

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

LAURA COLETE CUNHA

**Envolvimento do receptor do tipo toll 4 (TLR4) nas respostas  
comportamentais ao estresse**

RIBEIRÃO PRETO

2022

## **LAURA COLETE CUNHA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da USP como requisito  
básico para a Conclusão do Curso de  
Ciências Biomédicas com ênfase em  
Ciências Básicas da Saúde.

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

**RIBEIRÃO PRETO**

**2022**

LAURA COLETE CUNHA

**Envolvimento do receptor do tipo toll 4 (TLR4) nas respostas comportamentais ao estresse**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP como requisito básico para a conclusão do Curso de Ciências Biomédicas.

Data de aprovação: xx/07/2022

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. em Ciências Farmacêuticas

---

Prof. Dr. em Ciências Farmacêuticas

---

Profa. Dra. em Ciências Farmacêuticas

## **DEDICATÓRIA**

À minha família e aos meus amigos que nos momentos mais árduos me ajudaram a  
à manter a calma

## **AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas concedidas durante o desenvolvimento do projeto Iniciação Científica integrado ao Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) e pelo financiamento do projeto do qual este trabalho faz parte (Projeto Universal CNPq 420818/2018-9).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento das pesquisas desenvolvidas no laboratório (Processo 2017/19731-6).

## **AGRADECIMENTOS**

À toda equipe do laboratório de Neuropsicofarmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, especialmente à minha orientadora, Profa. Dra. Sabrina Francesca de Souza Lisboa, por se dedicar à minha educação científica. E as técnicas Miriam Cristina Contin e Flávia Salata pelo suporte técnico-científico.

À minha família, pelo apoio emocional e motivacional

Aos meus amigos, Vítor Luís Menzani, Fábio Coelho e Mariana Gallio Fronza, pelos conselhos e ajuda durante minha trajetória acadêmica

Às minhas amigas Dayane Malta e Stephanie Canavarro que sempre estiveram ao meu lado

A todos os professores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) e da Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) que contribuíram direta ou indiretamente para meu desenvolvimento e crescimento

“Conheci os limites da minha mente e do meu coração, e percebi como os dois são frágeis e como, em última análise, são incognoscíveis”

Kay Redfield Jamison

## RESUMO

Fatores neuroimunes estão implicados em distúrbios neuropsiquiátricos e podem estar envolvidos na gravidade dos sintomas e na resposta ao tratamento. A exposição ao estresse é capaz de causar neuroinflamação e remodelação neural, especialmente em áreas límbicas como a amígdala, córtex pré-frontal e o hipocampo, além de alterar a liberação de diversos neurotransmissores como o ácido gama-amino butírico (GABA), glutamato, e serotonina, sendo a micróglia um dos componentes que pode regular essas alterações. Em roedores, o estresse homotípico repetido (EHR) ativa a microglia e aumenta a expressão do receptor de reconhecimento de padrões do tipo toll 4 (TLR4) no cérebro. O TLR4 é expresso principalmente na micróglia e sua ativação induz a translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo implicando na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$ , enzimas induzíveis como a ciclooxygenase 2 e óxido nítrico sintase induzível, e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além disso, o EHR induz comportamentos do tipo depressivo e ansioso. TLR4 está implicado na resposta comportamental ao estresse em modelos animais, mas os dados ainda são inconclusivos. **Objetivos:** Portanto, o seguinte projeto teve como objetivo investigar se a via do TLR4 modula a resposta comportamental ao EHR. **Métodos:** Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética local (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-FCFRP/USP; CEUA número 19.1.731 .60.9). Camundongos machos C57Bl/6 (WT) e TLR4 knockout (8 semanas de idade) foram submetidos ao estresse de restrição por 10 dias, 2 horas por dia (9:00-11:00 da manhã). Um dia após o término do estresse, os animais foram submetidos ao Teste de Campo Aberto (TCA) seguido do Labirinto em Cruz Elevado (LCE). O teste da alimentação suprimida pela novidade (TASPN) foi realizado no dia seguinte, após 24h de privação alimentar. No último dia, os camundongos foram submetidos ao *Splash Test* seguido do Teste do nado forçado (TNF). Após o TNF todos os camundongos foram eutanasiados e tecidos cerebrais (hipocampo e córtex pré-frontal) foram coletados para análise posterior. Um protocolo similar foi utilizado para avaliar o efeito agudo do tratamento com TAK242, um inibidor do receptor TLR4, administrado 1h antes dos testes comportamentais. **Resultados:** O estresse de restrição de 10 dias

causou comportamento do tipo ansioso no TASPN, e tipo-depressivo no TNF. Os camundongos TLR4 KO não desenvolveram comportamento do tipo-depressivo no TNF em comparação com camundongos WT, demonstrando um fenótipo protetor nessa condição. Entretanto, esses animais apresentaram comportamento tipo-ansioso no TCA. Ainda, os animais TLR4 KO naïves não apresentaram ganho de peso ao longo do tempo, e o estresse, que também impede o ganho de peso nos animais WT, causou uma maior queda de peso nos animais TLR4 KO. O estresse promoveu aumento de pró-IL-1 $\beta$  no hipocampo, mas não dos demais fatores analisados. Os resultados com o TAK242 até o momento são inconclusivos, pois nos experimentos realizados não observamos efeito do estresse, o que pode ter sido mascarado pelo estresse da injeção. **Conclusões:** As alterações comportamentais induzidas pelo estresse de restrição são em parte mediadas por TLR4, uma vez que camundongos TLR4 KO não desenvolveram comportamento tipo depressivo induzido pelo estresse. São necessários ainda experimentos de biologia molecular para investigar fatores envolvidos neste mecanismo protetor. Ainda, alterações no protocolo e/ou via de administração são necessárias para avaliar se a inibição farmacológica da via do TLR4 com TAK242 promove as mesmas alterações no comportamento.

**Palavras chave:** Estresse, Neuroinflamação, TLR4, Comportamento.

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

"A inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 63<sup>a</sup> Sessão Extraordinária, realizada em 06/06/2022"

## ABSTRACT

Neuroimmune factors are implicated in neuropsychiatric disorders and may be involved in symptom severity and response to treatment. Exposure to stress is capable of causing neuroinflammation and neural remodeling, especially in limbic areas such as the amygdala, prefrontal cortex and hippocampus, in addition to altering the release of several neurotransmitters such as gamma-aminobutyric acid (GABA), glutamate, and serotonin, with microglia being one of the components that can regulate these changes. In rodents, homotypic repeated stress (HRS) activates microglia and increases toll-like pattern recognition receptor 4 (TLR4) expression in the brain. TLR4 is mainly expressed in microglia and its activation induces the translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus, resulting in the expression of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$ , inducible enzymes such as cyclooxygenase 2 and nitric oxide synthase, inducible, and reactive oxygen and nitrogen species. In addition, HRS induces depressive and anxious-like behaviors. TLR4 is implicated in the behavioral stress response in animal models, but data are still inconclusive. **Objectives:** Therefore, the following project aimed to investigate whether the TLR4 pathway modulates the behavioral response to the HRS. **Methods:** All procedures were approved by the local ethics committee (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-FCFRP/USP; CEUA number 19.1.731.60.9). Male C57Bl/6 (WT) and TLR4 knockout mice (8 weeks old) were subjected to stress restriction for 10 days, 2 hours a day (9:00-11:00 am). One day after the end of the stress, the animals were submitted to the Open Field Test (OFT) followed by the Elevated Plus Maze (EPM). The novelty-suppressed feeding test (NSFT) was performed the following day, after 24 hours of food deprivation. On the last day, the mice were submitted to the Splash Test followed by the Forced Swim Test (FST). After TNF, all mice were euthanized and brain tissues (hippocampus and prefrontal cortex) were collected for further analysis. A similar protocol was used to assess the acute effect of treatment with TAK242, a TLR4 receptor inhibitor, administered 1 h before behavioral tests. **Results:** The 10-day restraint stress caused anxiety-like behavior in NSFT, and depressive-like behavior in FST. TLR4 KO mice did not develop depressive-like behavior in TNF compared to WT mice,

demonstrating a protective phenotype in this condition. However, these animals showed anxiety-like behavior in OFT. Furthermore, naïve TLR4 KO animals did not show weight gain over time, and stress, which also prevents weight gain in WT animals, caused a greater weight drop in TLR4 KO animals. Stress promoted an increase in pro-IL-1 $\beta$  in the hippocampus, but not in the other factors analyzed. The results with TAK242 so far are inconclusive, as in the experiments carried out we did not observe an effect of stress, which may have been masked by the stress of the injection. **Conclusions:** Restriction stress-induced behavioral changes are in part mediated by TLR4, since TLR4KO mice did not develop stress-induced depressive-like behavior. Molecular biology experiments are still needed to investigate factors involved in this protective mechanism. Furthermore, changes in protocol and/or route of administration are necessary to assess whether pharmacological inhibition of the TLR4 pathway with TAK242 promotes the same changes in behavior.

**Key words:** Stress, Neuroinflammation, TLR4, Behavior.

## **LISTA DE FIGURAS**

Fig. 1: Delineamento experimental com animais TLR4 KO.

Fig. 2: Estresse promove redução de peso acentuada em animais TLR4 KO.

Fig. 3: Animais TLR4 KO apresentam hipolocomoção e comportamento tipo ansioso no Teste do campo aberto (TCA).

Fig. 4: Estresse não induz comportamento tipo-ansioso no labirinto em cruz elevado.

Fig. 5: Animais TLR4 KO não são protegidos do comportamento tipo-ansioso no Teste da alimentação suprimida pela novidade.

Fig. 6: Estresse não promove alterações no Splash Test.

Fig. 7: Animais TLR4 KO estão protegidos contra os efeitos deletérios do estresse no teste do nado forçado.

Fig. 8: Animais TLR4 KO tem dificuldade em ganhar peso, apesar de ingerirem alimentos como os WT.

Fig. 9: Efeito do estresse de restrição em camundongos WT e KO na expressão de genes relacionados à neuroinflamação.

Fig. 10: Efeito do estresse de restrição em camundongos WT e KO na expressão de componentes do inflamassoma NLRP3 no hipocampo.

Fig. 11: Efeito do estresse de restrição em camundongos WT e KO na expressão de enzimas de degradação do sistema ECB, no hipocampo.

Fig. 12. Delineamento experimental, experimento com TAK 242.

Fig. 13: Animais estressados têm déficit no ganho de peso.

Fig. 14: Estresse não promove efeitos no TCA.

Fig. 15: Tratamento com TAK242 não promove efeito no TASPN.

Fig. 16: Injeções possivelmente impedem o efeito tipo-depressivo do estresse no teste do nado forçado.

Fig. 17: Delineamento experimental de LPS em animais TLR4 KO.

Fig. 18. Animais WT tratados com LPS tem queda de peso, mas TLR4 KO não.

Fig. 19: LPS não induz variações na temperatura.

Fig. 20: LPS não induz alterações no TCA.

Fig. 21: LPS não induz comportamento tipo-depressivo

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SÍMBOLOS

2AG: 2 araquidonilglicerol

AEA: anandamida

AP-1: proteína adaptadora 1

ASPN: teste da alimentação suprimida pela novidade

ATP: adenosina trifosfato

ATV: área tegmental ventral

CB1: receptor cannabinoide 1

CB2: receptor cannabinoide 2

CPF: córtex pré-frontal

CPFm: córtex pré frontal medial

CUMS: Chronic unpredictable mild stress

DAGL $\alpha$ : diacilglicerol lipase alfa

DAGL $\beta$ : diacilglicerol lipase beta

DAMP's: padrões moleculares associados ao dano

DARPP32: *dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein-32*

ECBs: endocannabinoïdes

FAAH: hidrolase amida de ácido graxo

FCFRP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

GABA: ácido gama-amino butírico

HPA: eixo hipotálamo hipófise adrenal

HSP: heat shock protein

IL-12: interleucina 12

IL-1 $\beta$ : interleucina 1 $\beta$

IL-6: Interleucina 6

i.p: intraperitoneal

LC: Locus ceruleus

LCE: labirinto em cruz elevado

LPS: lipopolissacarideo

MAGL: monoacilglicerol lipase

MD2: proteína de diferenciação mielóide-2

MyD88: Fator 88 de diferenciação mielóide

Nac: núcleo accumbens

NF- $\kappa$ B: fator nuclear kappa b

NF: nado forçado

NLRP3: NLR family pyrin domain containing 3

RNS: espécies reativas de nitrogênio

NPV: núcleo paraventricular do hipotálamo

NTS: núcleo do trato solitário

PAMP's: padrões moleculares associados à patógenos

PPAR's: *peroxisome proliferator activated receptor*

ROS: espécies reativas de oxigênio

RRP: receptor de reconhecimento padrão

sECB: sistema endocannabinoide

SNC: sistema nervoso central

STAT: proteínas de transdução de sinal e de ativação de transcrição

TCA: teste do campo aberto

TIRAP: Proteína adaptadora contendo domínio de receptor toll/IL-1-TIR

TLR4 KO: knockout para TLR4

TLR4: receptor do tipo toll 4

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$

TRAM: molécula adaptadora relacionada ao TRIF

TRIF: proteína adaptadora contendo domínio TIR indutor de IFN- $\beta$

WT: *Wild-type*

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 1  |
| 1.1 Estresse.....   | 1  |
| 1.2 O receptor do tipo toll 4.....                                    | 2  |
| 1.3 Relação do TLR4 com estresse, neuroinflamação e comportamento...3 | 3  |
| 1.4 Sistema endocannabinoide e TLR4.....                              | 5  |
| 2. JUSTIFICATIVA.....   | 6  |
| 3. OBJETIVOS GERAIS.....  | 6  |
| 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 7  |
| 5. METODOLOGIA.....   | 8  |
| 5.1 Animais.....  | 8  |
| 5.2 Drogas.....   | 8  |
| 5.3 Estresse de restrição repetido.....                               | 8  |
| 5.3.1 Avaliação do peso durante o estresse.....                       | 8  |
| 5.4 Avaliação do comportamento dos animais TLR4 KO.....               | 9  |
| 5.5 Tratamento com TAK242.....  | 9  |
| 5.6 Teste de LPS.....   | 9  |
| 5.7 Testes comportamentais.....                                       | 10 |
| 5.7.1 Alimentação suprimida pela novidade (ASPN).....                 | 10 |
| 5.7.2 Labirinto em Cruz elevado (LCE).....                            | 10 |
| 5.7.3 Teste do nado forçado (NF).....                                 | 10 |
| 5.7.4 Teste do campo aberto (TCA).....                                | 11 |

|  |    |
|--|----|
| 5.7.5 Splash test.....   | 11 |
| 5.8 Análises moleculares e bioquímicas.....  | 11 |
| 5.8.1 Reação em Cadeia da polimerase por transcriptase reversa..                                 | 11 |
| 5.9 Análise de dados.....  | 11 |
| 6. RESULTADOS.....   | 12 |
| 6.1 Resultados comportamentais dos animais TLR4 KO<br>submetidos ao estresse homotípico.....     | 12 |
| 6.2 Resultados da expressão gênica dos animais<br>TLR4 KO submetidos ao estresse homotípico..... | 20 |
| 6.3 Resultados comportamentais dos animais<br>tratados com TAK242.....                           | 23 |
| 6.4 Resultados com o teste de LPS.....   | 26 |
| 7. DISCUSSÃO.....  | 30 |
| 8. CONCLUSÃO.....  | 34 |
| 9. REFERÊNCIAS.....  | 35 |

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Estresse

Hans Selye foi o primeiro a trazer o termo “estresse” para o dicionário médico, definindo-o como uma resposta não específica do corpo frente a demandas, isto é, aos estressores. Essa resposta inclui, nas observações de Selye, aumento das glândulas adrenais, atrofia linfática e úlceras pépticas (Tan & Yip , 2018). Essas respostas fazem parte da síndrome da adaptação geral, ou síndrome de Selye, em que, após um período de exposição crônica a um estressor, o corpo não consegue mais manter a homeostase, entrando em um período de exaustão (Tan & Yip , 2018). É desse processo que se originam as doenças. Os estressores em questão podem ser físicos, como infecções e hemorragias, ou psicológicos, como a exposição a estímulos aversivos ou a pistas relacionadas a predadores (Godoy et al, 2018).

