



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ADRIANO JOSÉ MAIA CHAVES FILHO

**AUTOFAGIA COMO MECANISMO SUBJACENTE AO EFEITO
IMUNOMODULADOR DO CANABIDIOL EM MICRÓGLIA HUMANA:
RELEVÂNCIA PARA EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO**

FORTALEZA

2023

ADRIANO JOSÉ MAIA CHAVES FILHO

**AUTOFAGIA COMO MECANISMO SUBJACENTE AO EFEITO
IMUNOMODULADOR DO CANABIDIOL EM MICRÓGLIA HUMANA:
RELEVÂNCIA PARA EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Neuropsicofarmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Macêdo

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C438a Chaves-Filho, Adriano José Maia.
Autofagia como Mecanismo Subjacente ao Efeito ao Efeito Imunomodulador do Canabidiol em
Micrógliã Humana : : Relevância para Efeito tipo-Antidepressivo / Adriano José Maia Chaves-Filho. – 2023.
214 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

1. Micrógliã. 2. Autofagia. 3. Canabidiol. 4. Neuroinflamação. 5. Depressão. I. Título.

CDD 615.1

ADRIANO JOSÉ MAIA CHAVES FILHO

**AUTOFAGIA COMO MECANISMO SUBJACENTE AO EFEITO
IMUNOMODULADOR DO CANABIDIOL EM MICRÓGLIA HUMANA:
RELEVÂNCIA PARA EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Neuropsicofarmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Macêdo

Aprovada em: __/__/__

Prof.^a Dr.^a. Danielle Macêdo Gaspar (orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a. Dr.^a. Francisca Cléa Florenço de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a. Lia Lira Olivier Sanders
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a. Carolina Demarchi Munhoz
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Nuno Jesus Machado
Champalimaud Research Center, Lisbon (PT)

Prof.^a Dr.^a. Camila Nayane de Carvalho Lima (Suplente)

THE UNIVERSITY OF TEXAS HEALTH SCIENCE CENTER AT HOUSTON

Prof.^a. Dr.^a. Mariana Lima Vale

Universidade Federal do Ceará (UFC) (Suplente)

**“É preciso sair da ilha,
para ver a ilha.**

**Não nós vemos, se não
saímos de nós.”**

(José Saramago)

AGRADECIMENTOS

Essa tese e os resultados aqui apresentados são fruto de cerca de 10 anos de trabalho e dedicação no Laboratório de Neuropsicofarmacologia, dos quais os últimos 3 anos foram dedicados de forma mais intensa a esse documento. Portanto, essa tese resulta da contribuição de muitas pessoas e de parcerias nacionais e internacionais desenvolvidas ao longo desses anos, as quais sou muito grato.

Inicialmente, gostaria de agradecer à minha mãe Ducélia sem a qual não seria possível que eu tivesse ingressado em uma Universidade Pública Federal para cursar Medicina e a posteriori me apaixonasse pela carreira científica, me inserindo na Pós-Graduação. Mãe, seu exemplo de força, perseverança, simplicidade e capacidade de não desistir me levaram até aqui, e tenho certeza que continuarão me levando mais longe.

À minha avó Idelzuíte, a qual desde muito cedo me incutiu o gosto e dedicação pelo estudo. Mesmo depois de muito tempo, as memórias de “conjugação de verbos e da tabuada” são muito fortes e contribuíram grandemente para o cientista que sou hoje. Sou muito grato à senhora.

Ao meu marido João Lucas, que me conheceu no começo dessa carreira durante a graduação. Obrigado por ter me ouvido tantas vezes, outras tantas me apoiado e continuar ao meu lado nos meus objetivos acadêmicos, profissionais e de vida. A ciência nos colocou distantes (em termos continentais), mas nosso amor e vínculo nos manteve próximos. Seu carinho, amor e cuidado foram essenciais até agora e continuarão a ser nessa nova jornada.

Ao meu irmão Felipe e meu (pai)-drasto Acácio por todo apoio e suporte nesses anos. Muito obrigado!

Às minhas bebês felinas, Brigitte e Marie, por todo amor nesses anos. Família é onde há amor.

À Professora Danielle Macêdo, a qual tem sido fonte de inspiração há cerca de 10 anos. Sou grato por todos os ensinamentos e oportunidades.

Às minhas queridas alunas que hoje chamo com todo orgulho de “colegas” Michelle Verde-Ramo e Paloma Jucá. Sou muito grato por toda ajuda, apoio, disponibilidade nos experimentos relacionados a essa tese e em tantos outros projetos que vocês aceitaram desenvolver comigo. Sou muito grato pela confiança e confio plenamente em vocês. Tenho certeza do futuro brilhante que terão e fico feliz ter contribuído com isso.

Também aos meus queridos alunos de iniciação-científica, Caio e Raul, dos quais sou avó-científica. Sou muito grato por toda ajuda e perseverança, e me sinto honrado de poder ter contribuído para a formação de vocês.

Às minhas amigas e companheiras de Laboratório: Tatiana, Poliana, Charliene, João Victor, Talita, Alana, Dino, Viviane, Michele Jales e Marylane por toda ajuda nos experimentos e apoio para seguir em frente. Obrigado por não me deixarem abalar pelas dificuldades e me ajudarem a ver sempre o lado mais positivo das situações.

À Universidade de Aarhus (Dinamarca) pela oportunidade de ter uma experiência internacional em pesquisa, por me fornecer o ambiente para aprender novas técnicas e conduzir ensaios complementares aos resultados apresentados nessa tese, e por me permitir colaborações valiosas. Mesmo por um tempo mais curto do que o esperado, essa experiência me mudou muito profissionalmente e pessoalmente, e sou grato pelo crescimento que isso representou.

À Professora Sâmia Joca, agradeço por todo apoio e colaboração nesse projeto. Sua participação foi essencial, e sou muito grato por todas as contribuições técnicas e intelectuais.

À Cláudia Cecchi (Claudinha) e Jayashree (Jay) por todo apoio, amizade e ensinamentos durante minha estadia na Universidade de Aarhus, Dinamarca.

Aos meus amigos queridos e colegas de laboratório que fiz em Aarhus, especialmente Eleni Sia e Matti e Ane Guldager. Vocês foram tão essenciais para me manter forte nos meus objetivos, obrigado por todo apoio, conselhos, companhia e horas de escuta. Miss you so much!

À Profa Carolina Horta por ter aberto às portas do Laboratório de Modelagem Molecular e Desenvolvimento de Fármacos (LabMol) - UFG e por ter me dado a oportunidade de conhecer e me dedicar a técnicas de bioinformática e desenvolvimento de drogas. Sou muito grato e tenho certeza que nossa parceria continuará por muitos anos.

