannabinoid signaling in response to repeated homotypic stress: a novel mechanism for stress habituation. *Eur J Neurosci.* 2008;27:2821–9.
176. Morena M, Patel S, Bains JS, Hill MN. Neurobiological interactions between stress and the endocannabinoid system. *Neuropsychopharmacology.* 2016;41:80–102.
177. Micale V, Drago F. Endocannabinoid system, stress and HPA axis. *Eur J Pharmacol.* 2018;834:230–9.
178. Hill MN, Patel S, Campolongo P, Tasker JG, Wotjak CT, Bains JS. Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. *J Neurosci.* 2010;30:14980–6.
179. Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10:397–409.
180. Xiang W, Shi R, Kang X, Zhang X, Chen P, Zhang L, et al. Monoacylglycerol lipase regulates cannabinoid receptor 2-dependent macrophage activation and cancer progression. *Nat Commun.* 2018;9:2574.
181. Espinosa-Riquer ZP, Ibarra-Sánchez A, Vibhushan S, Bratti M, Charles N, Blank U, et al. TLR4 receptor induces 2-AG-dependent tolerance to lipopolysaccharide and trafficking of CB2 receptor in mast cells. *J Immunol.* 2019;202:2360–71.
182. Ali AM, El-Tawil OS, Al-Mokaddem AK, Abd El-Rahman SS. Promoted inhibition of TLR4/miR-155/NF- κ B p65 signaling by cannabinoid receptor 2 agonist (AM1241), aborts inflammation and progress of hepatic fibrosis induced by thioacetamide. *Chem Biol Interact.* 2021;336:109398.
183. Lou ZY, Cheng J, Wang XR, Zhao YF, Gan J, Zhou GY, et al. The inhibition of CB₁ receptor accelerates the onset and development of EAE possibly by regulating microglia/macrophages polarization. *J Neuroimmunol.* 2018;317:37–44.
184. Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Cerù MP. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid x receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience.* 2004;123:131–45.
185. Domi E, Uhrig S, Soverchia L, Spanagel R, Hansson AC, Barbier E, et al. Genetic deletion of neuronal PPAR γ enhances the emotional response to acute stress and exacerbates anxiety: an effect reversed by rescue of amygdala PPAR γ function. *J Neurosci.* 2016;36:12611–23.
186. MacDowell KS, Sayd A, García-Bueno B, Caso JR, Madrigal JLM, Leza JC. Effects of the antipsychotic paliperidone on stress-induced changes in the endocannabinoid system in rat prefrontal cortex. *World J Biol Psychiatry.* 2017;18:457–70.
187. García-Bueno B, Madrigal JL, Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P, Leza JC. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation decreases neuroinflammation in brain after stress in rats. *Biol Psychiatry.* 2005;57:885–94.
188. Ying S, Xiao X, Chen T, Lou J. PPAR ligands function as suppressors that target biological actions of HMGB1. *PPAR Res.* 2016;2016:2612743.
189. Necela BM, Su W, Thompson EA. Toll-like receptor 4 mediates cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor γ and nuclear factor- κ B in macrophages. *Immunology.* 2008;125:344–58.

190. McCoy KL. Interaction between cannabinoid system and Toll-like receptors controls inflammation. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:5831315.
191. Kasatkina LA, Heinemann A, Hudz YA, Thomas D, Sturm EM. Stearoylethanolamide interferes with retrograde endocannabinoid signalling and supports the blood-brain barrier integrity under acute systemic inflammation. *Biochem Pharmacol.* 2020;174:113783.
192. Kelesidis T, Zhang Y, Tran E, Sosa G, Middlekauff HR. Expression of key inflammatory proteins is increased in immune cells from tobacco cigarette smokers but not electronic cigarette vapers: implications for atherosclerosis. *J Am Heart Assoc.* 2021;10:e019324.
193. O'Sullivan SE. An update on PPAR activation by cannabinoids. *Br J Pharmacol.* 2016;173:1899–910.
194. Haroon E, Daguanno AW, Woolwine BJ, Goldsmith DR, Baer WM, Wommack EC, et al. Antidepressant treatment resistance is associated with increased inflammatory markers in patients with major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology.* 2018;95:43–9.
195. Arteaga-Henríquez G, Simon MS, Burger B, Weidinger E, Wijkhuijs A, Arolt V, et al. Low-grade inflammation as a predictor of antidepressant and anti-inflammatory therapy response in MDD patients: a systematic review of the literature in combination with an analysis of experimental data collected in the EU-MOODINFLAME consortium. *Front Psychiatry.* 2019;10:458.
196. Hartmann A, Vila-Verde C, Guimarães FS, Joca SR, Lisboa SF. The NLRP3 inflammasome in stress response: another target for the promiscuous cannabidiol? *Curr Neuropharmacol.* 2022;[Epub ahead of print].