O estresse ainda pode ser classificado como heterotípico, isto é, a combinação de diferentes estressores, ou homotípico, quando somente um tipo de estressor é utilizado. Diferentes respostas celulares podem ser observadas a depender do tipo de estressor, por exemplo, o estresse heterotípico é dito por alguns autores como capaz de provocar ativação microglial, mas isso não se trata de um consenso na literatura (Kreiselet al, 2013; Smith et al., 2016; Wohleb et al, 2018). Por outro lado, o estresse homotípico repetido já foi descrito diversas vezes como capaz de ativar a micróglia (Kopp et al, 2013; Lisboa et al, 2018; Banqueri et al, 2019; Weber et al, 2019; Wang, et al 2019; Liu et al, 2018) e difere da ativação provocada pelo dano neuronal (Kopp et al, 2013).

Atualmente sabe-se que cada tipo de estressor é capaz de ativar distintas redes neurais. Estressores físicos, por exemplo, induzem a ativação do núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV), núcleo do trato solitário (NTS) e Locus Ceruleus (LC). Estressores psicológicos podem ativar estas estruturas, mas também mobilizam componentes do sistema límbico, incluindo córtex pré-frontal (CPF), amígdala, hipocampo, área tegmental ventral (ATV) e núcleo accumbens (Nac). As conexões límbicas com o NPV são retransmitidas especialmente por neurônios GABAérgicos e o estresse crônico afeta esse circuito, resultando em maior excitabilidade do NPV, e consequentemente a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Godoy et al,

2018). Ademais, o estresse causa remodelação neural, especialmente em áreas límbicas como a amígdala, CPF e o hipocampo, além de alterar a liberação de diversos neurotransmissores como o ácido gama-amino butírico (GABA), glutamato, e serotonina (Walker et al, 2013).

Além dos neurônios, a micróglia é descrita como um dos componentes que pode regular alterações provocadas pelo estresse. Diversos estudos demonstram que a exposição ao estresse crônico induz expansão dos processos da micróglia, sendo que há um amplo espectro de ativação destas células. De modo geral pode-se classificar ativação microglial em dois tipos: a ativação clássica (M1) predominante no estresse crônico, em que há liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) e citocinas pró-inflamatórias; e a alternativa (M2), observada no estresse agudo, em que há um comportamento anti-inflamatório da micróglia, com reparo tecidual e maior atividade fagocítica (Cherry et al, 2014). Contudo, o espectro de ativação microglial é muito mais complexo que somente esses dois polos (Tan et al, 2020; Sankowski et al, 2022), os tipos de ativação microglial são mediados por alterações dinâmicas no microambiente neuronal que modulam a microglia através de sinalizações intracelulares desencadeadas por citocinas/quimiocinas, regulação da expressão gênica e principalmente, a interação com receptores de membrana.

## 1.2 O receptor do tipo toll 4

Um dos receptores associados à ativação microglial e à neuroinflamação é o receptor do tipo toll 4 (TLR4), expresso majoritariamente nas células da micróglia, e em menor extensão nos astrócitos e neurônios (Bsibsi et al, 2002; Mishra et al, 2006).

O TLR4 é um receptor de reconhecimento padrão (RRP) que reconhece padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's) como o Lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular de bactérias gram negativas, e padrões moleculares associados ao dano (DAMP's), como Adenosina trifosfato (ATP), Fibrinogênio e *Heat shock protein* 60 e 70 (HSP60 / HSP70) (García Bueno et al, 2016). A ativação do TLR4 leva à translocação ao núcleo do fator de transcrição fator nuclear kappa b (NF- $\kappa$ B) e, consequentemente, induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6) e a produção de ROS e NOS (García Bueno et al, 2016). A ativação de TLR4 atua em

um complexo junto com outro RRP, o CD14, e o co-receptor MD2 (proteína de diferenciação mieloide-2), que quando ativado é endocitado podendo ativar duas vias de sinalização: uma dependente de MyD88 (Fator 88 de diferenciação mieloide), em que participa a proteína adaptadora TIRAP (Proteína adaptadora contendo domínio de receptor toll/IL-1-TIR), e outra independente de MyD88, em que participam as proteínas TRIF (proteína adaptadora contendo domínio TIR indutor de IFN- $\beta$ ) e TRAM (molécula adaptadora relacionada ao TRIF). Tais cascatas de sinalização levam à ativação não só do NF- $\kappa$ B, como também do fator de transcrição AP-1 (proteína adaptadora 1) e de STAT (proteínas de transdução de sinal e de ativação de transcrição) (García Bueno et al, 2016), que também estão envolvidas em processos inflamatórios.

### **1.3 Relação do TLR4 com o estresse, neuroinflamação e comportamento**

O receptor TLR4 está associado a diversos transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia e a depressão (García Bueno et al, 2016). Em animais a modulação da via do TLR4 também promove alterações no comportamento. Gárate et al. (2014) demonstrou que o inibidor de TLR4, TAK-242, foi capaz de reduzir a neuroinflamação no CPF de ratos após exposição ao estresse de restrição agudo. Mais recentemente, Zhang et al (2020) observou que animais tratados com o inibidor de TLR4, TAK242, tiveram redução do comportamento de desamparo gerado pelo estresse de derrota social crônico, além de apresentarem redução da expressão do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no hipocampo; já os animais knockouts para TLR4 (TLR4 KO) tiveram o mesmo efeito, porém apresentavam comportamento do tipo-ansioso. Esse efeito ansiogênico em animais TLR4 KO já foi reportado anteriormente, tanto em machos quanto em fêmeas, no teste do campo aberto, teste claro-escuro, teste de interação social e labirinto em cruz elevado (Femenia et al, 2018). Contudo, Okun et al (2012) não reportou nenhum efeito ansiogênico no labirinto em cruz elevado em animais TLR4 KO. Por outro lado, esses animais apresentaram prejuízos no paradigma do medo condicionado ao contexto dentre outras alterações cognitivas (Okun et al, 2012). Portanto, o efeito da deleção do TLR4 ainda precisa ser melhor elucidado.

Além disso, camundongos selvagens submetidos ao estresse de restrição associado a estresse acústico (2 ou 4 dias/ 2h/dia) apresentam aumento na expressão de TLR4, de MD-2 e MyD88 no CPF medial (CPFM), mas isto não é observado em

animais TLR4-deficientes (Gárate et al, 2013). O tratamento com antibióticos também é capaz de atenuar esse aumento reduzindo os níveis de lipopolissacarídeo (LPS) sérico (Gárate et al, 2011, Gárate et al, 2013). Em outra modalidade de estresse, o estresse agudo de choque nas patas, Cheng et al (2016) demonstrou o aumento dos níveis IL-6, interleucina-12 (IL-12) e TNF- $\alpha$  no CPF e hipocampo, enquanto que os animais knockout para TLR4 não possuíam essa elevação nos níveis de citocinas, além de estarem protegidos contra o aumento dos níveis do inflamassoma NLRP3 (*NLR family pyrin domain containing 3*) e caspase-1, sendo resistentes ao desamparo aprendido. O Inflamassoma NLRP3 é primado pela ativação de TLR4, podendo ser posteriormente ativado por outros estímulos, como a ativação de receptores purinérgicos P2X7 por ATP, o que resulta na ativação da caspase-1 que converte a pro-IL-1 $\beta$  em sua forma ativa (Yang et al, 2019).

A administração de LPS é um modo de estimular a via do TLR4 diretamente. A administração de LPS tanto sistêmico quanto intraventricular leva ao *sickness behaviour* (comportamento doentio) e ao comportamento tipo-depressivo (Kreisel et al 2014), sugerindo, novamente, a atuação da via do TLR4 nas respostas ao estresse, no caso por estímulo inflamatório. Ademais, a super ativação da via do TLR4 está associada ao aumento do riscos de desenvolver transtorno depressivo maior, esquizofrenia e outros transtornos psiquiátricos (Gárate et al 2014; García Bueno et al, 2016; Pandey et al, 2014).

Nie et al (2018) avaliaram a interação social em animais duplo knockout para TLR2 e TLR4 submetidos ao estresse de derrota social repetido. A redução da expressão de TLR2 e TLR4 especificamente na micróglia do CPFm é capaz de reverter a redução da interação social induzida pelo estresse. Ademais, a redução da atividade neuronal, ativação microglial e atrofia dendrítica no CPFm após o estresse também dependem destes receptores (Nie et al., 2018). O comportamento de ansiedade, entretanto, não foi avaliado. Este trabalho de Nie é o primeiro com manipulação da expressão gênica especificamente na micróglia. Contudo, esses autores não testaram se apenas a deleção de TLR4 nas células da micróglia participaria nas respostas comportamentais e celulares promovidas pelo estresse, ou seja, se seria capaz de proteger contra as respostas comportamentais, como o comportamento tipo-ansioso, e celulares promovidas pelo estresse. Portanto, o papel de TLR4 nestas respostas

comportamentais e neuroimunes após estresse homotípico ainda não está completamente elucidado.

Em conjunto, esses dados indicam a participação essencial do TLR4 na resposta neuroinflamatória e comportamental desencadeada pelo estresse. Contudo, a vasta maioria dos trabalhos se utiliza de estressores heterotípicos, como o *Chronic unpredictable mild stress* (CUMS) (Martín-Hernández 2016; Lian et al 2017; Wang et al, 2018; Fu et al, 2019; Guo et al, 2019; Xu et al 2020), e poucos se utilizam de estressores homotípicos para avaliar o envolvimento do TLR4 sobre o comportamento (Gárate et al 2013; Cheng et al 2016; Nie et al, 2018; Zhang et al 2020). É possível que a depender do tipo de estressor aplicado existam diferenças referentes à adaptação ao estresse, às respostas neuro inflamatórias e do eixo HPA, desse modo é relevante estudar também os estressores homotípicos (Kopp et al, 2013; Costa-Ferreira et al, 2016)

#### **1.4 Sistema endocannabinoide e TLR4**

Existe também uma relação entre o sistema endocanabinóide (sECB) e o receptor TLR4 (McCoy, 2016), embora que ainda não seja muito bem esclarecida como se dá tal interação. O sECB é composto por neurotransmissores lipídicos (os ECBs), como a anandamida (AEA), 2-Araquidonilglicerol (2-AG) e o Palmitoiletanoamida (PEA), os receptores canabinóides (CB1 e CB2), além de enzimas catabólicas e anabólicas. A Diacilglicerol lipase  $\alpha$  e  $\beta$  (DAGL $\alpha$  e DAGL $\beta$ ) e a Monoacilglicerol lipase (MAGL) são responsáveis pela síntese e degradação do 2-AG, respectivamente. Já a Hidrolase amida de ácido graxo (FAAH) inativa tanto a AEA quanto o 2-AG (Lu & Mackie, 2021).

O sECB modula várias funções do sistema nervoso central, como a neuroplasticidade, o homeostase celular e a liberação de citocinas pela micróglia, além de ser sensível ao estresse (Morena et al, 2016). Apesar do receptor CB1 estar expresso majoritariamente no SNC (sistema nervoso central) e o receptor CB2 na periferia, o receptor CB2 também pode ser encontrado no SNC, pois é expresso na micróglia (Lisboa et al, 2016). Além disso, receptores CB2 podem ser encontrados em neurônios, com evidências de localização pós sináptica (Fuenzalida et al 2007). Além dos receptores CB1 e CB2 os ECBs podem atuar em receptores PPAR's (peroxisome

proliferator-activated receptors). No SNC o receptor PPAR $\gamma$  tem efeito neuroprotetor, aumentando a expressão de fatores anti-inflamatórios e reduzindo a expressão de fatores pró-inflamatórios através da inibição dos fatores de transcrição AP-1 e NFkB (Villapol, 2018).

O sECB pode modular a expressão dos receptores do tipo toll, assim como estímulos externos através dos receptores do tipo toll podem modular a expressão dos componentes do sECB (McCoy, 2016). Ademais, quando as células imunes estão ativas o sECB tem efeito imunossupressor, mas isso não acontece quando as células estão em repouso (McCoy, 2016)

Um estudo recente demonstrou que animais duplo knockout para TLR2/4 apresentavam uma redução da expressão de MAGL frente ao estresse em regiões subcorticais, contudo os níveis de ECBs não foram quantificados (Nie et al, 2019). Outro estudo demonstrou que a ativação do receptor CB2 antagoniza a sinalização de TLR4 em macrófagos (Xiang et al, 2018). Na microglia, *in vivo*, o LPS aumenta a expressão do receptor CB2, e em macrófagos aumenta os níveis de 2AG (McCoy et al, 2016). Desse modo é possível que a ativação do sECB pelo LPS seja um mecanismo de controle da resposta e que, pelo a ativação do receptor CB2 pelo 2-AG, ou outros ECBs, antagonize os efeitos do LPS em células imunes. Portanto, ainda há muito a ser estudado na relação do sECB, TLR4 e o estresse.

## 2. JUSTIFICATIVA

Determinados aspectos do TLR4 nas respostas comportamentais e neuroimunes após estresse homotípico ainda precisam ser investigados. Desse modo faz-se relevante esclarecer os mecanismos pelos quais a via do TLR4 atua, quais são as consequências comportamentais e como o estresse pode alterá-las. Dessa forma, estudar a influência do estresse sobre o desenvolvimento de consequências comportamentais, e o envolvimento da via do TLR4 tem o intuito de esclarecer mecanismos básicos sobre a etiologia de transtornos psiquiátricos associados ao estresse.

### **3. OBJETIVOS**

Avaliar respostas comportamentais após exposição a estresse homotípico repetido, e possível envolvimento da via do TLR4 nestas respostas.

### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o comportamento de animais TLR4 KO machos após estresse homotípico repetido.
- Avaliar o comportamento de animais selvagens tratados com o inibidor do TLR4, TAK242, após o estresse homotípico repetido.
- Avaliar a expressão gênica de receptores TLR4 no hipocampo após o estresse.
- Avaliar expressão gênica de HMGB1, Myd88, NLRP3, Caspase-1 e IL-1 $\beta$  no hipocampo
- Avaliar a expressão de genes relacionados ao sistema endocanabinóide, FAAH e MAGL, no hipocampo.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Animais

Camundongos machos C57Bl/6 (WT- wild type) provenientes do Biotério Central do Campus da USP Ribeirão Preto e camundongos TLR4 KO provenientes do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto(FMRP/USP); Após a chegada ao biotério da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), todos os animais serão mantidos no biotério do laboratório por 2 a 3 semanas em grupos de 2-3 animais por caixa até atingirem cerca de 8 semanas, quando serão utilizados nos experimentos. Os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da FCFRP nº 19.1.731 .60.9.

### 5.2 Drogas

O inibidor do TLR4, TAK242, (MCE MedChemExpress), foi dissolvido em solução de salina e 5% DMSO. Os animais foram tratados 1h antes dos testes comportamentais via intraperitoneal ( i.p) na dose de 10mg/kg/10 ml.

O Lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS; Serotipo O127:B8; Sigma-Aldrich) foi dissolvido em salina e administrado na dose de 1mg/kg/10 ml pela via i.p. Os animais foram tratados e a temperatura e peso corporal foram avaliados 6h e 24h após a administração de droga ou veículo, o comportamento foi avaliado 24h após o tratamento.

### 5.3 Estresse de restrição repetido

Os animais foram colocados individualmente em tubos cônicos tipo falcon (50 ml), nos quais foram feitos pequenos furos para permitir a ventilação, para restrição dos movimentos. Os animais serão submetidos ao estresse de restrição por um período de 10 dias, 2h/dia, das 9h às 11h. O modelo realizado é uma modificação de protocolos descritos na literatura (Patel, et al 2009; Sadler, et al 2016). O estresse resulta em comportamento ansiogênico e ativação de mecanismos neuroimune, importantes para o presente estudo. Os grupos de camundongos controle serão alojados nas mesmas condições e serão manipulados diariamente durante o período

do estresse. Todos os animais, incluindo os animais naïves, foram mantidos aos pares ou trios ao término do estresse até o final da avaliação comportamental.

### **5.3.1 Avaliação do peso durante o estresse**

A variação de peso foi calculada considerando-se o peso basal de cada animal como sendo igual a 0, os animais foram pesados no 1°, 4°, 7° e 10° dia do protocolo de estresse.