Às professoras do Laboratório de Neuropsicofarmacologia Cléa Florenço, Silvânia Vasconcelos, Marta Fonteles e Glauce Viana por terem me acompanhado em todos esses anos no laboratório e contribuído para o cientista que sou hoje.

Aos Professores pesquisadores, membros dessa banca de defesa de doutoramento, que gentilmente aceitaram esse convite, e o qual sou grandemente grato pela atenção e apontamentos para o melhoramento desse trabalho.

Aos demais professores da Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará que tive a oportunidade de conhecer e absorver o conhecimento repassado.

Aos funcionários e servidores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos.

À Pós-graduação em Farmacologia, à Faculdade de Medicina e à Universidade Federal do Ceará por terem contribuído para a formação do ser cientista que sou hoje. Sou eternamente grato por todas as oportunidades e crescimento. Pretendo retribuir direta- e indiretamente com tudo que for possível para o crescimento e defesa da Universidade Pública a fim de garantir que outros também possam ter acesso às oportunidades que tive.

Ao CNPQ, CAPES, FUNCAP e FAPESP pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho.

Às instituições dinamarquesas, Lundbeck Fonden, Jascha Fonden e Aarhus University Research Foundation.

Aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

De modo geral, agradeço a todos que acreditam e torcem por mim. Espero poder retribuir às expectativas e contribuir para a construção de uma sociedade mais justa por meio da Ciência.

RESUMO

O Canabidiol (CBD) é um composto da *Cannabis sativa* com efeitos imunomoduladores e potencial terapêutico em diversas doenças do SNC. Uma vez que a autofagia foi eleita como um mecanismo importante para o controle das funções microgliais, incluindo respostas inflamatórias, o objetivo deste estudo foi investigar o papel da (macro)-autofagia nos efeitos do CBD em micróglia humanas ativadas. Para isso, no protocolo *in vitro*, células microgliais humanas HMC3 foram tratadas com CBD (1, 10, 50 e 100 μ M) e 24h depois foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) por mais 24h (prevenção ou pré-tratamento). Além disso, outro grupo de células foi primeiramente exposto ao LPS por 24 horas, depois tratado com CBD (reversão ou pós-tratamento). Hidroxicloroquina (HCQ-10 μ M) e privação de soro (STV por 2h) foram usados como inibidor e indutor de autofagia, respectivamente. A viabilidade celular foi avaliada através dos ensaios de MTT e LDH. A formação de organelas vesiculares ácidas (AVOS) foi determinada por meio do ensaio de laranja de acridina por citometria de fluxo. A expressão gênica das proteínas relacionadas à autofagia (ATGs) ATG5, ATG12, BECLIN-1 e p62/SQSTM1 foi determinada por *real time*-PCR. A expressão proteica das LC3B-I e LC3B-II, e p62/SQSTM1 foi determinada por western blott. Os sobrenadantes foram coletados para determinação de nitrito, TNF α , IL-1 β , IFN γ , IL-4 e TGF- β , BDNF e atividade da arginase (Arg). A expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e Arg1 foi determinada por imunofluorescência. Atividade fagocítica foi medida através da detecção intracelular de esferas marcadas com fluoresceína; a migração celular foi avaliada através do ensaio de arranhão (*scratch assay*). No protocolo *in vivo*, camundongos *Swiss* machos foram tratados com HCQ (60 mg/kg, IP.) diariamente por 03 dias. No segundo dia, os animais receberam LPS (0.5 mg/kg, IP) ou salina (SAL), e no terceiro dia, foram tratados com CBD (10 mg/kg, IP), S-cetamina (10 mg/kg, IP) ou SAL. Foram realizados ensaios comportamentais para efeito tipo-antidepressivo, e as áreas cerebrais córtex pré-frontal (PFC) e hipocampo (HC) foram dissecadas. No protocolo *in vitro*, o CBD aumentou a % de células AVOS+ no protocolo de reversão em comparação com o LPS, o que foi bloqueado pelo co-tratamento com HCQ. STV aumentou o % de células AVOS+ em ambos os protocolos em comparação com os controles. O CBD aumentou os níveis de RNAm de ATG5 e p62/SQSTM1 no protocolo de prevenção, e ATG12 e p62/SQSTM1 no protocolo de reversão, em comparação com o LPS. O CBD no protocolo de reversão diminuiu significativamente os níveis de p62/SQSTM1 em comparação com os grupos controle e LPS. O CBD (10 μ M) atenuou o aumento induzido por LPS nos níveis de nitrito, TNF- α e IL-1 β em ambos os protocolos. O CBD aumentou os níveis de IL-4 e BDNF em ambos os protocolos,

enquanto a atividade da arginase e TGF- β aumentaram apenas no protocolo de reversão. O STV em ambos os protocolos aumentou os níveis de mediadores anti-inflamatórios, e o co-tratamento com HCQ atenuou os efeitos do CBD na expressão desses marcadores. O CBD aumentou a atividade fagocitária e a migração celular em comparação com o grupo LPS. Esses efeitos foram igualmente bloqueados pela HCQ. No protocolo *in vivo*, o CBD parcialmente reverteu o comportamento tipo-depressivo induzido pelo LPS, restaurando o comportamento de autocuidado e reduzindo a latência no teste de alimentação suprimida pela novidade, o que foi atenuado pelo co-tratamento com HCQ. O CBD aumentou a expressão de LC3B-II no PFC, enquanto a S-cetamina aumentou essa proteína no HC em relação ao grupo LPS. Apenas a S-cetamina foi capaz de reduzir as concentrações de TNF α no HC dos animais desafiados com LPS. Em conjunto, nossos dados demonstram o efeito do CBD de promover indução de autofagia sobretudo nos estágios finais de degradação lisossomal em micróglia humanas desafiadas com LPS, o que parece ser fundamental para suas ações imunomoduladoras nessas células. Finalmente, agentes indutores de autofagia, como o CBD, podem ser ferramentas promissoras para o tratamento de doenças do SNC relacionados à neuroinflamação e disfunção microglial, como a depressão.

Palavras-Chaves: Micróglia; Autofagia; Canabidiol; Neuroinflamação; Depressão.