### **5.4 Avaliação do comportamento dos animais TLR4 KO**

Camundongos machos C57Bl/6 (WT) e TLR4 KO de 8 semanas de idade foram submetidos ao estresse de restrição por 10 dias, 2h por dia (9:00-11:00 da manhã). Um dia após o término do estresse, os animais foram submetidos ao Teste de Campo Aberto seguido do Labirinto em Cruz Elevado (LCE). O teste da alimentação suprimida pela novidade (ASNP) foi realizado no dia seguinte, após 24h de privação alimentar. No último dia, os camundongos foram submetidos ao *Splash Test* seguido do teste do nado forçado. Após o nado forçado todos os camundongos foram eutanasiados e tecidos cerebrais (hipocampo e córtex pré-frontal) foram coletados para análise posterior.

### **5.5 Experimentos envolvendo tratamento com TAK242**

Os animais foram colocados individualmente em tubos cônicos tipo falcon conforme descrito no item 5.3. Após o término do estresse, os animais ficaram em restrição alimentar para que no dia seguinte fosse realizado o teste ASPN. No 13° dia foi realizado o teste do campo aberto e teste do nado forçado, em seguida os animais foram eutanasiados e as estruturas encefálicas coletadas. 1h antes dos testes comportamentais os animais receberam via i.p TAK242, os grupos de camundongos controle receberam veículo.

### **5.6 Teste de LPS**

Os animais passaram por testes comportamentais basais, sendo eles o teste do campo aberto e nado forçado, e no dia seguinte foram tratados com 1mg/kg de LPS ou salina, a temperatura e peso corporal foram avaliados 6h e 24h após a administração de droga ou veículo. A temperatura foi avaliada com o uso de uma câmera que detecta infravermelho, 3 fotos foram tiradas de cada animal e a temperatura resultante é a média dessas 3 fotos. O comportamento foi avaliado 24h após a administração do LPS ou veículo, com o teste do campo aberto e nado forçado.

## **5.7 Testes comportamentais:**

### **5.7.1 Alimentação suprimida pela novidade (ASPN)**

É um paradigma para avaliar o efeito do tratamento crônico com antidepressivos (Santarelli et al, 2003) e comportamento tipo-ansioso. Os animais permanecem sem ração por 24h, no momento do teste são colocados em uma caixa grande (30cm x 37cm x 15cm) em que está posicionado centralmente um único pellet de comida sobre uma plataforma, o pellet é focalmente iluminado por uma luminária e as luzes da sala permanecem apagadas, somente uma luz vermelha é utilizada para a visualização do teste, os camundongos não são capazes de perceber esta luz. O tempo de latência para comer foi quantificado, o animal deve morder o pellet, cheirar ou explorar não é considerado. Se em 10 min o animal não comer, o teste é encerrado e registra-se que o tempo de latência foi de 10 min. Em seguida, o animal é retornado à sua caixa-casa e se quantifica a latência para iniciar o comportamento de alimentação. Se após 5 min o animal não comer o teste é encerrado e se registra que o tempo de latência foi de 5 min.

### **5.7.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)**

Para avaliar o comportamento tipo-ansioso na manhã seguinte ao término do estresse. Será realizado conforme descrito por Lisboa e colaboradores (Lisboa et al. 2018a, 2018b). O comportamento será registrado pelo software AnyMaze durante 5 min. Serão utilizados como parâmetros as porcentagens de tempo e entrada nos braços abertos, bem como o número de entradas nos braços fechados. A maior exploração dos braços abertos, sem aumentar a exploração dos braços fechados, é um indicativo de efeito do tipo-ansiolítico.

### **5.7.3 Teste do nado forçado (NF)**

É um modelo preditivo de drogas antidepressivas e de comportamento tipo-depressivo. Será realizado imediatamente após o término da avaliação comportamental no LCE, conforme descrito por Lisboa e colaboradores Lisboa et al., 2018b). Os animais serão colocados em um cilindro de vidro (altura 25cm, diâmetro 17cm) com água (10cm de altura; 23–25 ° C) e forçados a nadar durante a sessão de testes de 6min (situação inescapável). O teste será registrado por uma câmera durante 6 min e posteriormente o tempo de imobilidade e o tempo de natação serão registrados manualmente por um

experimentador que desconhece as informações sobre o animal, de forma a ter uma avaliação não tendenciosa. A água será trocada após cada teste.

#### **5.7.4 Teste do Campo Aberto (TCA)**

Esse teste visa avaliar a atividade locomotora dos animais, e a relação entre centro e periferia serve como uma medida de comportamento tipo-ansioso, animais com este comportamento tendem a permanecer menos tempo no centro do aparato, uma arena redonda com 30cm de diâmetro delimitada por uma barreira acrílica. A distância percorrida no teste será mensurada pelo Software Anymaze durante 5 min.

#### **5.7.5 Splash Test**

O comportamento é registrado por um câmera durante 6 min após pincelar uma solução de água e 10% sacarose no dorso do animal. Será analisado o tempo de latência, isto é, o tempo para o primeiro comportamento de “lambida” ou “auto-limpeza” (limpeza/lambida), e o tempo total de lambida após o primeiro minuto de teste. Animais com comportamento anedónico, tipo-depressivo, tendem a se limpar menos.

### **5.8 Análises moleculares e bioquímicas**

- Dissecção de estruturas encefálicas logo após análises comportamentais.

#### **5.8.1 Reação em Cadeia da polimerase por transcriptase reversa**

- O RNA das amostras de hipocampo foi isolado através do método de Trizol para realizar o qPCR (*quantitative real time polymerase chain reaction*) de genes de interesse (HMGB1, TLR4, Myd88, NLRP3, caspase 1, IL-1 $\beta$ , FAAH, MAGL). cDNA foi sintetizado utilizando o protocolo da Hi Cap RT PCR (ThermoFisher), a partir de 2  $\mu$ g de RNA. As alterações nos níveis de mRNA foram determinadas pelo sistema de PCR em tempo real, Step One (ThermoFisher), usando o ensaio de expressão gênica qPCRBIQ probe mix Hi-Rox (Cat. No. PB20.22-05) usando 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 (WT). Os primers utilizados foram: HMGB1 (Mm00849805\_gH) TLR4 (Mm00445273\_m1), Myd88 (Mm00440338\_m1), NLRP3 (Mm00840904\_m1), caspase-1 (Mm00438023\_m1), IL-1 $\beta$  (Mm00434228\_m1), FAAH (Mm00515684\_m1), MAGL(Mm00449274\_m1).

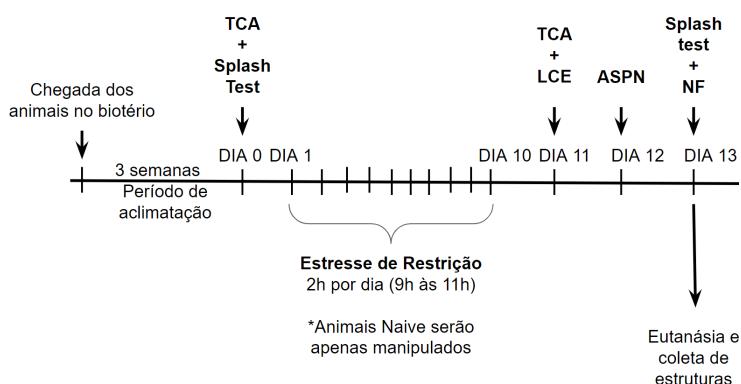
### **5.9 Análise de dados**

O n amostral para os experimentos foi calculado através do software G-Power e os dados foram analisados através do software Graph Prism 7. Os experimentos com dois grupos experimentais foram analisados por teste T de *Student*, não pareado. Nos experimentos onde há os fatores genótipo (WT e KO) e condição (naive e estressado); ou genótipo (WT e KO) e tratamento (veículo e TAK242; veículo e LPS), ou ainda grupo experimental e tempo, foi utilizado o teste de Two-way ANOVA, com pós teste de Tukey. Nos experimentos para avaliação do peso ao longo do tempo, foi realizado o teste de Two-way ANOVA, sendo o tempo a medida repetida e o grupo experimental o fator (naive ou estressado + tratamento; WT ou KO + tratamento). O teste de Grubbs foi utilizado para remover outliers das análises. Todos os dados são apresentados como média +- erro padrão da média (EPM). O nível de significância estatística adotado foi de 95% ( $p \leq 0.05$ ). Valores entre 0.6 e 0.1 foram considerados como tendência.

## 6. RESULTADOS

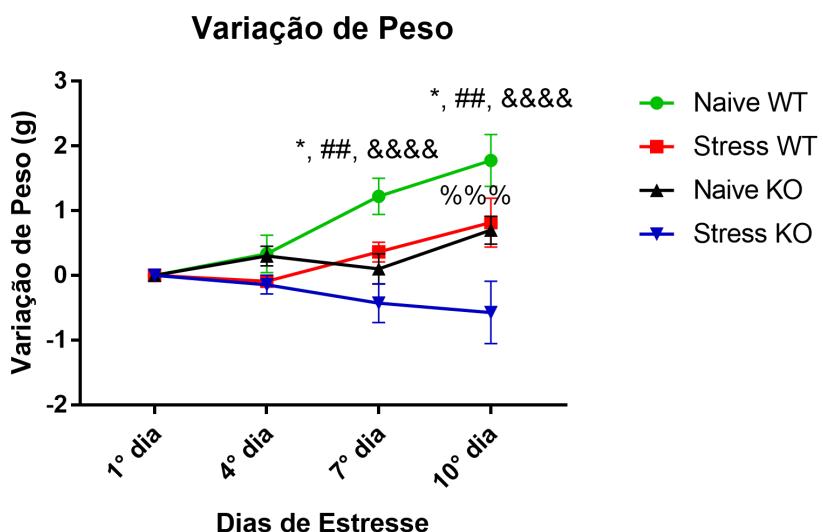
### 6.1 Resultados comportamentais dos animais TLR4 KO submetidos ao estresse homotípico.

Com o intuito de avaliar a influência da deleção de TLR4 na resposta comportamental ao estresse foi adotado o delineamento experimental que está demonstrado na Figura 1.



**Fig. 1: Delineamento experimental com animais TLR4 KO.** TCA: teste do campo aberto. LCE; labirinto em cruz elevado. ASPN; teste da alimentação suprimida pela novidade. NF; nado forçado.

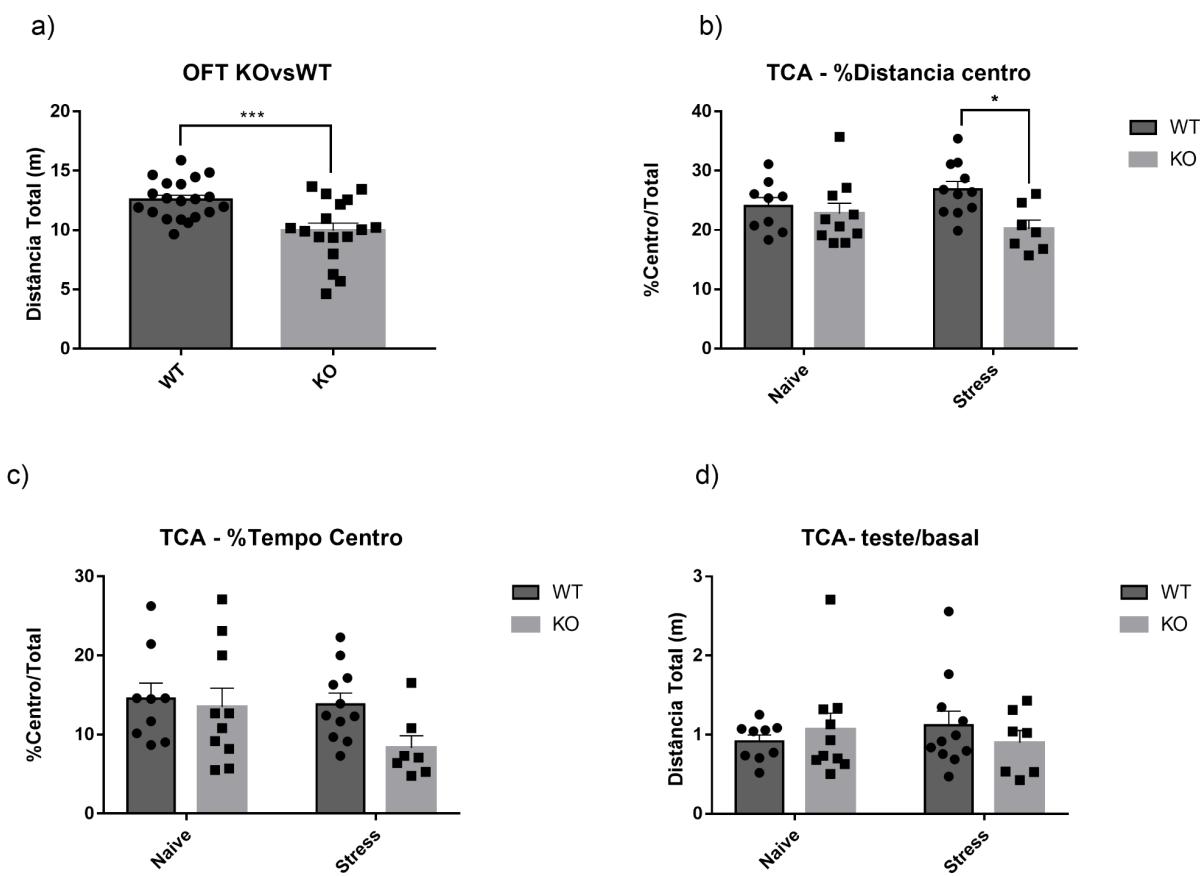
Nesse sentido, a variação de peso foi calculada considerando-se o peso basal de cada animal como sendo igual a 0. O teste de two-way ANOVA indicou efeito do tempo ( $F_{3,99}= 9,27$ ,  $p<0,0001$ ) e do grupo experimental ( $F_{3,33}=6,70$ ,  $p<0,0001$ ), além de interação entre os fatores ( $F_{9,99}=4,83$ ,  $p<0,0001$ ). Enquanto os animais Naive WT ganharam peso de modo crescente, os animais WT estressados perderam peso a partir do 7º dia do estresse ( $p=0,042$ , Tukey). Essa dificuldade em ganhar peso se mantém até o 10º dia de estresse ( $p=0,018$ , Tukey) (fig 2). Os animais TLR4 KO, tanto naive ( $p=0,005$ , Tukey) quanto estressados ( $p<0,0001$ , Tukey), também apresentaram dificuldade no ganho de peso em relação aos animais Naive WT a partir do 7º dia de estresse. O estresse nos animais TLR4 KO ainda causou uma maior dificuldade de ganho de peso em relação aos animais estressados WT no 10º dia ( $p=0,0025$ , Tukey) (fig 2), isso indica uma maior sensibilidade ao estresse em relação ao peso.



**Fig. 2: Estresse promove redução de peso acentuada em animais TLR4 KO.** Ao analisar a variação de peso, considerando o peso basal de cada animal como igual a 0, observamos que os animais Naive WT ganham peso ao longo do tempo, enquanto que os animais Naive KO e estressados não. Ademais, a perda de peso é mais nos animais estressados KO que nos estressados WT. \* $p<0,05$ , Naive WT vs Stress WT. ##  $p<0,01$  Naive WT vs Naive KO. &&&  $p<0,0001$  Naive WT vs Stress KO. %%% $p<0,001$  Stress WT vs Stress KO. Os dados são apresentados como média +- EPM.

No TCA foi observado que os animais KO, em suas medidas basais, já apresentam hipolocomoção significativa ( $p<0,0008$ , teste T) (fig. 3a), mas não há diferenças na porcentagem de distância e tempo no centro nas medidas basais (não mostrado). Em

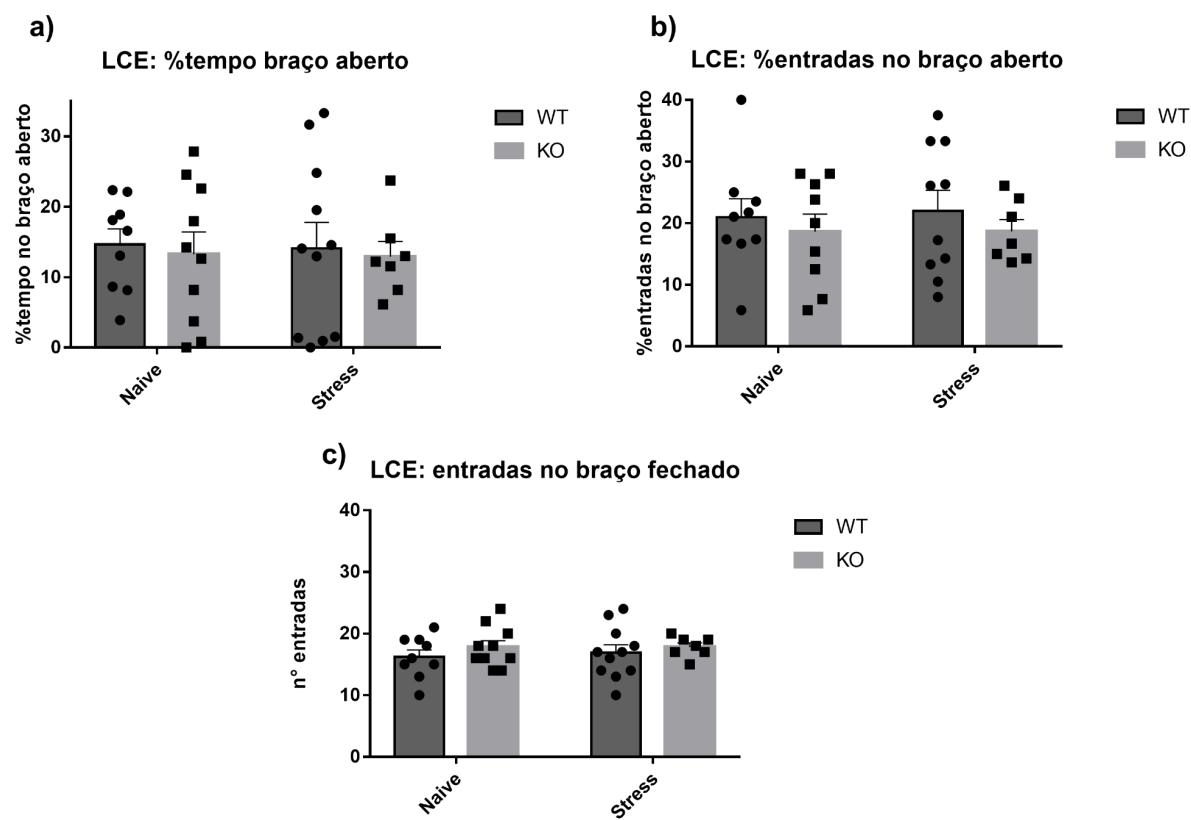
relação a porcentagem de distância percorrida no centro do aparato foi constatado efeito no genótipo ( $F_{1,33}=6,54, p=0,015$ ), mas não da condição ( $F_{1,33}=0,005, p=0,95$ ), e tendência na interação ( $F_{1,33}=3,03, p=0,09$ ). Houve redução porcentagem da distância no centro do aparato dos animais Stress KO em relação aos Stress WT ( $p=0,027$ , Tukey) (fig 3b) indicando um comportamento tipo-ansioso apenas nos KO. Em relação ao tempo no centro, houve tendência do efeito do genótipo ( $F_{1,33}=2,926, p=0,097$ ), mas sem efeito da condição ( $F_{1,33}=2,36, p=0,13$ ) ou interação ( $F_{1,33}=1,344, p=0,25$ ) (fig 3c). Na relação entre a distância total percorrida no teste dividida pelo basal não houve efeito na condição ( $F_{1,33}=0,0098, p=0,92$ ), genótipo ( $F_{1,33}=0,04, p=0,85$ ) ou interação ( $F_{1,33}=1,17, p=0,29$ ) (fig 3d).



**Fig. 3: Animais TLR4 KO apresentam hipolocomoção e comportamento tipo-ansioso no Teste do Campo Aberto (TCA).** (a) Os animais TLR4 KO apresentam hipolocomoção basal. (b) Animais estressados KO apresentam menor porcentagem de distância em relação aos estressados WT. (c) Porcentagem de tempo no centro do aparato. (d) a relação teste/basal da distância total percorrida não

foi alterada. \* $p<0,05$ , teste de Tukey. Os dados são apresentados como média +- EPM.

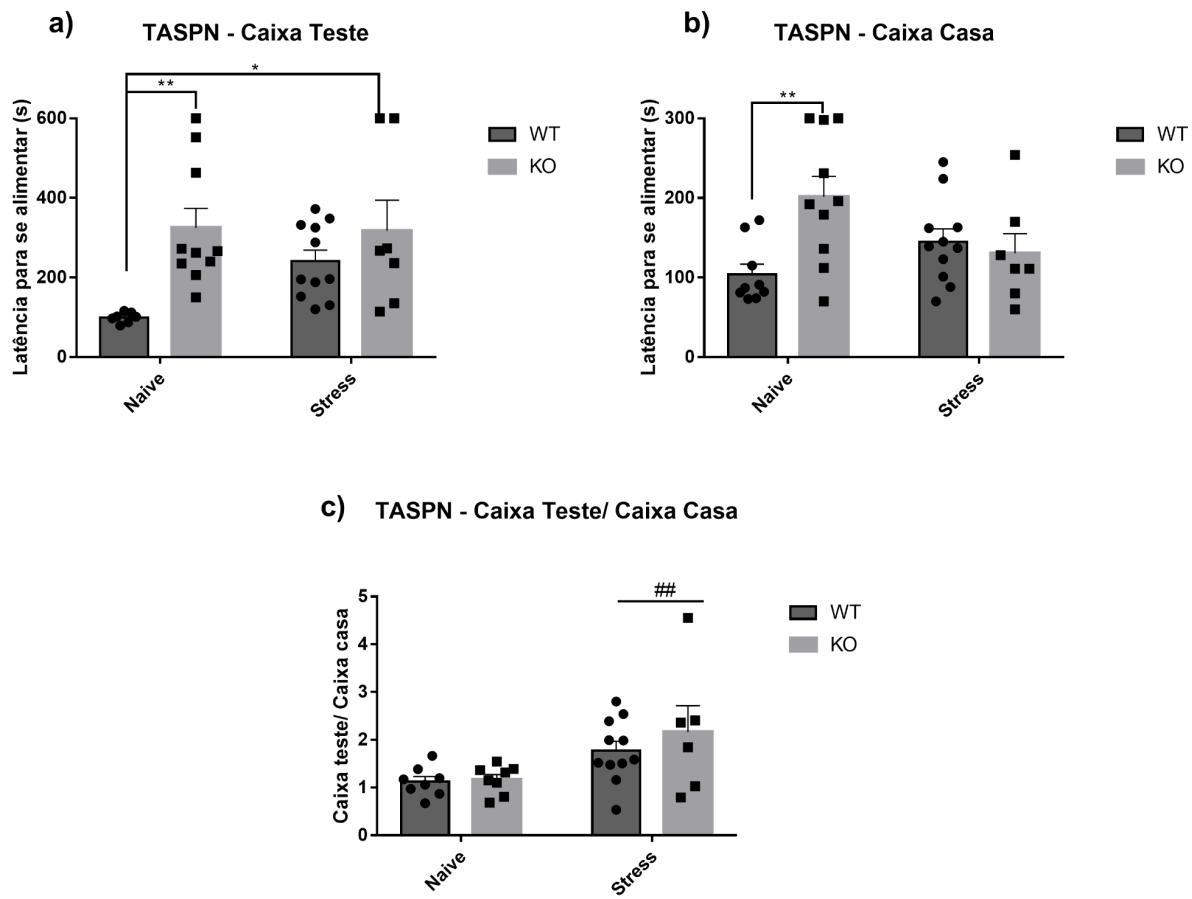
No LCE não houve efeito da condição ( $F_{1,31}=0,033$ ,  $p=0,86$ ), nem do fator genótipo ( $F_{1,31}=0,88$ ,  $p=0,35$ ), ou interação ( $F_{1,31}=0,026$ ,  $p=0,87$ ). Também não houve alteração na condição ( $F_{1,33}=0,17$ ,  $p=0,69$ ), genótipo ( $F_{1,33}=0,17$ ,  $p=0,69$ ) ou interação ( $F_{1,33}=0,001$ ,  $p=0,97$ ) na porcentagem de tempo no braço aberto (fig 4a). Também não há alterações da condição ( $F_{1,33}=0,11$ ,  $p=0,75$ ), genótipo ( $F_{1,33}=1,13$ ,  $p=0,28$ ), ou interação ( $F_{1,33}=0,076$ ,  $p=0,79$ ) referente ao número de entradas no braço fechado (fig 4c).



**Fig. 4: Estresse não induz comportamento tipo-ansioso no Labirinto em cruz elevado.** (a) Não há diferença estatística entre grupos na porcentagem de tempo e (b) de entradas no braço aberto. (c) Também não há diferença no número de entradas no braço fechado. Os dados são apresentados como média +- EPM.

No teste da ASPN, avaliando a latência para se alimentar na caixa teste, houve efeito do genótipo ( $F_{1,31}=10,82$ ,  $p=0,002$ ), mas não da condição ( $F_{1,31}=2,14$ ,  $p=0,15$ ) ou

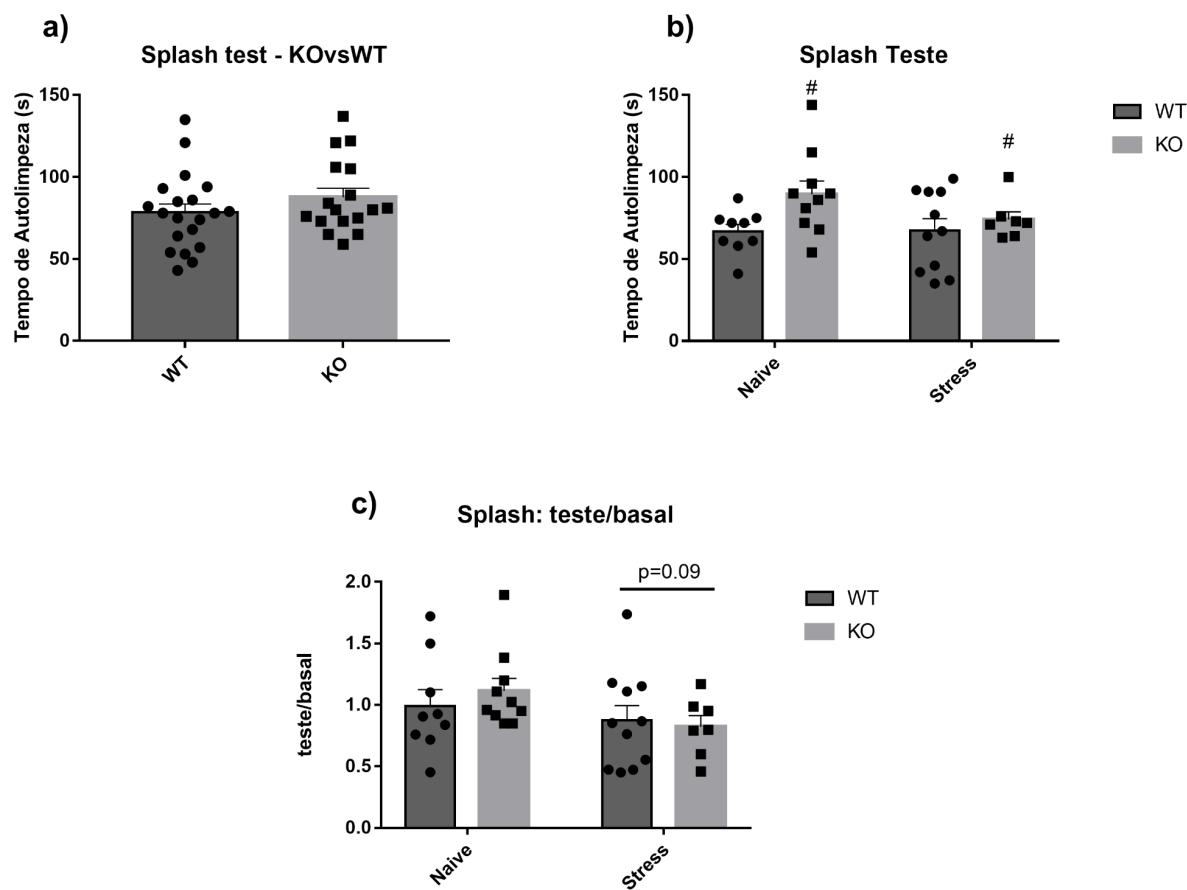
interação entre os fatores ( $F_{1,31}=2,59$ ,  $p=0,12$ ). Os animais Naive KO ( $p=0,009$ , Tukey) e estressados KO ( $p=0,022$ , Tukey) apresentaram um tempo de latência maior na caixa teste quando comparados aos Naive WT (fig 5a), indicando que os KO por si já apresentam um comportamento alterado antes do estresse. Na caixa casa os animais naive KO também tem maior latência para se alimentar em relação aos Naive WT ( $p=0,0083$ , Tukey), e houve interação entre fatores ( $F_{1,33}=7,43$ ,  $p=0,010$ ) e tendência do fator genótipo ( $F_{1,33}=4,06$ ,  $p=0,05$ ), mas não efeito da condição ( $F_{1,33}=0,53$ ,  $p=0,47$ ) (fig 5b), o que indica que talvez o drive para ingestão alimentar seja diferente. Por isso, analisamos por 10 dias a ingestão de alimentos dos animais TLR4 KO em um experimento independente (ver fig 8), visto que os animais Naive KO também não ganham peso como os animais Naive WT. Fazendo a razão entre caixa teste e caixa casa foi observado efeito da condição ( $F_{1,29}=10,54$ ,  $p=0,0029$ ), mas não do genótipo ( $F_{1,29}=0,7464$ ,  $p=0,3947$ ) ou interação ( $F_{1,29}=0,4697$ ,  $p=0,4986$ ), mostrando apenas efeito ansiogênico do estresse e que a ausência do TLR4 não interferiu neste comportamento (fig 5c).



**Fig 5. Animais TLR4 KO não são protegidos do comportamento tipo-ansioso no Teste da alimentação suprimida pela novidade.** (a) Latência na caixa teste é maior nos animais KO naive e KO estresse em relação aos animais naive WT. (b) Latência na caixa casa é maior nos animais naive KO, indicando alterações no apetite. (c) A razão caixa teste/casa é maior nos animais estressados, indicando efeito ansiogênico independente do genótipo, 4 outliers foram removidos pelo método de Grubbs. \*p<0,05, teste de Tukey, \*\*p<0,01 teste de Tukey, ##p<0,01, efeito da condição 2-way ANOVA. Os dados são apresentados como média +- EPM.

Não há diferenças entre animais KO e WT referente ao tempo de autolimpeza basal no *splash test* ( $p=0,23$ , Teste T) (fig 6 a). Entretanto, no tempo de autolimpeza após o estresse, ou seja, na segunda vez que os animais passam pelo teste houve efeito do genótipo ( $F_{1,33}=4,65$ ,  $p=0,04$ ), mas não interação entre fatores ( $F_{1,33}=1,366$ ,  $p=0,2510$ ), ou da condição ( $F_{1,33}=1,73$ ,  $p=0,29$ ) (fig 6b), indicando que os animais KO fazem mais autolimpeza independente de terem sido ou não estressados. Na relação entre medida de autolimpeza no teste em relação ao basal, há tendência de efeito da

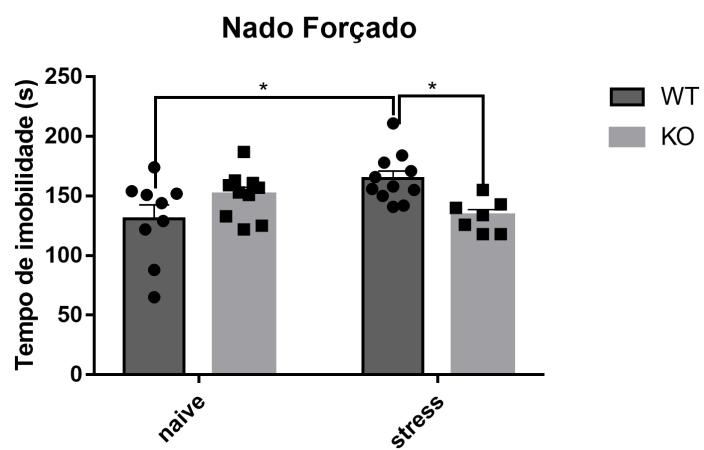
condição ( $F_{1,33}=3,01$ ,  $p=0,09$ ), mas sem efeito do genótipo ( $F_{1,33}=0,09$ ,  $p=0,77$ ) ou interação ( $F_{1,33}=0,55$ ,  $p=0,46$ ) (fig 6c), sugerindo que o estresse reduz o tempo de autolimpeza, sem interferência do genótipo.