**AUTOPHAGY AS UNDERLYING MECHANISM FOR THE
IMMUNOMODULATORY EFFECT OF CANNABIDIOL IN HUMAN MICROGLIA:
RELEVANCE FOR ITS ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECT**

ABSTRACT

Cannabidiol (CBD) is a non-psychostimulant compound from *Cannabis sativa* with immunoregulatory effects and therapeutic potential in several brain disorders. Since autophagy has been elected as an important mechanism for the control of microglial functions, including inflammatory responses, the aim of this study was to investigate the role of (macro)-autophagy in the CBD effects in pro-inflammatory activated human microglia. To do this, human microglia cells (HMC3 lineage) were treated with CBD (1, 10, 50 and 100 μ M) and 24h later they were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) for more 24h (prevention protocol or pretreatment). Also, other batch of cells were firstly exposed to LPS for 24 h, and 24h later treated with CBD (reversal protocol or post-treatment). Hydroxychloroquine (HCQ-10 μ M) and starvation (STV) (2h) were used as autophagy inhibitor and inducer, respectively. Cell viability was evaluated through MTT and LDH assays. The formation of acidic vesicular organelles (AVOS) was determined through acridine-orange flow cytometry. Autophagy-related proteins (ATGs) gene expression (ATG5, ATG12, BECLIN-1 and p62/SQSTM1) was determined through RT-PCR. The protein expression of the isoforms LC3B-I and LC3B-II, an index of maturation of autophagosomes, and p62/SQSTM1, an index of degradation of the autophagic cargo, were determined through western blott. Supernatants were collected for determination of nitrite, TNF α , IL-1 β , IFN γ , IL-4 and TGF- β , brain-derived neurotrophic levels (BDNF) and arginase activity. Also, the expression of the enzymes inducible nitric oxide synthase (iNOS) and Arginase1 (Arg1) was determined through immunofluorescence and their colocalization was evaluated. Phagocytosis was evaluated through fluorescein-labeled beads intracellular detection; migration-mobility was evaluated through *scratch* assay. In the *in vivo* protocol, adult *Swiss* mice were treated with HCQ (60 mg/kg, IP.), daily, for three days. On the second day, the animals were injected with LPS (0.5 mg/kg, IP) or saline (SAL), and on the third day, they were treated with CBD (10 mg/kg, IP), S-ketamine (10 mg/kg, IP) or SAL. Several behavioral assays were performed to evaluate the CBD's antidepressant-like effect, and the mouse brain areas: prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HC) were collected. CBD increased the % of AVOS+ cells just in the reversal protocol compared to LPS, which was blocked by HCQ. STV increased AVOS+ cells in both protocols compared to controls. CBD increased some ATGs mRNA levels: ATG5 and p62/SQSTM1 in the prevention, and ATG12

and p62/SQSTM1 in the reversal protocol, compared to LPS. Additionally, CBD in the reversal protocol did not significantly increase the LC3B-I or II protein expression, but it significantly decreased the p62/SQSTM1 levels compared to control and LPS groups. CBD (10 μ M) attenuated LPS-induced increase in nitrite levels, TNF- α and IL-1 β in both protocols. CBD increased IL-4 and BDNF levels in both protocols, while arginase activity and TGF- β were increased only in the reversal one. STV in both protocols similarly increased the levels of anti-inflammatory mediators: IL-4, arginase activity and TGF- β compared to the LPS group. HCQ co-treatment attenuated CBD effects in the reversal protocol on nitrite and TNF- α levels, and significantly reduced the rise in IL-4, BDNF and arginase activity. CBD increased phagocytic activity in the reversal protocol, and increased cell migration in both protocols compared to LPS group. These effects were equally blocked by HCQ in the reversal protocol. In the *in vivo* protocol, CBD partially reversed LPS-induced depressive-like behavior, which was attenuated by co-treatment with HCQ. CBD increased the expression of LC3B-II in the PFC, while S-ketamine increased this protein in the HC compared to the LPS group. Only one S-ketamine was able to reduce TNF α concentrations in the HC of LPS-challenged animals. Therefore, this study contributes to a better understanding of the effects of CBD in microglia by providing evidence of the participation of autophagy-related mechanism to its immunoregulatory/anti-inflammatory actions. Finally, autophagy-inducer agents, possibly CBD, can be promising tools for microglia-related neuroinflammatory disorders, such as depression.

Keywords: Microglia; Autophagy; Cannabidiol; Neuroinflammation; Depression.

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|-----|
| Quadro 1. Características farmacocinéticas do CBD em humanos..... | 41 |
| Quadro 2. Estratégia de <i>gates</i> para determinação de Vesículas Ácidas (AVOS) por citometria de fluxo..... | 78 |
| Quadro 3. Sequência dos alvos gênicos e primers utilizados para a técnica de qPCR..... | 81 |
| Quadro 4. Estratégia de <i>gates</i> para a imunofenotipagem por marcadores de superfície (CD11b, CD86 e CD200R) por citometria de fluxo | 84 |
| Quadro 5. Delineamento experimental do protocolo in vivo..... | 90 |
| Quadro 6. Fotomicrografias de imunoexpressão de iNOS (Vermelho), Arg1 (Verde), DAPI (Azul) e Merge (sobreposição de todos os canais) pré-tratamento.. | 107 |
| Quadro 7. Fotomicrografias de imunoexpressão de iNOS (Vermelho), Arg1 (Verde), DAPI (Azul) e Merge (sobreposição de todos os canais)..... | 108 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Estrutura química e distribuição 2D-3D do CBD e delta-9-THC..... | 42 |
| Figura 2. Alvos moleculares envolvidos nos efeitos farmacodinâmicos do CBD. | 45 |
| Figura 3. Etapas da (macro)-autofagia.. | 48 |
| Figura 4. Via canônica da autofagia..... | 59 |
| Figura 5. Curva de concentrações do CBD nos ensaio de citotoxicidade por MTT e atividade da enzima LDH em células microglias HMC3..... | 90 |
| Figura 6. Efeito do CBD (10 µM) sozinho ou combinado com HCQ (10 µM) nos protocolos de pré- e pós-tratamento com LPS em células microgлияis HMC3. | 92 |
| Figura 7. . Avaliação quantitativa do ensaio de formação de vesículas ácidas (AVOS) | 94 |
| Figura 8. Representativos do ensaio de AVOS por citometria de fluxo do protocolo de pré-tratamento. Efeito do CBD (10 µM) sozinho ou combinado com HCQ (10 µM) em células microgлияis desafiadas com LPS..... | 95 |
| Figura 9. Representativos do ensaio de AVOS por citometria de fluxo do protocolo de pós-tratamento. Efeito do CBD (10 µM) sozinho ou combinado com HCQ (10 µM) em células microgлияis desafiadas com LPS..... | 96 |
| Figura 10. Expressão das proteínas LC3B isoformas I e II, relação LC3BII/LC3BI e p62/SQSTM1..... | 98 |
| Figura 11. Efeito do CBD (10 µM) nos protocolos de pré- (gráficos A,C,E,G) e pós-tratamento (B,D,F,H) na expressão relativa dos genes relacionados à autofagia (ATGs) RNAm..... | 100 |
| Figura 12. Efeito do CBD (10 µM) sozinho ou combinado com HCQ (10 µM) nos protocolos de pré- (A,C,E,G) e pós-tratamento (B,D,F,H) com LPS em células microgлияis HMC3 na expressão de marcadores de polarização pró-inflamatória no sobrenadante das células em cultivo | 103 |
| Figura 13. Efeito do CBD (10 µM) sozinho ou combinado com HCQ (10 µM) nos protocolos de pré- (A,C,E,G) e pós-tratamento (B,D,F,H) com LPS em células microgлияis HMC3 na expressão de marcadores de polarização anti-inflamatória | 105 |
| Figura 14. Efeito do CBD (10 µM) nos protocolos de pré- (A,C,E) e pós-tratamento (B,D,F) com LPS em células microgлияis HMC3 na expressão de iNOS (A-B), Arg1 (C-D), bem como coeficiente de correlação (E-F)..... | 108 |
| Figura 15. Efeito do CBD (10 µM) no protocol de pré-tratamento na expressão e detecção de células marcadas para os receptors de superfície CD11b, CD86 e CD200R | 112 |