**Fig. 6: Estresse não promove alterações no Splash Test.** (a) Tempo de autolimpeza dos animais antes do início do procedimento experimental, na medida basal. (b) Tempo de autolimpeza após o estresse, no teste. Houve apenas efeito do genótipo ( $\#p<0,05$ , efeito do genótipo 2-way ANOVA), indicando que os animais KO se limpam mais do que os WT, independente de serem naives ou estressados. (c) Razão do tempo de autolimpeza no teste em relação à medida basal com a tendência do efeito da condição ( $p=0,09$ , efeito da condição 2-way ANOVA), sugere-se que o estresse reduz o tempo de autolimpeza, sem interferência do genótipo. Os dados são apresentados como média +- EPM.

No teste do NF, não houve efeito da condição ( $F_{1,33}=1,032$ ,  $p=0,32$ ) ou genótipo ( $F_{1,33}=0,5019$ ,  $p=0,48$ ), mas houve interação entre os fatores ( $F_{1,33}=10,57$ ,  $p=0,003$ ). O estresse aumentou o tempo de imobilidade em relação aos animais Naive WT ( $p=0,02$ , Tukey). Ainda, houve efeito protetor do genótipo frente ao estresse, visto que

os animais estressados KO não tiveram o aumento da imobilidade em relação aos animais KO naïves ( $p>0,05$ ) como foi observado nos animais WT, e os KO estressados tiveram menor imobilidade do que os WT estressados ( $p=0,05$ , Tukey). (fig 7).

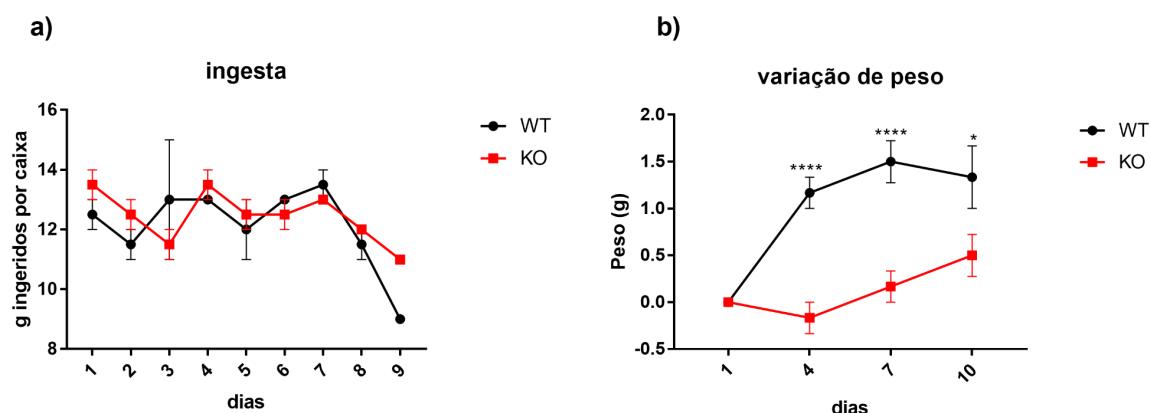


**Fig. 7: Animais TLR4 KO estão protegidos contra os efeitos deletérios do estresse no teste do nado forçado.** Animais WT estressados apresentam aumento no tempo de imobilidade em relação aos animais WT naïves (\* $p<0,05$ , teste de Tukey). Animais estressados KO apresentam tempo de imobilidade reduzido em comparação a animais estressados WT (\* $p<0,05$ , teste de Tukey) indicando um efeito protetor do genótipo TLR4 KO. Os dados são apresentados como média +- EPM.

Desse modo, podemos concluir que embora o estresse utilizado não tenha induzido comportamento tipo ansioso nos animais WT em todos os testes, induziu comportamento tipo depressivo no teste do NF nestes animais. Embora os animais TLR4 KO tenham uma proteção contra o desenvolvimento do comportamento tipo-depressivo, os mesmos se mostram sensíveis ao comportamento tipo-ansioso. Assim, a ausência do TLR4 facilitou a ocorrência do comportamento tipo-ansioso. Nas próximas seções prosseguiremos com o mesmo protocolo de estresse para avaliar o impacto do inibidor de TLR4, TAK242, no comportamento tipo-depressivo dos animais WT.

Como supôs-se que o *drive* para ingestão de alimentos seja diferente entre animais KO e WT, analisamos por 10 dias a ingestão de alimentos dos animais em um experimento independente, em que ingestão de comida de cada caixa é resultado da ingestão alimentar de 3 animais, assim como nos experimentos anteriores em que os animais

eram mantidos em grupos de 3 por caixa (ver fig 8). Não houve diferença na ingestão de alimentos entre animais WT e KO no teste 2-way ANOVA, isto é, não houve efeito da condição ( $F_{1,2}=0,9$ ,  $p=0,4429$ ) ou interação ( $F_{8,16}=1,33$ ,  $p=0,2975$ ). Entretanto, houve efeito do tempo ( $F_{8,16}=5,122$ ,  $p=0,0027$ ). No peso corporal, houve efeito da condição ( $F_{1,10}=27,22$ ,  $p=0,0004$ ), como já demonstrado anteriormente, tempo ( $F_{3,30}=11,41$ ,  $p<0,0001$ ) e interação entre fatores ( $F_{3,30}=6,527$ ,  $p=0,0016$ ). Os animais KO não ganham peso como os WT, apresentando diferença na variação de peso até o 10º dia ( $p=0,0152$ , Sidak). Assim, pode-se hipotetizar que a dificuldade em ganhar peso do animais TLR4 KO machos está relacionada com as funções metabólicas do receptor TLR4 e sua influência no armazenamento de gordura (McKernan, et al 2020), pois não há diferença na ingestão de alimento. Existem, entretanto, evidências de que animais TLR4 KO ingerem menos alimentos hipercalóricos (Camandola & Mattson, 2017).

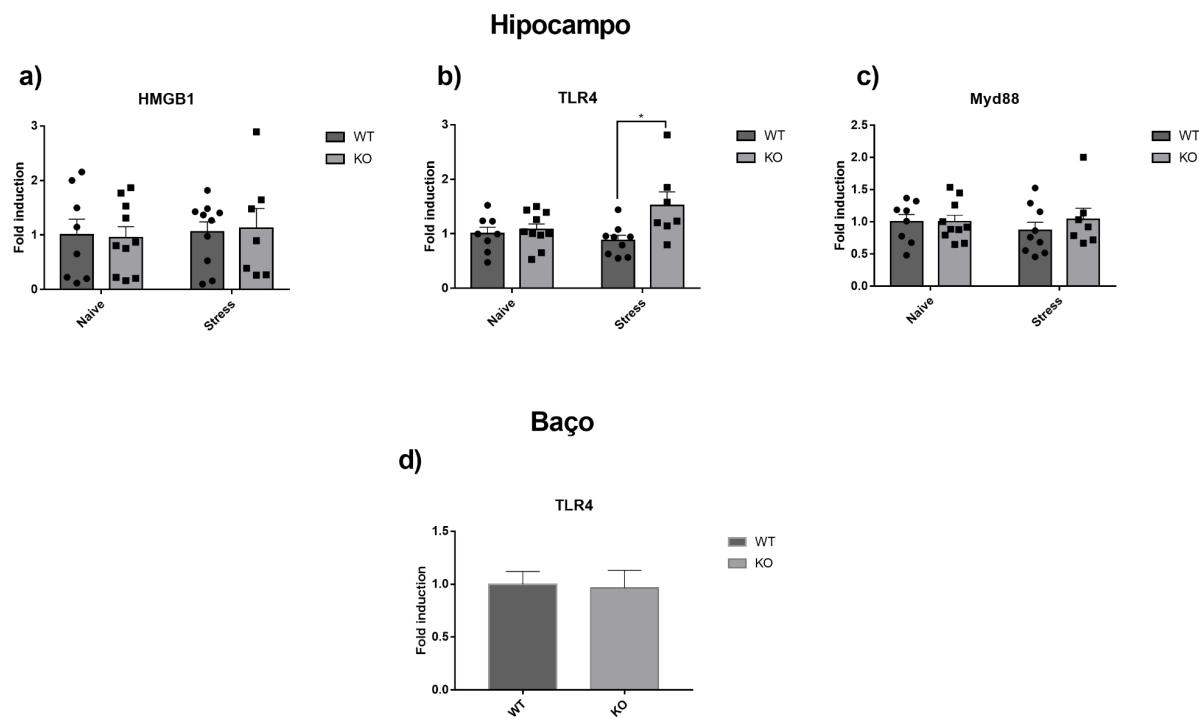


**Fig. 8: Animais TLR4 KO tem dificuldade em ganhar peso, apesar de ingerirem alimentos como os WT.** (a) ingestão em gramas de ração ingerida por dia, durante 10 dias. (b) Variação de peso, considerando o dia 1 como igual a 0, animais KO apresentam dificuldade em ganhar peso. \*\*\*p<0,0001, teste de Tukey. \*p<0,05, teste de Tukey. Os dados são apresentados como média +/- EPM.

## 6.2 Resultados da expressão gênica dos animais TLR4 KO submetidos ao estresse homotípico.

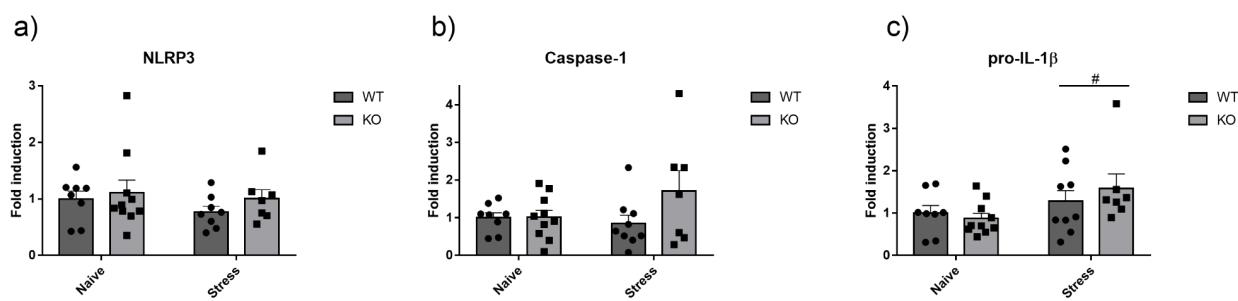
Na expressão de HMGB1, um DAMP que se liga ao TLR4, não houve efeito do genótipo ( $F_{1,31}=0,001081$ ,  $p=0,9740$ ), condição ( $F_{1,31}=0,1929$ ,  $p=0,6635$ ) ou interação ( $F_{1, 31}=0,05208$ ,  $p=0,8210$ ) (fig 9a). Não houve efeito do genótipo

( $F_{1,30}=0,4846$ ,  $p=0,4917$ ), condição ( $F_{1,30}=0,1492$ ,  $p=0,7020$ ) ou interação ( $F_{1,30}=0,435$ ,  $p=0,5146$ ) em relação à expressão gênica de Myd88 (fig 9c). Já na expressão de TLR4 houve efeito do genótipo ( $F_{1,30}=6,487$ ,  $p=0,0162$ ), mas não da condição ( $F_{1,30}=1,253$ ,  $p=0,2718$ ), e tendência na interação entre fatores ( $F_{1,30}=3,926$ ,  $p=0,0568$ ), com aumento da expressão gênica nos animais TLR4 KO estressados em relação aos WT estressados ( $p=0,0202$ ) (fig 9b). Este aumento da expressão de TLR4 nos animais TLR4 KO pode ter ocorrido devido a presença de RNA não-funcional ou até mesmo uma proteína mutante não funcional. Para confirmar esta possibilidade, mais testes são necessários, como Western Blotting e desafio com LPS em cultura primária. Em um experimento independente, avaliamos a expressão de TLR4 no baço, a fim de avaliar se havia expressão periférica do receptor nos animais TLR4 KO, e há expressão, assim como nos animais WT ( $p=0,8719$ , teste T).



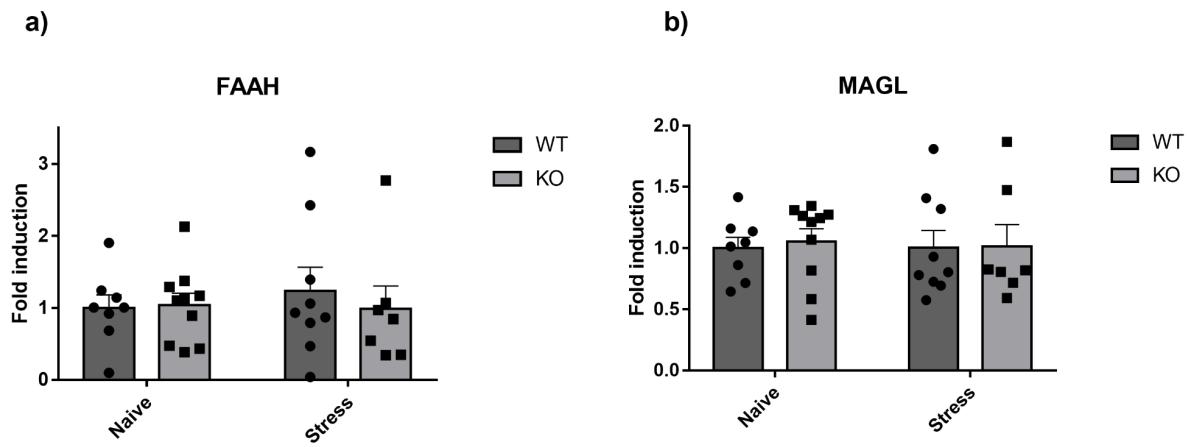
**Fig. 9: Efeito do estresse de restrição em camundongos WT e KO na expressão de genes relacionados à neuroinflamação.** (a) HMGB1. (b) TLR4. (c) Myd88. Houve aumento da expressão de TLR4 nos animais TLR4 KO estressados em relação aos WT estressados. (d) expressão de TLR4 no baço. \*  $p<0,05$ , teste de Tukey. Os dados são apresentados como média +/- EPM.

A expressão de NLRP3, um inflamassoma que pode ser ativado pelo TLR4, não apresentou alterações, sem efeito do genótipo ( $F_{1,29}=0,9601$ ,  $p=0,3353$ ), condição ( $F_{1,29}=0,9189$ ,  $p=0,3457$ ) ou interação ( $F_{1,29}=0,1295$ ,  $p=0,7216$ ) (fig 10a). A expressão de caspase-1 também não apresentou efeito do genótipo ( $F_{1,30}=2,39$ ,  $p=0,1326$ ), condição ( $F_{1,30}=0,9431$ ,  $p=0,3392$ ) ou interação ( $F_{1,30}=2,255$ ,  $p=0,1436$ ) (fig 10b). Na expressão gênica de pro-IL-1 $\beta$ , houve efeito da condição ( $F_{1,30}=4,773$ ,  $p=0,0369$ ), mas não do genótipo ( $F_{1,30}=0,1495$ ,  $p=0,7018$ ) ou interação ( $F_{1,30}=0,9165$ ,  $p=0,3461$ ), o que indica que o estresse está aumentando a produção de pro-IL-1 $\beta$  mas não dos outros componentes da via. É necessária a realização de western blotting para confirmar tal expressão aumentada. Ainda, para confirmar se a pro-IL-1 $\beta$  é convertida em IL-1 $\beta$ , mais testes, como ELISA, são necessários (fig 10c).



**Fig. 10: Efeito do estresse de restrição em camundongos WT e KO na expressão de componentes do inflamassoma NLRP3 no hipocampo.** (a) não houve alterações na expressão de NLRP3 (b) nem de caspase 1. (c) Porém houve efeito da condição na expressão gênica de pro-IL-1 $\beta$ . # $p<0,05$ , efeito da condição, 2-way ANOVA. Os dados são apresentados como média +- EPM.

Na expressão gênica de FAAH, não houve efeito do genótipo ( $F_{1,30}=0,1828$ ,  $p=0,6721$ ), condição ( $F_{1,30}=0,1337$ ,  $p=0,7172$ ) ou interação ( $F_{1,30}=0,3261$ ,  $p=0,5722$ ) (Fig 11a). Também não há efeito do genótipo ( $F_{1,30}=0,06036$   $p=0,8076$ ), condição ( $F_{1,30}=0,01646$ ,  $p=0,8988$ ) ou interação ( $F_{1,30}=0,03056$   $p=0,8624$ ) para a expressão de MAGL (fig 11b).

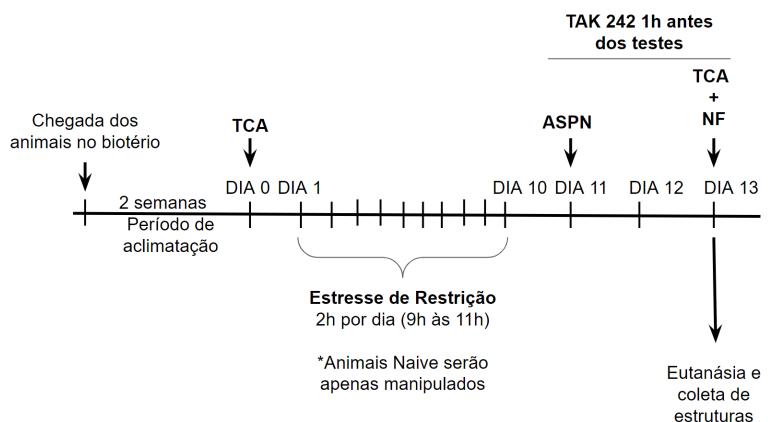


**Fig. 11: Efeito do estresse de restrição em camundongos WT e KO na expressão de enzimas de degradação do sistema ECB, no hipocampo. (a) não há alterações na expressão gênica de FAAH (b) nem MAGL. Os dados são apresentados como média +/- EPM.**

As análises dos níveis das proteínas envolvidas serão ainda realizadas por Western blotting.

### 6.3 Resultados comportamentais dos animais tratados com TAK242

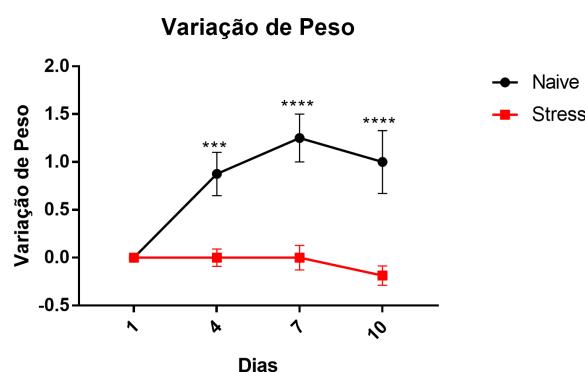
Com o intuito de avaliar a influência da inibição farmacológica do receptor TLR4 na resposta comportamental ao estresse foi adotado o delineamento experimental que está demonstrado na Figura 12.



**Fig. 12: Delineamento experimental, experimento com TAK 242.** TCA: teste do campo aberto. ASPN: teste da alimentação suprimida pela novidade. NF; nado forçado.

Como foi observado que nos WT o estresse de restrição de 10 dias induzia comportamento tipo-depressivo no teste do nado forçado, e comportamentos tipo-ansioso apenas no TCA e teste da ASPN, no experimento com TAK 242 realizamos apenas estes testes, ou seja, não realizamos o teste do LCE (fig 12). Ainda, devido à pouca quantidade de droga disponível, inicialmente não avaliamos o efeito do TAK 242 nos animais naïve.

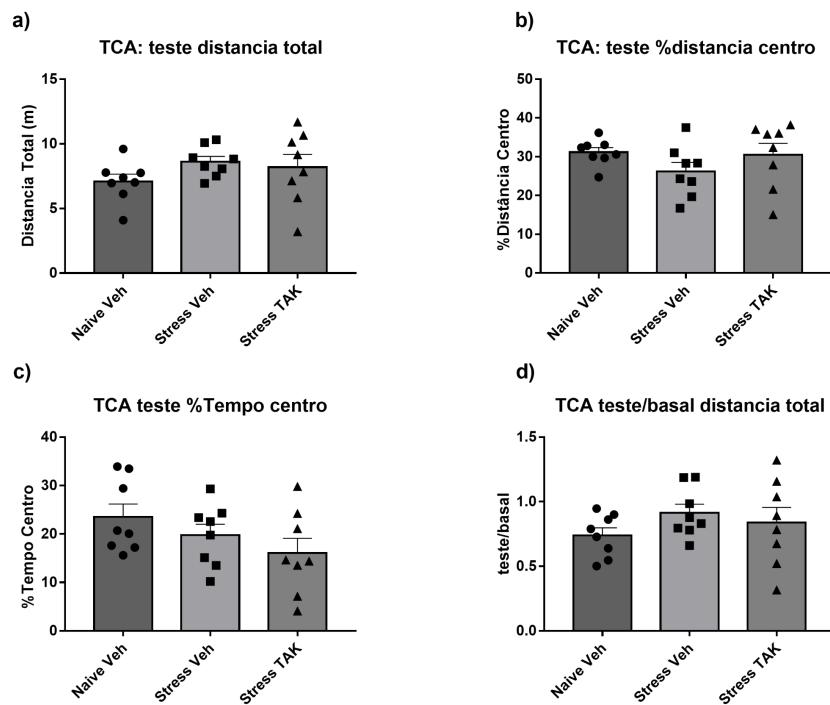
Em relação ao peso, novamente os animais estressados não foram capazes de ganhar peso como os animais naïve, isto é, houve efeito da condição ( $F_{1,22}=31,16, p<0,0001$ ), interação entre fatores ( $F_{3,66}=11,14, p<0,0001$ ) e efeito do tempo ( $F_{3,66}=9,301, p<0,0001$ ). Desde o 4º dia ( $p=0,0003$ , Tukey) o peso dos animais estressados foi diferente, a diferença permaneceu no 7º e 10º dia até o fim do estresse ( $p<0,0001$ , Tukey) (fig 13),



**Fig. 13: Animais estressados têm déficit no ganho de peso.** Variação de peso dos grupos naïve e stress ao longo dos dias, considerando o basal de cada animal como igual a 0. Animais naïve ganham peso ao longo do tempo enquanto que os estressados não. \*\*\* $p<0,0005$  teste de Tukey. \*\*\*\* $P<0,0001$  teste de Tukey. Os dados são apresentados como média +/- EPM.

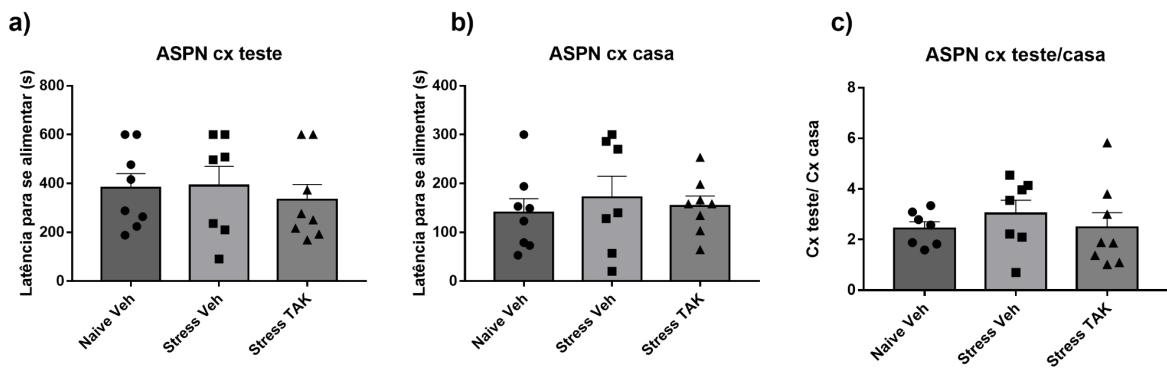
No teste do campo aberto não há diferenças na distância total percorrida no teste de One-way ANOVA ( $F_{2,21}=1,268, p=0,3020$ ) (fig 14 a). Também não há diferenças na porcentagem de tempo permanecido no centro do aparato ( $F_{2,21}=1,927, p=0,1704$ ) e da distância percorrida no centro do aparato ( $F_{2,21}=1,396, p=0,2697$ ) (fig 14c, 14b). A relação entre distância total percorrida no teste e basal também não apresentou

alterações ( $F_{2,21}=1,033$ ,  $p=0,3734$ ) (fig 14d). Isso indica que o efeito do estresse observado nos experimentos anteriores não foi replicado neste experimento. Não pudemos avaliar se a inibição farmacológica com TAK242 geraria os mesmo efeitos ansiogênicos observados nos animais TLR4KO, pois por limitação de número de animais, não pudemos realizar o grupo naive que tenha recebido o TAK242.



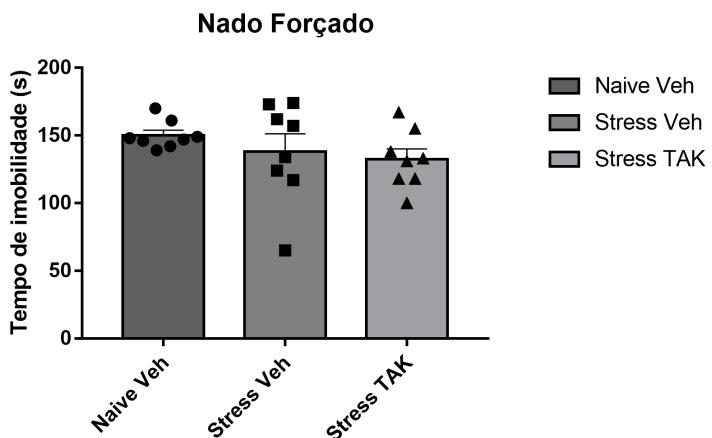
**Fig. 14: Estresse não promoveu efeitos no TCA em animais que receberam administração de veículo.** Teste do campo aberto, experimento com TAK 242. (a) distância total percorrida basal. (b) porcentagem de distância percorrida no centro do aparato. (c) porcentagem de tempo despendido no centro do aparato. (d) Relação entre distância total percorrida no teste e basal. Os dados são apresentados como média +/- EPM.

No teste da alimentação suprimida pela novidade não houve diferença significativa no tempo de latência na caixa teste ( $F_{2,20}=0,2192$ ,  $p=0,8050$ ) (fig 15a) e na caixa casa ( $F_{2,20}=0,2469$ ,  $p=0,7836$ ) (fig 15b), também não houve alterações na relação caixa teste/casa ( $F_{2,19}=0,4391$ ,  $p=0,6510$ ) (fig 15 c), o que difere do comportamento ansiogênico dos animais TLR4 KO.



**Fig. 15: Tratamento com TAK242 não promove efeito no TASPN.** Teste da alimentação suprimida pela novidade experimento com TAK 242. (a) tempo de latência na caixa teste (b) caixa casa (c) relação caixa teste/caixa casa. Os dados são apresentados como média +- EPM.

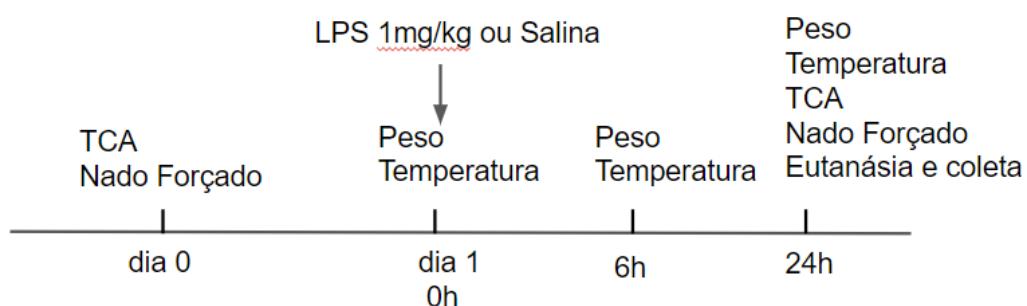
No teste do nado forçado não observamos diferenças entre os grupos no teste One-way ANOVA ( $F_{2,21}=1,03$ ,  $p=0,374$ ) (fig 16), indicando que o estresse nesse experimento, ao contrário dos experimentos iniciais com os animais TLR4 KO machos, não induziu aumento de imobilidade. Comparando o efeito do estresse nesse experimento com os experimentos anteriores dos animais KO, observamos uma diferença estatística entre os animais estressados ( $p=0,0087$ , Teste T, não mostrado), dando suporte à hipótese de ineficácia do estressor nesse experimento. Não sabemos exatamente o porquê do estresse não ter gerado comportamento tipo-depressivo neste último protocolo. Entretanto, ao contrário do protocolo anterior, neste protocolo os animais foram manipulados diariamente para injeção intraperitoneal, o que pode estar envolvido nesta discrepância.



**Fig. 16: Ausência de efeito do estresse ou do TAK242 no experimento com injeções no teste do nado forçado.** Teste do nado forçado, experimento com TAK 242. Não há diferenças entre os grupos. Os dados são apresentados como média +- EPM.

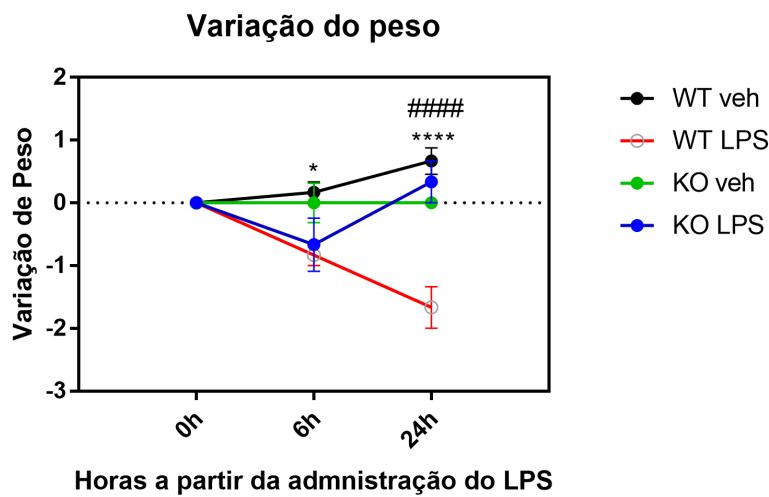
## 6.4 Resultados com o teste de LPS

Visto que os animais TLR4 KO apresentaram a expressão de mRNA codificante para TLR4 mesmo tendo a deleção desse gene nos experimentos anteriores, foi subsequentemente avaliada a resposta desses animais frente ao desafio com LPS. O LPS exerce efeitos no biológicos majoritariamente através da ativação de TLR4, portanto animais KO e WT foram desafiados com LPS (1mg/Kg i.p) em um experimento independente. A imagem a seguir mostra o delineamento deste experimento (fig. 17). O Nado forçado como pré-teste foi utilizado para randomizar os animais.