| | |
|---|-----|
| Figura 16. Efeito do CBD (10 μ M) no protocolo de pós-tratamento na expressão e detecção de células marcadas para os receptores de superfície CD11b, CD86 e CD200R. | 115 |
| Figura 17. Efeito do CBD (10 μ M) nos protocolos de pré- (A,C,E) e pós-tratamento (B,D,F) nos quadrantes de células duplamente marcadas com receptores de superfície CD11b, CD86 e CD200R. | 117 |
| Figura 18. Representativos do ensaio de imunofenotipagem por citometria de fluxo do protocolo de pré-tratamento. | 119 |
| Figura 19. Representativos do ensaio de imunofenotipagem por citometria de fluxo do protocolo de pós-tratamento. | 121 |
| Figura 20. Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) nos protocolos de pré- (A,C) e pós-tratamento (B,D) em células microgliais HMC3 nos ensaios de formação de EROS intracelulares por NBT e por DCFDA. | 123 |
| Figura 21. Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) nos protocolos de pré- (A) e pós-tratamento (B) em células microgliais HMC3 no ensaio de atividade fagocítica. | 124 |
| Figura 22. Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) no ensaio <i>scratch</i> de motilidade celular em células microgliais HMC3 (protocolo de pré-tratamento). | 126 |
| Figura 23. Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) no ensaio <i>scratch</i> de motilidade celular em células microgliais HMC3 (protocolo de pós-tratamento). | 127 |
| Figura 24. Efeito do CBD nos animais expostos ao modelo induzido por LPS e co-tratados com HCQ no teste do campo aberto e NSFT | 131 |
| Figura 25. Efeito do CBD nos animais expostos ao modelo induzido por LPS e co-tratados com HCQ no teste do splash e no teste do FST | 134 |
| Figura 26. Efeito do CBD e co-tratamento com HCQ na expressão proteica das isoformas LC3B-I e LC3B-II e relação entre elas no cérebro de animais expostos ao LPS | 136 |
| Figura 27. Efeito do CBD e co-tratamento com HCQ na expressão proteica das citocinas pró-inflamatórias TNF α e IL-1 β no PFC e HC de animais expostos ao LPS. | 138 |
| Figura 28. Esquema integrativo dos resultados desse estudo. | 154 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – Serotonina

5-HTT – Transportador de Serotonina

μ l – microlitro

μ M – micromolar

$^{\circ}$ C – grau Celsius

ATC – antidepressivos tricíclicos

Arg - Arginase

ATG – *autophagy related genes*

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

CA - *cornu ammonis*

CBD - Canabidiol

CEUA - Comissão de ética no uso de animais

COX-2 – Ciclooxigenase-2

cm – centímetro

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CPF – córtex pré-frontal

CMS – Modelos de estresse leve crônico

CREB – Proteína Ligante ao Elemento Responsivo ao AMPc

DG - giro denteado

DSM - *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*

EDTA – ácido tetra acético etilenodiamina

ROS – espécies reativas de oxigênio

ESC – Escitalopram

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GDNF – fator neurotrófico derivado da glia

GMPc – Monofosfato Cíclico de Guanosina

GSH – Glutathiona reduzida

GSK3 – glicogênio sintase quinase 3

h – hora

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HCQ - hidroxicloroquina

HC – hipocampo

HPA – eixo hipotálamo-pituitária

HT – Hipotálamo

IL – Interleucina

IDO – Indoleamino-2,3-di-oxigenase

IFN- γ – Interferon- γ

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzível

ISRS - inibidor seletivo de recaptção de serotonina

i.p. – intraperitoneal

i.c.v – Intra-cérebro ventricular

Kg – quilograma

LPS – Lipopolissacarídeo

MAO – monoamina oxidase

MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno

MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos-1

MDD – Transtorno Depressivo Maior

mg – miligrama

ml – mililitro

mM – milimolar

MyD88 – proteína de resposta primária de diferenciação mieloide 88

NADPH – fosfato dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

ng – nanograma

NGF - fator de crescimento neural

nm – nanômetro

nM – nanomolar

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONOO- - Peroxinitrito

pH – potencial hidrogeniônico

PFC – córtex pré-frontal

RNAm – ácido ribonucléico mensageiro

RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

rpm – rotação por minuto

SNC – sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

TIR – domínio citoplasmáticos tipo Toll/1L-1R

TLR – receptor Toll-like

TNF: fator de necrose tumoral

TRAM – molécula adaptadora relacionada ao TRIF

TRIF – Adaptador contendo domínio TIR induzindo Interferon- β

TrkB – tirosina quinase B

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| 1. INTRODUÇÃO | 22 |
| 1.1. Aspectos gerais e epidemiológicos da Depressão | 22 |
| 1.2. Teoria Neuroimune da Depressão | 25 |
| 1.3. Comportamento de doença e depressão: interface entre inflamação, micróglia e comportamento | 27 |
| 1.4. Micróglia e Patogênese da Depressão: Um paradigma complexo | 33 |
| 1.5. Efeito anti-inflamatório e modulador microglial de drogas antidepressivas | 42 |
| 1.6. Drogas anti-inflamatórias com efeito antidepressivo | 45 |
| 1.7. Canabidiol: perfil farmacocinético e farmacodinâmico | 48 |
| 1.8. Canabidiol: potencialidade como novo agente antidepressivo | 53 |
| 1.8.1. Evidências em modelos animais e modelos <i>in vitro</i> | 54 |
| 1.8.2. Evidências Clínicas | 58 |
| 1.9. Efeitos neuroimunes do Cannabidiol: Foco na micróglia | 61 |
| 1.9.1. Estudos pré-clínicos <i>in vitro</i> | 62 |
| 1.9.2. Estudos pré-clínicos <i>in vivo</i> | 63 |
| 1.9.3. Estudos clínicos | 65 |
| 1.10. Autofagia: Conceito e Relevância para Homeostasia do Sistema Nervoso Central .. | 66 |
| 1.11. Autofagia e regulação das funções de Micróglia e Macrófagos | 78 |
| 1.12. Autofagia e Depressão: Interface com Sistema Imune | 86 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 92 |
| 3. OBJETIVOS | 94 |
| 4. MATÉRIAS E MÉTODOS | 96 |
| 5. RESULTADOS | 117 |
| 5.1. Efeito citotóxico e curva de concentrações do CBD após 24 e 48 horas | 117 |