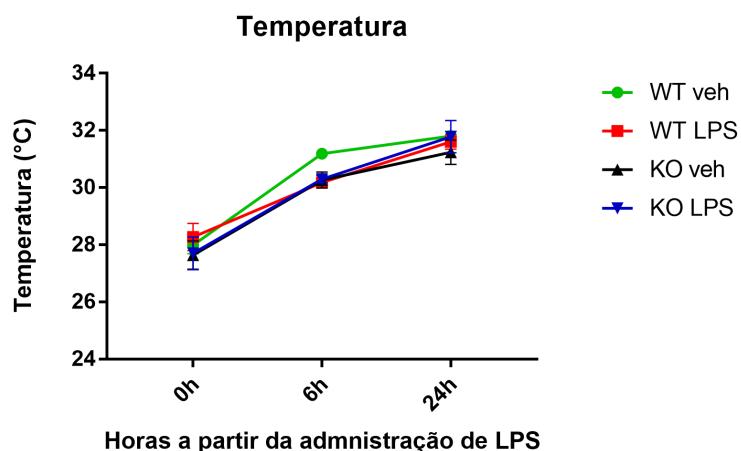
**Fig. 17: Delineamento experimental de LPS em animais TLR4 KO. TCA: Teste do campo aberto.**

Em relação à variação de peso, foi observado efeito do grupo experimental ( $F_{3,19}=10,54$ ,  $p=0,0003$ ), tendência a efeito do tempo ( $F_{2,38}=2,468$ ,  $p=0,0983$ ) e interação entre estes fatores ( $F_{6,38}=7,447$ ,  $p<0,0001$ ). Os animais TLR4 KO tratados com LPS não apresentaram perda de peso como os animais WT tratados com LPS, evidenciada pela diferença entre esses dois grupos 24h após a administração ( $p<0,0001$ , Tukey) (fig 21). Os animais WT tratados com LPS apresentam diferenças significativas em relação aos animais WT que receberam veículo já 6h ( $p=0,0127$ , Tukey) e 24h ( $p<0,0001$ ) após a administração (fig 18).



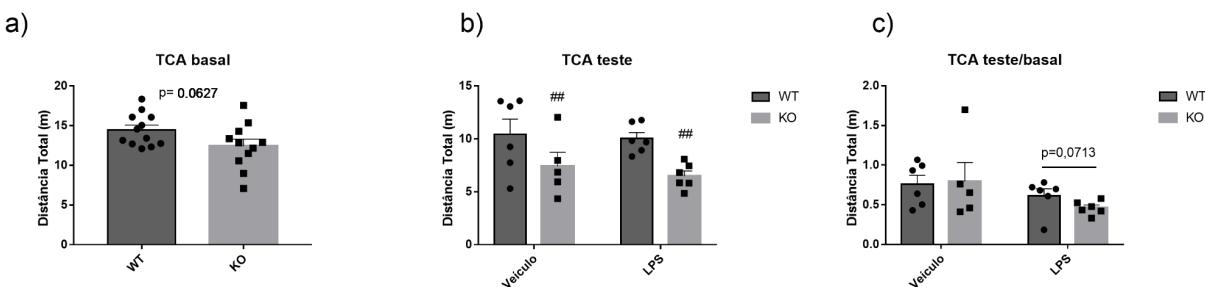
**Fig. 18. Animais WT tratados com LPS tem queda de peso, mas TLR4 KO não.** Animais WT tratados com LPS apresentam diferenças significativas em relação aos animais WT que receberam veículo já às 6h e 24h após a administração. Animais WT tratados com LPS também apresentam redução de peso em relação aos animais TLR4 KO tratados com LPS, indicando que estes últimos estão protegidos. \*p<0,05, \*\*\*\*P<0,0001 WT veh vs WT LPS, teste de Tukey. ##### p<0,0001 KO LPS vs WT LPS, teste de Tukey. Os dados são apresentados como média +- EPM.

Em relação à temperatura corporal, não houve efeito da condição ( $F_{3,19}=1,133$ ,  $p=0,3609$ ) ou interação entre fatores ( $F_{6,38}=0,8228$ ,  $p=0,5594$ ), somente efeito do tempo ( $F_{2,38}=124,1$ ,  $p<0,0001$ ), indicando que o LPS não teve efeito sobre a temperatura dos animais (fig 19).



**Fig. 19: LPS não induz variações na temperatura.** LPS não promoveu alterações na temperatura dos animais. Os dados são apresentados como média +- EPM.

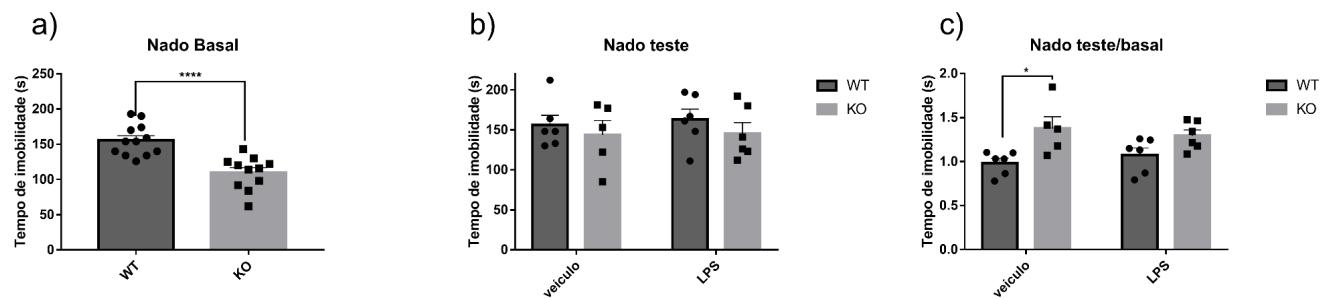
Em relação ao TCA, nas medidas basais os animais TLR4 KO apresentaram tendência à redução da locomoção ( $p=0,0627$ , Teste T), o que já foi demonstrado nos experimentos anteriores (fig 20a). No dia do teste, não houve efeito do tratamento ( $F_{1,19}=0,4356$ ,  $p=0,5172$ ) ou interação entre fatores ( $F_{1,19}=0,07359$ ,  $p=0,7891$ ), somente efeito do genótipo ( $F_{1,19}=10,36$ ,  $p=0,0045$ ), explicado pela hipolocomoção dos animais TLR4 KO (fig 20b). Realizando-se a razão da distância percorrida no teste pela basal, observamos que não há efeito do genótipo ( $F_{1,19}=0,2084$ ,  $p=0,6532$ ) ou interação ( $F_{1,19}=0,5492$ ,  $p=0,4677$ ), apesar de haver tendência da condição ( $F_{1,19}=3,648$ ,  $p=0,0713$ ) (fig 20c).



**Fig. 20: LPS não induz alterações no TCA.** (a) Animais TLR4 KO apresentam tendência a redução da locomoção nas medidas basais do TCA. (b) LPS não induz alterações no TCA. (c) Não há alterações na relação teste/basal. Os dados são apresentados como média +/- EPM.

Nas medidas basais do teste do nado forçado, o tempo de imobilidade dos animais TLR4 KO já é inferior aos dos WT ( $p<0,0001$ , Teste T) (fig 21a). Contudo, 24h após a administração de LPS não observamos efeito no teste do nado forçado; não há efeito do tratamento ( $F_{1,19}=0,1077$ ,  $p=0,7464$ ), genótipo ( $F_{1,19}=1,104$ ,  $p=0,3065$ ) ou interação ( $F_{1,19}=0,03286$ ,  $p=0,8581$ ) (fig 21b). Fazendo-se a razão das medidas do teste pelo basal observamos novamente efeito do genótipo ( $F_{1,19}=13,16$ ,  $p=0,0018$ ), mas não da condição ( $F_{1,19}=0,002144$ ,  $p=0,9636$ ) ou interação entre fatores ( $F_{1,19}=1,062$ ,  $p=0,3156$ ), com aumento da razão dos animais veículo KO em relação aos veículo WT ( $p=0,0215$ , Tukey), indicando que o LPS não teve efeito sobre os animais, e que os animais KO tratados com LPS mantiveram seu menor tempo de

imobilidade (fig 21c).



**Fig. 21: LPS não induz comportamento tipo-depressivo.** (a) nas medidas basais os animais TLR4 KO apresentam redução do tempo de imobilidade no teste do nado forçado. (b) LPS não tem efeito no teste do nado forçado.(c) Na razão teste/basal do teste do nado forçado observamos um aumento da razão dos animais veículo KO em relação aos veículo WT. \*p<0,05 teste de Tukey. Os dados são apresentados como média +- EPM.

Testes moleculares ainda são necessários para avaliar a expressão de RNA e de proteína de TLR4 no encéfalo e outros tecidos do corpo, pois com os resultados obtidos até agora podemos dizer somente que os animais TLR4 KO estão protegidos contra a redução de peso induzida por LPS, uma característica do *sickness behavior*.

## 7. DISCUSSÃO

O estresse de restrição de 10 dias em camundongos C57Bl/6 machos induziu comportamentos tipo-ansioso no TASPN, mas não no TCA e LCE, e induziu comportamento tipo-depressivo no teste do nado forçado. Houve, ainda, tendência à redução da autolimpeza no Splash test induzida pelo estresse, sugerindo um efeito tipo-anedônico. Além disso, o ganho de peso nos animais estressados ao longo dos dias foi menor do que nos animais naïves, o que é esperado para estressores repetidos.

Os animais TLR4 KO estressados apresentaram comportamento tipo-ansioso no TASPN e no TCA, sendo que esse comportamento já foi reportado por outros autores (Zhang et al, 2020, Femenia et al, 2018). Ou seja, a ausência de TLR4 não protegeu

contra o desenvolvimento do comportamento tipo ansioso, e poderia até induzir suscetibilidade, como observado no TCA. Apesar disso, esses animais apresentaram um tempo maior de autolimpeza no Splash test, independente do estresse, que poderia ser interpretado como efeito hedônico. Ainda, observamos a redução do tempo de imobilidade no teste do nado forçado (experimento do LPS; efeito prévio à administração do LPS), isto é, um efeito antidepressivo do genótipo, o que ainda não foi reportado. A proteção ao efeito tipo depressivo induzido após o estresse nos animais TLR4 KO no teste do nado forçado observado no presente trabalho também já foi descrita (Zhang et al, 2020). Neste experimento do estresse não observamos o efeito antidepressivo do genótipo, como no experimento do LPS. É importante salientar que neste experimento em que testamos o efeito do LPS, os animais não foram manipulados diariamente por 10 dias, como os animais do experimento do estresse, o que poderia justificar a diferença com os animais naives deste último. Ainda no teste do LPS, observamos que houve aumento do tempo de imobilidade dos animais TLR4 KO naives na razão do tempo de imobilidade no teste em relação à medida basal do nado forçado. O aumento da imobilidade é um comportamento esperado quando os animais são re-expostos ao NF devido a adaptação ao teste. Entretanto, curiosamente os animais WT não mostraram esse aumento, o que não era esperado. Portanto, considerando este comportamento dos controles, não consideramos o comportamento observado nos KO como um fenótipo tipo-depressivo.

Os dados indicam que o receptor TLR4 tem um papel complexo nas respostas comportamentais ao estresse, tornando os animais resilientes ao comportamento tipo-depressivo, porém mais suscetíveis ao comportamento tipo-ansioso. Como essa resposta ansiogênica não foi observada no tratamento com o agonista do receptor do TLR4, TAK242, em outros trabalhos (Zhang et al, 2020; Shirayama et al, 2022), podemos hipotetizar que esse comportamento tenha origem no neurodesenvolvimento dos animais, ou que o efeito está relacionado à ablação total dos receptores em regiões encefálicas, o que não acontece com o tratamento farmacológico. Foi demonstrado que animais TLR4 KO apresentam alterações na expressão de genes cujas proteínas são relacionados à ansiedade, como DARPP-32 (*dopamine- and*

*cAMP-regulated phosphoprotein-32*) (Femenia et al, 2018); a fosforilação dessa proteína é controlada pela serotonina e é essencial para esse sistema de neurotransmissão (Svenningsson et al, 2002), que está envolvido de forma complexa na ansiedade e depressão. Deste modo é possível que o receptor TLR4 interfira com a neurotransmissão serotonérgica, o que poderia explicar o comportamento tipo-ansioso e antidepressivo, de modo similar ao descrito em animais knockouts para o receptor de serotonina tipo 1A (5HT1A KO) (Ramboz et al, 1998). Ainda não investigamos, no entanto, se existe alteração destes fatores no nosso protocolo.

Ademais, outras observações foram feitas acerca dos animais TLR4 KO. Como os animais apresentaram uma dificuldade em ganhar peso, supôs-se que o *drive* para ingestão de alimentos poderia ser diferente entre animais KO e WT. Contudo, a análise da ingestão alimentar dos animais revelou que eles a ingestão alimentar é similar aos WT. Desse modo, hipotetizamos que a dificuldade em ganhar peso dos animais TLR4 KO está relacionada com as funções metabólicas do receptor TLR4 e sua influência no armazenamento de gordura (McKernan, et al 2020). Esta possibilidade ainda será investigada no nosso protocolo experimental.

Os animais TLR4 KO também apresentaram expressão do mRNA para TLR4, tanto no cérebro quanto no baço, o que não era esperado, visto que são knockouts para o gene. Contudo, as diferenças comportamentais observadas apontam que há uma diferença entre os animais WT e TLR4 KO. Ainda, enquanto os animais WT perdem peso após receberem LPS, os animais TLR4 KO são resilientes, como mostra a literatura, e, ainda, que há redução da expressão de IL-1 $\beta$ , IL-6, MyD88, iNOS e TNF $\alpha$  (Hoshino et al 1999; Guo et al, 2020). Diante dos nossos resultados e dos descritos na literatura, levantamos a hipótese de que o mRNA de TLR4 expresso nos TLR4 KO não seja um RNA funcional, ou que gere uma proteína deficiente. Para comprovar essas hipóteses mais testes serão ainda realizados. Dessa forma, adicionalmente serão realizados *Western Blotting*, para verificar se há expressão da proteína, além de desafio com LPS em cultura primária de micróglia de camundongos TLR4 KO e verificar a ocorrência de resposta inflamatória.

Ainda em relação ao teste com LPS, na literatura é amplamente demonstrado que o LPS induz, de modo robusto, comportamentos tipo-depressivo (O'Connor et al,

2009), o que não foi observado no presente experimento. Talvez isso se deva à dose administrada e à linhagem de animais utilizados (Painsipp et al, 2011). Contudo, mesmo com outras linhagens o comportamento tipo-depressivo não tem sido observado nos experimentos do grupo de laboratório, para o que ainda não temos explicação. De qualquer forma, como esperado o LPS induziu perda de peso nos WT, o que não foi observado nos animais KO.

Os demais componentes analisados pelo qPCR (Myd88, HMGB1, NLRP3, Caspase-1, pró-IL-1 $\beta$ , FAAH e MAGL) não sofreram alterações pelo estresse. Entretanto, na expressão de pró-IL-1 $\beta$  houve efeito da condição, indicando que o estresse tem efeito sobre sua expressão, porém mais análises moleculares são necessárias para comprovar o aumento de IL-1 $\beta$ , como ELISA e *Western Blotting*. Essa ausência de resultados pode indicar que o estresse utilizado de fato não proporciona alterações neuroinflamatórias e no sistema endocannabinoide, ou que, pela eutanásia ter sido realizada 3 dias após o término do estresse, esses efeitos já não eram mais observados, podendo naquele momento serem observadas alterações nos níveis proteicos. Diversos artigos demonstram que essas alterações se reestabelecem logo ao término do estresse (Gárate et al, 2013; Gárate et al, 2014) ou ainda no dia seguinte (Zhang et al, 2020), ou ainda que essas divergências podem estar atribuídas aos diferentes níveis de citocinas encontrados em diferentes horas após o estresse, demonstrando que há um tempo ideal após o estresse para observar esse fenômeno de forma mais intensa (Cheng et al, 2016).

De todo modo, os resultados de qPCR até o momento não explicam o efeito tipo-antidepressivo observado nas medidas basais dos animais TLR4 KO e nas medidas após o estresse, sendo necessárias análises adicionais, como avaliação dos níveis proteicos. Entre as vias que podem explicar esses efeitos está o envolvimento do receptor PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor*) e da enzima iNOS, considerando a relação direta destes fatores com o TLR4. Desse modo, foi mostrado que a ativação do receptor TLR4 através da ativação de NFkB reduz a expressão de PPAR $\gamma$  em macrófagos, mas por outro lado o PPAR $\gamma$  reprime a atividade do NFkB, criando uma alça regulatória (Necela et al, 2008). A verificação deste mecanismo em

células da micróglia ainda será avaliada. A redução de PPAR $\gamma$  não foi observada no CPF de animais TLR4 KO após estresse (Gárate et al, 2013). Ainda, o uso do agonista de PPAR $\gamma$ , pioglitazona, tem efeito antidepressivo no teste do nado forçado (Sadaghiani et al, 2011). Além disso, sugere-se que o uso de agonistas PPAR $\gamma$  pode ser promissor no tratamento do transtorno depressivo maior, porém mais estudos são necessários (Colle et al, 2017). Desse modo é possível que o efeito antidepressivo observado nos animais TLR4 KO tenha relação com a maior expressão de PPAR $\gamma$ . Se esta possibilidade existir, esperaríamos que um antagonista destes receptores poderia atenuar o comportamento observado nos animais TLR4 KO após o estresse. Entretanto, até o momento não pudemos verificar estas possibilidades.