| | |
|--|-----|
| 5.2. Efeito do CBD e HCQ nos ensaios de citotoxicidade nos protocolos de pré- e pós-tratamento com LPS | 119 |
| 5.3. Efeito do CBD e combinação com HCQ no ensaio de vesículas ácidas (<i>acidic vesicular organelles</i> , AVOS) | 121 |
| 5.4. Efeito do CBD na expressão protéica das isoformas de LC3B (I e II), taxa de conversão LC3B-II/LC3B-I e expressão da proteína p62/SQSTM1 | 125 |
| 5.5. Efeito do CBD na expressão (RNAm) de genes relacionados à autofagia (ATGs) | 127 |
| 5.6. Efeito do CBD e combinação com HCQ nos marcadores de polarização pró-inflamatória | 130 |
| 5.7. Efeito do CBD e combinação com HCQ nos marcadores de polarização anti-inflamatórios | 133 |
| 5.8. Efeito do CBD na expressão e co-localização de Arginase1 (Arg1) e iNOS..... | 136 |
| 5.9. Efeito do CBD na expressão de marcadores de superfície de polarização pró- e anti-inflamatória..... | 141 |
| 5.10. Efeito do CBD e combinação com HCQ nos níveis de EROS intracelulares | 152 |
| 5.11. Efeito do CBD e combinação com HCQ na atividade fagocítica no ensaio de beads fluorescentes | 154 |
| 5.12. Efeito do CBD e combinação com HCQ na motilidade celular no ensaio de <i>Scratch</i> .. | 155 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 167 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 190 |
| 8. REFERÊNCIAS | 192 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais e epidemiológicos da Depressão

Os transtornos mentais são um problema importante de saúde pública ao redor do mundo. Aproximadamente 1 em cada 4 pessoas irá experimentar um episódio severo de algum transtorno mental durante seu tempo de vida. O potencial de morbidade dessas doenças é enorme, sendo responsável por cerca de 19.5% da carga global de doença, medido pelos anos ajustados de vida com disfunção (do inglês *disability adjusted life years*, DALYs). Isso se reflete em um grande custo socioeconômico da ordem de pelo menos 348 milhões de dólares nos Estados Unidos (EUA) ao ano, e um grande impacto nos setores produtivos da sociedade por afetarem sobretudo uma faixa etária de indivíduos economicamente ativos. Em muitos países, os transtornos neuropsiquiátricos são a principal causa de absenteísmo e presenteísmo no trabalho, além de outros custos diretos e indiretos associados ao serviço de saúde (GREENBERG et al., 2021).

Nesse contexto, a depressão maior (do inglês *major depressive disorder* ou MDD), aqui referida simplesmente como depressão, é o transtorno de humor mais prevalente no mundo, e estima-se que mais de 280 milhões de pessoas no mundo sejam afetadas por essa doença (SANTOMAURO et al., 2021). Segundo a organização mundial de saúde (OMS), o número estimado de pessoas com depressão aumentou em 18,4% entre os anos de 2005 a 2018 (WHO | DEPRESSION, 2018). Esse transtorno é caracterizado por diversos grupos de sintomas, como humor deprimido, perda de interesse, sentimento de culpa, distúrbios do sono ou do apetite, capacidade reduzida de concentração, baixa energia e deficiências cognitivas (KENNEDY, 2008). Embora a ausência de informação direta sobre a prevalência da depressão em muitos países dificulte a realização de um panorama mundial preciso, dados epidemiológicos mostram uma grande variabilidade nas taxas de prevalência: de 2.2% no Japão a 10.4% no Brasil (BROMET et al., 2011). De fato, no Brasil, a doença atinge cerca 11,5 milhões de pessoas, embora com estimativas ainda pouco precisas. É a maior prevalência da América Latina e a segunda maior do continente americano, ficando atrás dos Estados Unidos (WHO | DEPRESSION, 2018).

Com a pandemia de SARS-CoV2, a incidência de depressão e outros transtornos psiquiátricos foi consideravelmente aumentada (COVID-19 MENTAL DISORDERS COLLABORATORS, 2021; ROBINSON et al., 2022). De fato, estudos de meta-análise dos primeiros anos pandêmicos 2021-2022 demonstraram um aumento global da incidência de depressão da ordem de 27.6% em relação as estimativas pré-pandêmicas, o que representam um aumento de pelo menos 53.2 milhões de casos da doença. Dois fatores aparentaram impactar de forma mais significativa nessas estimativas: i) as taxas de infecção aguda por SARS-CoV2; ii) a redução de mobilidade humana e isolamento social representado pela pandemia (COVID-19 MENTAL DISORDERS COLLABORATORS, 2021). Pessoas do sexo feminino e jovens (<60 anos) foram mais afetados do que outros grupos de pacientes (ROBINSON et al., 2022). Ademais, é importante ressaltar que altas taxas de sintomas depressivos e comorbidades psiquiátricas estão presentes em pacientes com síndrome pós-COVID19 (cerca de 35% dos pacientes). Entre esses sintomas se destacam fadiga anormal, comprometimento cognitivo, dificuldades de sono, e prejuízo de funcionalidade global, os quais foram identificados em avaliações até 02 anos após resolução da infecção aguda por SARS-CoV2 (MAZZA et al., 2022). Portanto, a pandemia agravou ainda mais um problema urgente e reforçou a necessidade de estratégias de saúde eficazes para promoção de saúde mental.

A década de 1950 foi considerada a "década de ouro" da psicofarmacologia, devido à introdução de muitas drogas psicoativas utilizadas atualmente. Os primeiros avanços na farmacoterapia da depressão com a descoberta das propriedades antidepressivas de iproniazida, como um inibidor da enzima monoamina-oxidase, datam desse período. Em sequência, a imipramina, o protótipo dos antidepressivos tricíclicos, foi desenvolvido baseado na estrutura das fenotiazidas com propriedades antipsicóticas e sedativas (ALAMO; LÓPEZ-MUÑOZ, 2009). No final da década de 1980, a fluoxetina foi introduzida na prática clínica, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de uma nova classe de antidepressivos chamados inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRS)(LÓPEZ-MUÑOZ; ALAMO, 2009). Estes antidepressivos trouxeram dois grandes contribuições para o campo da psiquiatria: i) forneceram uma ferramenta terapêutica útil e relativamente segura para o tratamento de pacientes com depressã; ii) deram origem à primeira hipótese fisiopatológica da depressão, a teoria monoaminérgica (CHOCKALINGAM; GOTT; CONWAY, 2019).

Apesar do entusiasmo inicial, nos últimos anos, a eficácia dos antidepressivos monoaminérgicos tem sido intensamente questionada. Em 2006, um dos maiores ensaios clínicos multicêntricos testou a eficácia de diversos antidepressivos orais na prática clínica. Esse ensaio foi conduzido pelo Instituto Nacional de Saúde Mental (NIMH) dos EUA, e recebeu o nome de estudo STAR * D (Alternativas de Tratamento Sequencial para Aliviar a Depressão) (FAVA et al., 2003). Esse grande ensaio clínico, incluindo mais de 2500 pacientes de 41 centros clínicos dos Estados Unidos, trouxe resultados surpreendentes: i) menos de um terço dos pacientes (27%) alcançaram remissão dos sintomas depressivos no prazo de 12 semanas de tratamento após início do tratamento com antidepressivos, e cerca de 33% dos pacientes não atingiram remissão, apesar de tentativas com até quatro esquemas diferentes de antidepressivos. Além disso, no subgrupo de doentes que responderam ao tratamento, o tempo médio para a remissão foi de 7 semanas, com pouca diferença entre os regimes de monoterapia ou com medicamentos adjuvantes (PIGOTT, 2015; RUSH et al., 2006). Outros estudos evidenciaram a eficácia limitada dos fármacos antidepressivos monoaminérgicos e seu tempo de latência prolongado (CIPRIANI et al., 2018; MACHADO-VIEIRA et al., 2010). Portanto, tendo em vista o impacto global da depressão, o qual foi acentuado após a pandemia, há uma grande necessidade por novas alternativas terapêuticas mais eficazes e rápidas para os pacientes com esta doença.

Ademais, no começo dos anos 2000, um grupo de pesquisadores clínicos liderados pelos Dr. Dennis Charney e Dr. Jhon Krystal demonstraram em um ensaio clínico preliminar envolvendo apenas 7 pacientes com depressão, a eficácia surpreendente do análogo a fenciclidina, a cetamina (BERMAN et al., 2000). Essa droga até então utilizada como anestésico central por suas propriedades analgésicas e hipnóticas, demonstrou um efeito antidepressivo surpreendente, emergindo em horas, sendo capaz de reduzir em cerca de 50% dos sintomas depressivos após 2 horas de sua infusão. Ademais, nesse estudo inicial, o efeito antidepressivo da cetamina foi demonstrado ser sustentado, garantido uma remissão dos sintomas depressivos, até 07 dias após uma única infusão (BERMAN et al., 2000). Esse estudo foi seguido por ensaios clínicos randomizados e controlados que comprovaram a eficácia da cetamina em doses subanestésicas (0.5-1.0 mg/kg) como antidepressivo de ação rápida, sendo capaz de induzir remissão mesmo em grupos de pacientes de difícil manejo clínico, como pacientes com depressão-resistente e ideação suicida (GÁLVEZ et al., 2014; HOCHSCHILD; GRUNEBAUM; MANN, 2021). Em

conjunto, essas evidências contribuíram para a aprovação pelo Food and Drug Administration (FDA) em 2019 da primeira formulação intranasal de S-cetamina, um dos enantiômeros da cetamina, para o tratamento dos pacientes com depressão resistente. Apesar do grande potencial da cetamina de superar as limitações associadas aos antidepressivos monoaminérgicos, efeitos colaterais severos agudo, como efeito dissociativo e alucinatório (DEL SANT et al., 2022), e crônicos, como comprometimento cognitivo e potencial de abuso (LIU et al., 2016; MORGAN et al., 2014), trazem preocupações acerca do uso amplo dessa droga como estratégia antidepressiva.

1.2. Teoria Neuroimune da Depressão

A primeira teoria biológica da depressão, foi chamada de teoria monoaminérgica. Ela propunha que um déficit no conteúdo cerebral de monoaminas neurotransmissoras (serotonina, dopamina e noradrenalina) e alterações de seus receptores e sistema de recaptação seria responsável pelo desenvolvimento da depressão. Essa teoria foi reforçada pelo achado de que as primeiras drogas com efeito antidepressivo clinicamente apreciável tinham como alvos de seu mecanismo a transmissão monoaminérgica: os inibidores da enzima MAO (iMAO). Nas décadas subsequentes, outras classes de drogas cujo mecanismo ainda envolvia alvos monoaminérgicos foram desenvolvidas, como antidepressivos tricíclicos (ATC), inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e antidepressivos duais (ELHWUEGI, 2004). Porém, na última década, grandes limitações associadas a terapêutica com essas drogas tem se tornado evidente, bem como o esvaziamento de novos alvos terapêuticos eficazes na neurotransmissão monoaminérgica (PIGOTT, 2015).

Considerando novos achados clínicos e pré-clínicos, novas teorias neurobiológicas tem sido propostas para a fisiopatologia da depressão (CHAVES-FILHO et al., 2019; WANG et al., 2020). Desde o início da década de 1990, evidências acerca do papel da inflamação na fisiopatologia da depressão têm sido propostas. De fato, uma das primeiras evidências clínicas veio do estudo de Maes et al., 1991 que demonstrou uma hiper-resposta pró-inflamatória de linfócitos periféricos extraídos do sangue de pacientes deprimidos, indicada pelos níveis elevados de IL-1 β e de receptores de IL-2 (MAES et al., 1991). A

fim de contextualização, a imunidade classicamente é uma resposta complexa do organismo dividida em: repostas celulares (tipo Th1), humorais ou mediadas por anticorpos (tipo Th2) e inatas mediadas por células monocíticas e polimorfonucleares. Em relação a resposta tipo Th1 ela é orquestrada pela interação entre os linfócitos T e os monócitos e macrófagos, importante braço da resposta tipo-inata (CHAVES FILHO et al., 2018). Assim, o primeiro passo das repostas celulares é a apresentação do microorganismo invasor ou antígenos pelas células monocíticas ou apresentadoras de antígenos (APCs) a linfócitos T, T auxiliares (CD4+) e T citotóxicos (CD8+), com a produção de citocinas por essas últimas células, como as IFN- γ and IL-2. Essas citocinas por sua vez agem nas células da resposta inata, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias pleiotrópicas, como IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF α , que subsequentemente podem ativar os próprios monócitos/macrófagos (em uma alça autócrina/parácrina) como também retroestimular os linfócitos T, garantindo uma coordenação fina entre as repostas de defesa inata e adaptativas (BAKUNINA; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2015; CAÑAS-GONZÁLEZ et al., 2020)

Em pacientes com depressão, diversas evidências apontam para uma suprarregulação de marcadores de resposta Th1 e da resposta inata. De fato, comparado com indivíduos saudáveis, pacientes com depressão apresentam níveis aumentados de IFN- γ e altas taxas de IFN- γ /IL-4 e IFN- γ /TGF- β (indicativo do balanço Th-1/Th2) (FELGER; LOTRICH, 2013; MAES, 1999, 2011). Esses pacientes também apresentam níveis elevados de marcadores de ativação de células T, como aumento da contagem de células CD25+ e do receptor solúvel de IL-2, e marcadores de ativação macrofágica, como neopterin e IL-12 (CAPURON et al., 2009; MAES et al., 1995). Ademais, níveis séricos elevados de citocinas pró-inflamatórias pleiotrópicas e associadas com a resposta imune inata, como IL-1 β , IL-6, e TNF- α . Além de níveis basais elevados de citocinas pró-inflamatórias, pacientes com depressão também respondem a eventos estressores (principais fatores associados a agudização e piora dos sintomas) com aumento desses marcadores (HAAPAKOSKI et al., 2016).