Em relação à enzima iNOS, sabe-se que sua expressão é regulada em parte pelo receptor TLR4 através da via independente de Myd88 em macrófagos (Lee et al, 2005). A administração de L-arginina, um precursor do óxido nítrico, junto com a pioglitazona inibe o efeito antidepressivo observado com a administração dessa última droga (Sadaghiani et al, 2011), e a inibição da enzima iNOS também tem efeito antidepressivo (Montezuma et al, 2012, Peng et al, 2012). Ainda, animais TLR4 KO têm redução da expressão de iNOS no cólon (Cuesta et al, 2021). Animais TLR4 KO consequentemente poderiam ter uma redução da liberação de RNS. Em conjunto, esses dois fatores (aumento da expressão de PPAR $\gamma$  e redução da expressão de iNOS) poderiam estar envolvidos nos efeitos antidepressivos observados. Até o momento não foi investigada a participação destes mecanismos.

No experimento com TAK242 o procedimento de injeção *per se* possivelmente impediu a visualização do comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse. Ademais, mais grupos experimentais são necessários para completar o experimento. Portanto, os efeitos do bloqueio farmacológico ainda permanecem sem investigação.

## 8. CONCLUSÕES

O estresse de restrição de 10 dias foi capaz de induzir comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso, sendo que os animais TLR4 KO estão protegidos contra o comportamento tipo-depressivo, porém são suscetíveis ao comportamento

tipo-ansioso. Apesar de expressarem o mRNA de TLR4 no encéfalo e baço, os animais TLR4 KO não respondem ao LPS do mesmo modo que os animais WT, indicando que essa expressão do mRNA de TLR4 pode não ser funcional ou até mesmo pode produzir uma proteína mutante, não funcional. Mais testes são necessários para confirmar essa hipótese. Ademais, o qPCR não demonstrou diferenças significativas entre os grupos experimentais sobre os componentes analisados, exceto na expressão de pro-IL-1 $\beta$ , indicando que o estresse falhou em induzir neuroinflamação, ou que em decorrência do tempo que se passou após o estresse essas diferenças não puderam ser observadas. Ainda, a administração de droga ou veículo no experimento com TAK242 impediu a visualização do comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse. Dessa forma, os resultados do presente estudo suportam a participação dos receptores TLR4 nas respostas comportamentais ao estresse. Ainda, trazem novas perspectivas para o entendimento dos mecanismos subjacentes à sua ativação após a exposição ao estresse que poderiam estar envolvidos no desenvolvimento do comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo.

## 9. REFERÊNCIAS

Banqueri, M et al (2019). Early life stress by repeated maternal separation induces long-term neuroinflammatory response in glial cells of male rats. *Stress*, 1–8.

Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., & van Noort, J. M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 61(11), 1013–1021. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.11.1013>

Camandola, S., & Mattson, M. P. (2017). Toll-like receptor 4 mediates fat, sugar, and umami taste preference and food intake and body weight regulation. *Obesity* (Silver Spring, Md.), 25(7), 1237–1245. <https://doi.org/10.1002/oby.21871>

Colle, R., de Larminat, D., Rotenberg, S., Hozer, F., Hardy, P., Verstuyft, C., Fèvre, B., & Corruble, E. (2017). PPAR- $\gamma$  Agonists for the Treatment of Major Depression: A Review. *Pharmacopsychiatry*, 50(2), 49–55. <https://doi.org/10.1055/s-0042-120120>

Costa-Ferreira, W., Vieira, J. O., Almeida, J., Gomes-de-Souza, L., & Crestani, C. C. (2016). Involvement of Type 1 Angiotensin II Receptor (AT1) in Cardiovascular

Changes Induced by Chronic Emotional Stress: Comparison between Homotypic and Heterotypic Stressors. *Frontiers in pharmacology*, 7, 262. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00262>

Cuesta, C. M., Pascual, M., Pérez-Moraga, R., Rodríguez-Navarro, I., García-García, F., Ureña-Peralta, J. R., & Guerri, C. (2021). TLR4 Deficiency Affects the Microbiome and Reduces Intestinal Dysfunctions and Inflammation in Chronic Alcohol-Fed Mice. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12830. <https://doi.org/10.3390/ijms222312830>

Cheng, Y., Pardo, M., Armini, R. S., Martinez, A., Mouhsine, H., Zagury, J. F., Jope, R. S., & Beurel, E. (2016). Stress-induced neuroinflammation is mediated by GSK3-dependent TLR4 signaling that promotes susceptibility to depression-like behavior. *Brain, behavior, and immunity*, 53, 207–222.

Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 55–65. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01274-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01274-3)

Cherry, J. D., et al (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 98.

Femenia, T., Qian, Y., Arentsen, T., Forssberg, H., & Diaz Heijtz, R. (2018). Toll-like receptor-4 regulates anxiety-like behavior and DARPP-32 phosphorylation. *Brain, behavior, and immunity*, 69, 273–282.

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(7):2173-85.

Fuenzalida, K., Quintanilla, R., Ramos, P., Piderit, D., Fuentealba, R. A., Martinez, G., Inestrosa, N. C., & Bronfman, M. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein in neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against oxidative stress and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 282(51), 37006–37015.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M700447200>

Gárate, I., García-Bueno, B., Madrigal, J.L. et al (2011). Origin and consequences of brain Toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. *J Neuroinflammation* 8, 151.

Gárate, I., et al (2014). Toll-like 4 receptor inhibitor TAK-242 decreases neuroinflammation in rat brain frontal cortex after stress. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 8.

Gárate, I., et al (2013). Stress-Induced Neuroinflammation: Role of the Toll-Like Receptor-4 Pathway. *Biological Psychiatry*, 73(1), 32–43.

García Bueno, B., et al (2016). Innate immune receptor Toll-like receptor 4 signalling in neuropsychiatric diseases. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 64, 134–147.

Godoy, L. D., Rossignoli, M. T., Delfino-Pereira, P., Garcia-Cairasco, N., & de Lima Umeoka, E. H. (2018). A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 12, 127. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00127>

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(1):95.

Hanke, M. L., & Kielian, T. (2011). Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science*, 121(9), 367–387.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., & Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(7), 3749–3752.

Kopp B.L, et al. Differential Effects of Homotypic vs. Heterotypic Chronic Stress Regimens on Microglial Activation in the Prefrontal Cortex. *Physiol Behav* 2013.

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.

Lisboa, S. F., Gomes, F. V., Guimaraes, F. S., & Campos, A. C. (2016). Microglial Cells as a Link between Cannabinoids and the Immune Hypothesis of Psychiatric Disorders. *Frontiers in neurology*, 7, 5. <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00000>

Lisboa, S. F., et al (2018a). Repeated social defeat-induced neuroinflammation, anxiety-like behavior and resistance to fear extinction were attenuated by the

cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2. *Neuropsychopharmacology*, 43(9), 1924–1933.

Lisboa, S. F., et al (2018b). Mice lacking interleukin-18 gene display behavioral changes in animal models of psychiatric disorders: Possible involvement of immunological mechanisms. *J Neuroimmunology*, 314, 58-66.

Lee, J. Y., Lowell, C. A., Lemay, D. G., Youn, H. S., Rhee, S. H., Sohn, K. H., Jang, B., Ye, J., Chung, J. H., & Hwang, D. H. (2005). The regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase by Src-family tyrosine kinases mediated through MyD88-independent signaling pathways of Toll-like receptor 4. *Biochemical pharmacology*, 70(8), 1231–1240. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.07.020>

Liu, H.-Y., et al. (2018). Chronic minocycline treatment reduces the anxiety-like behaviors induced by repeated restraint stress through modulating neuroinflammation. *Brain Research Bulletin*, 143, 19–26.

Lu, H. C., & Mackie, K. (2021). Review of the Endocannabinoid System. *Biological psychiatry. Cognitive neuroscience and neuroimaging*, 6(6), 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>

Martín-Hernández D, Caso JR, Bris Á G, 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.

McCoy K. L. (2016). Interaction between Cannabinoid System and Toll-Like Receptors Controls Inflammation. *Mediators of inflammation*, 2016, 5831315. <https://doi.org/10.1155/2016/5831315>

McKernan, K., Varghese, M., Patel, R., & Singer, K. (2020). Role of TLR4 in the induction of inflammatory changes in adipocytes and macrophages. *Adipocyte*, 9(1), 212–222. <https://doi.org/10.1080/21623945.2020.1760674>

McKinsey, G. L., Lizama, C. O., Keown-Lang, A. E., Niu, A., Santander, N., Larphaveesarp, A., Chee, E., Gonzalez, F. F., & Arnold, T. D. (2020). A new genetic strategy for targeting microglia in development and disease. *eLife*, 9, e54590.

Mishra, B. B., Mishra, P. K., & Teale, J. M. (2006). Expression and distribution of Toll-like receptors in the brain during murine neurocysticercosis. *Journal of neuroimmunology*, 181(1-2), 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.07.019>

Montezuma, K., Biojone, C., Lisboa, S. F., Cunha, F. Q., Guimarães, F. S., & Joca, S. R. (2012). Inhibition of iNOS induces antidepressant-like effects in mice: pharmacological and genetic evidence. *Neuropharmacology*, 62(1), 485–491.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.09.004>

Morena, M., Patel, S., Bains, J. S., & Hill, M. N. (2016). Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 41(1), 80–102.

<https://doi.org/10.1038/npp.2015.166>

Necela, B. M., Su, W., & Thompson, E. A. (2008). Toll-like receptor 4 mediates cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and nuclear factor-kappaB in macrophages. *Immunology*, 125(3), 344–358.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02849.x>

Nie, X., et al. (2018). The Innate Immune Receptors TLR2/4 Mediate Repeated Social Defeat Stress-Induced Social Avoidance through Prefrontal Microglial Activation. *Neuron*, 99(3), 464–479.e7.

Nie, X., Kitaoka, S., Shinohara, M. et al. Roles of Toll-like receptor 2/4, monoacylglycerol lipase, and cyclooxygenase in social defeat stress-induced prostaglandin E2 synthesis in the brain and their behavioral relevance. *Sci Rep* 9, 17548 (2019).

O'Connor JC, Lawson MA, André C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry*. 2009 May;14(5):511-22. doi: 10.1038/sj.mp.4002148. Epub 2008 Jan 15. PMID: 18195714; PMCID: PMC2683474.

Olfe J et al. (2010), Different stress-related phenotypes of BALB/c mice from in-house or vendor: alterations of the sympathetic and HPA axis responsiveness. *BMC Physiol*. 10: 2.

Okun, E., Barak, B., Saada-Madar, R., Rothman, S. M., Griffioen, K. J., Roberts, N., Castro, K., Mughal, M. R., Pita, M. A., Stranahan, A. M., Arumugam, T. V., & Mattson, M. P. (2012). Evidence for a developmental role for TLR4 in learning and memory. *PLoS one*, 7(10), e47522.

Pandey, G. N., et al. (2014). Toll-like receptors in the depressed and suicide brain. *Journal of Psychiatric Research*, 53, 62–68.

Painsipp, E., Köfer, M. J., Sinner, F., & Holzer, P. (2011). Prolonged depression-like behavior caused by immune challenge: influence of mouse strain and social environment. *PLoS one*, 6(6), e20719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020719>

Patel S, Cravatt BF, Hillard CJ (2005a). Synergistic interactions between cannabinoids and environmental stress in the activation of the central amygdala. *Neuropsychopharmacology* 30: 497–507.

Patel, S., Kingsley, P. J., Mackie, K., Marnett, L. J., & Winder, D. G. (2009). Repeated homotypic stress elevates 2-arachidonoylglycerol levels and enhances short-term endocannabinoid signaling at inhibitory synapses in basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 34, 2699–2709.

Peng, YL., Liu, YN., Liu, L. et al. Inducible nitric oxide synthase is involved in the modulation of depressive behaviors induced by unpredictable chronic mild stress. *J Neuroinflammation* 9, 75 (2012). <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-75>

Ramboz, S., Oosting, R., Amara, D. A., Kung, H. F., Blier, P., Mendelsohn, M., Mann, J. J., Brunner, D., & Hen, R. (1998). Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(24), 14476–14481. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14476>

Sadler AM, Bailey SJ (2016). Repeated daily restraint stress induces adaptive behavioural changes in both adult and juvenile mice. *Physiol Behav*.167, 313-323.

Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., & Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5634), 805–809.

Sadaghiani, M. S., Javadi-Paydar, M., Gharedaghi, M. H., Fard, Y. Y., & Dehpour, A. R. (2011). Antidepressant-like effect of pioglitazone in the forced swimming test in mice: the role of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway. *Behavioural brain research*, 224(2), 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.06.011>

Sankowski, R., Monaco, G., & Prinz, M. (2022). Evaluating microglial phenotypes using single-cell technologies. *Trends in neurosciences*, 45(2), 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.11.001>

Smith, B. L., et al. (2016). Divergent effects of repeated restraint versus chronic variable stress on prefrontal cortical immune status after LPS injection. *Brain, Behavior, and Immunity*, 57, 263–270.

Svenningsson, P., Tzavara, E. T., Liu, F., Fienberg, A. A., Nomikos, G. G., & Greengard, P. (2002). DARPP-32 mediates serotonergic neurotransmission in the forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 3188–3193. <https://doi.org/10.1073/pnas.052712699>

Tan, S. Y., & Yip, A. (2018). Hans Selye (1907-1982): Founder of the stress theory. *Singapore medical journal*, 59(4), 170–171. <https://doi.org/10.11622/smedj.2018043>

Tan, YL., Yuan, Y. & Tian, L. Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Mol Psychiatry* 25, 351–367 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0609-8>

Villapol S. (2018). Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma on Brain and Peripheral Inflammation. *Cellular and molecular neurobiology*, 38(1), 121–132. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0554-5>

Walker, F. R., et al (2013). Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. *Current Drug Targets*, 14(11), 1262–1276.

Wang Y, Xu J, Liu Y, Li Z, Li X. TLR4-NF-κB 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.

Wang, Y. et al(2019). Icariin Attenuates M1 Activation of Microglia and Aβ Plaque Accumulation in the Hippocampus and Prefrontal Cortex by Up-Regulating PPARγ in Restraint/Isolation-Stressed APP/PS1 Mice. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 291.

Weber, M. D., et al (2019). The Influence of Microglial Elimination and Repopulation on Stress Sensitization Induced by Repeated Social Defeat. *Biological Psychiatry*, 85(8), 667–678.

Wohleb, E. S., et al (2018). Stress-Induced Neuronal Colony Stimulating Factor 1 Provokes Microglia-Mediated Neuronal Remodeling and Depressive-like Behavior. *Biological Psychiatry*, 83(1), 38–49.

Xiang, W., Shi, R., Kang, X. *et al.* Monoacylglycerol lipase regulates cannabinoid receptor 2-dependent macrophage activation and cancer progression. *Nat Commun* 9, 2574 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04999-8>

Xu X, Zeng X-Y, Cui Y-X, Li Y-B, Cheng J-H, Zhao X-D, et al. Antidepressive Effect of Arctiin by Attenuating Neuroinflammation via HMGB1/TLR4- and TNF- $\alpha$ /TNFR1-Mediated NF- $\kappa$ B Activation. ACS Chemical Neuroscience. 2020;11(15):2214-30.

Yang, Y., Wang, H., Kouadri, M. *et al.* Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis* 10, 128 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1413-8>

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(3):e01525.

Zoppi S et al., (2011). Regulatory Role of Cannabinoid Receptor 1 in Stress-Induced Excitotoxicity and Neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology*, 36, 805–818.