De fato, foi demonstrado que indivíduos com depressão quando expostos a um evento estressor psicológico, como se apresentar publicamente, demonstram aumento dos níveis séricos de IL-6 e da sinalização do fator nuclear kappa B (NFkB) em monócitos circulantes (PACE et al., 2006). Na mesma direção, pacientes deprimidos demonstram níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias após um teste de entrevista, bem como

uma resposta inibida aos glucocorticóides (PACE; HU; MILLER, 2007). Por fim, níveis de IL-6 séricos constantemente altos em adolescentes é capaz de predizer a emergência de sintomas depressivos nos 6 meses subsequentes (MILLER, G. E.; COLE, 2012).

Outra linha de evidências que reforça a associação entre depressão e inflamação advém de estudos em pacientes expostos a citocinas exógenas ou voluntários saudáveis expostos a agentes imunogênicos, como microorganismos e citocinas exógenas (CHAVES-FILHO et al., 2019). Nesse ínterim, a condição mais bem documentada se refere ao uso de IFN α para o tratamento de alguns tipos de neoplasia e infecções virais (CHIU et al., 2017; LOTRICH, 2009). De fato, pacientes tratados com essa citocina comumente apresentam um espectro de sintomas que mimetiza a depressão idiopática, como fadiga, anedonia, ansiedade, alterações de sono e de apetite (LOTRICH, 2009; RUSSELL et al., 2019). Ademais, o tratamento com IFN α causa aumento dos níveis séricos de IL-1 β , IL-6, e TNF α , ao mesmo tempo que aumenta os níveis de IL-6 e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP1) no líquido cefalorraquidiano (LCR) (LOTRICH, 2009).

Outros estudos tem demonstrado que voluntários saudáveis expostos à endotoxina bacteriana lipopolissacarídeo (LPS) apresentam em poucas horas após a infusão o desenvolvimento de sintomas depressivos e ansiosos, e a severidade desses sintomas se correlaciona positivamente com a elevação sérica de citocinas pró-inflamatórias (VAN EEDEN et al., 2020). Também, indivíduos saudáveis expostos a vacinação contra *Salmonella typhi*, um potente imunógeno, desenvolvem sintomas que lembram depressão idiopática após administração aguda (BAKEER et al., 2019). Portanto, em conjunto, essas evidências advogam para o importante papel de um estado alterado pró-inflamatório para a emergência de sintomas depressivos. A seguir, discutiremos a participação das células microgliais na fisiopatologia da depressão e os achados de alterações nessas células com relevância para a depressão.

1.3. Comportamento de doença e depressão: interface entre inflamação, micróglia e comportamento

Os seres humanos estão constantemente sendo agredidos por estímulos infecciosos e pró-inflamatórios, como toxinas e traumas estéreis. A interação entre respostas imuno-mediadas e expressão fenotípica de transtornos psiquiátricos foi inicialmente discutida

em 1890, quando Emil Kraepelin, um dos fundadores da psiquiatria moderna, descreveu durante uma epidemia de influenza 11 casos de transtornos psiquiátricos com sintomas mistos, como humor deprimido, síndrome paranóica e alucinatória, movimentos involuntários e deterioração cognitiva (Ebert e Bär, 2010). Kraepelin postulou neste ensaio programático que os sintomas psiquiátricos induzidos pela inflamação constituem uma resposta de adaptação contra fatores exógenos, como infecções (Munjal et al., 2017). Quase no mesmo período, William Osler propôs o conceito de que a inflamação sistêmica pode modificar o comportamento, como por exemplo durante infecções bacterianas graves. Osler propôs a apatia como critério diagnóstico de "septicemia progressiva" (Lasselin et al., 2021). Mais de vinte anos depois, Benjamin Hart primeiramente descreveu que o animal febril é mais sonolento, inativo e menos propenso a gastos metabólicos adicionais (Hart, 1988).

Existem também inúmeros outros relatos de condições psiquiátricas, como alterações de humor, sintomas cognitivos e psicose, induzidos durante e após infecções virais, bacterianas e fúngicas agudas (Brown et al., 2009; Müller, 2015; Munjal et al., 2017). Nos diagnósticos modernos, sintomas psiquiátricos coexistindo com infecções graves são diagnosticados como "transtornos mentais devido a uma condição médica geral". Os fatores que influenciam a apresentação psiquiátrica das infecções são objeto de intensa pesquisa e podem incluir o patógeno, o histórico médico do indivíduo, sobretudo outras comorbidades neuropsiquiátricas, e o local da infecção (Müller, 2015). Por questões nítidas de infecção-inflamação local, as infecções do SNC, como meningites e encefalites, estão mais comumente associadas a sintomas psiquiátricos do que em os órgãos periféricos, embora infecções periféricas também possam cursar com sintomas psiquiátricos (Munjal et al., 2017).

Um exemplo interessante dessa associação vem de um estudo dinamarquês prospectivo de base populacional envolvendo mais de 3,6 milhões de pessoas (Benros et al., 2013). Esses participantes foram acompanhados de 1977 a 2010, e todas as pessoas foram rastreadas para diagnóstico de transtornos afetivos (transtornos de humor e ansiedade) de acordo com a Classificação Internacional de Doenças 10ª Revisão (CID-10), bem como número de infecções e internações devido a sintomas psiquiátricos. Nessa população, esses pesquisadores descobriram que a hospitalização por qualquer infecção aumentou significativamente o risco de transtorno de humor posterior em 63% [taxa de taxa de incidência (IRR) 1,63] e a hospitalização por doença autoimune aumentou

significativamente o risco de depressão em 45% [IRR 1,45] (Benros et al., 2013). Ambos os fatores de risco interagiram e foram associados a um risco 2,35 maior de ter um transtorno afetivo grave. Curiosamente, o risco de um episódio de humor com necessidade de hospitalização aumentou com a proximidade do tempo da infecção, com o maior risco no primeiro ano [IRR 2,70] (BENROS et al., 2013).

Como mencionado, um conceito muito bem relacionado à infecção-inflamação induzindo sintomas psiquiátricos é o comportamento tipo-doença (DANTZER, 2001). Esculpido por Dantzer, 2001, este modelo baseia-se na observação de que níveis sistêmicos aumentados de mediadores pró-inflamatórios, como IL-6 e TNF α , estão associados ao surgimento de uma gama de sintomas com relevância translacional para alguns transtornos afetivos e de humor, como a depressão (DANTZER, 2001). Esses sintomas incluem anergia, mal-estar, sonolência, retardo psicomotor, anedonia, déficits cognitivos e perda da libido, e podem ser interpretados no sentido de limitar o gasto energético e o metabolismo cerebral para direcionar energia e recursos para combater a ameaça primária, como infecções (DANTZER; KELLEY, 2007).

Consistentemente, a administração experimental em roedores e humanos de inflamatórios, como a endotoxina bacteriana LPS, Bacillus Calmette-Guerin (BCG) ou *Salmonella typhi*, induz uma gama de sintomas neuropsiquiátricos, genericamente compreendidos como “comportamento doentio”, que têm sido relacionados a esses capacidade de estímulos para ativar uma resposta pró-inflamatória sistêmica e promover a transformação pró-inflamatória da micróglia (LASSELIN, 2021). Nesse contexto, a administração periférica de LPS é o modelo experimental mais amplamente utilizado de comportamento doentio induzido por inflamação, tanto em animais quanto em humanos (LASSELIN et al., 2021). A administração periférica de LPS imita aspectos importantes de infecções bacterianas Gram-negativas, como a ativação do mesmo receptor de reconhecimento de padrão (ou seja, receptor Toll-like 4) (RADULOVIC et al., 2018). Além disso, uma das respostas mais confiáveis do hospedeiro à infecção bacteriana Gram-negativa, ou seja, o aumento nos níveis circulantes das proteínas de fase aguda, proteína C-reativa e citocinas pró-inflamatórias, é imitado com sucesso pela injeção periférica de LPS em animais e humanos (LASSELIN, 2021; NORDGREEN et al., 2018).

Em roedores e em humanos, injeções intravenosas (iv) ou intraperitoneais (ip) de LPS induzem um aumento precoce na concentração plasmática do fator de necrose tumoral (TNF)- α , que atinge o pico em cerca de 2 h, seguido de perto por um pico de IL-6 (EGGESBØ et al., 1996; RAMÍREZ et al., 2019). Em humanos, o aumento da gravidade dos sintomas da doença foi observado no mesmo período de tempo, caracterizado por um pico claro de fadiga, redução do apetite e redução do interesse social, geralmente 2 a 3 horas após a injeção de LPS. Além disso, sintomas negativos de humor e ansiedade foram claramente apresentados por participantes saudáveis injetados por via intravenosa com LPS horas após a injeção (GRIGOLEIT et al., 2011). Portanto, esses estudos apresentam coletivamente evidências convincentes que demonstram a capacidade dos mediadores inflamatórios de potencializar emoções negativas. Mais recentemente, estudos de imagem em humanos e roedores descreveram alterações induzidas por citocinas e LPS na conectividade cerebral (HARRISON et al., 2016) e mostraram sobreposição substancial com as regiões cerebrais ativadas após a administração de LPS em animais (FRITZ et al., 2020).

Experimentos em modelos animais fornecem evidências mais diretas para um papel da micróglia no comportamento tipo-doença induzido por LPS e outras alterações comportamentais relevantes para depressão (WANG et al., 2022a). É digno de nota que há evidências convincentes mostrando a capacidade do desafio sistêmico de LPS em camundongos e ratos induz uma transformação pró-inflamatória da micróglia, com um aumento no número, taxas de proliferação e alterações morfológicas em direção a um fenótipo amebóide (LIVELY; SCHLICHTER, 2018; YE et al., 2020). Além disso, o desafio com LPS é capaz de induzir programas transcricionais microgliais, como fator nuclear kappa B (NFkB) e família de receptores semelhantes a NOD, via do inflamassoma contendo domínio de pirina 3 (NLRP3), aumentando expressão microglia de citocinas pró-inflamatórias (como IL-6, IL1 β , IL-18 e TNF α), espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) e óxido nítrico (NO) (KANG et al., 2019, p. 20).

Evidências adicionais que sustentam o envolvimento da micróglia no comportamento tipo- doença induzido por LPS com relevância para depressão, são: (i) sintomas do tipo-depressivo induzidos por LPS podem ser atenuados pelo tratamento com o inibidor microglial minociclina (HENRY et al., 2008); (ii) a ativação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) na micróglia é essencial para o desenvolvimento de comportamento

do tipo depressivo e ativação microglial induzida por LPS (O'CONNOR et al., 2009); e (iii) camundongos com hiper-reatividade pró-inflamatória microglial, induzida por uma mutação específica da microglia (deficiência do receptor fractalkine, CX3CR1) exibem sintomas do tipo-depressivo induzidos por LPS exacerbados (CORONA et al., 2013).

Como os macrófagos na periferia respondendo a estímulos pró-inflamatórios, a micróglia atua como a primeira linha de defesa no sistema nervoso central (SNC). Além de detectar sinais de microorganismos, ao identificar sinais de lesão celular, como aumentos extracelulares de cálcio e liberação de adenosina trifosfato (ATP) de células vizinhas, a micróglia move rapidamente seus prolongamentos em direção ao local da lesão e promove uma resposta pró-inflamatória (WANG et al., 2022). Em várias infecções bacterianas e virais, patógenos induzem secreção aumentada de citocinas pró-inflamatórias na periferia, cujos níveis plasmáticos estão correlacionados com a gravidade dos sintomas neuropsiquiátricos (FEKETE et al., 2018; MEINHARDT et al., 2021). Neste contexto, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) está associada a uma elevada prevalência de depressão e outros sintomas afetivos e cognitivos (SAYLOR et al., 2016). A neuroinflamação induzida pela micróglia pode ser particularmente responsável por esta condição psiquiátrica, uma vez que o vírus rapidamente ganha acesso ao cérebro onde infecta principalmente a micróglia (mas não os neurônios) e induz sua ativação. Estudos em infectados pelo HIV mostram que o vírus libera duas proteínas específicas, gp120 (glicoproteína 120 kDa) e Tat (transativador de transcrição), que induzem ativação microglial acentuada (WALLET et al., 2019). Neste contexto, a microglia anormalmente reativa tem sido associada a uma variedade de consequências neurodegenerativas e neuroinflamatórias, juntamente com o surgimento de anormalidades cognitivas e sintomas depressivos (VARNUM; IKEZU, 2012).

Não apenas microrganismos ou padrões moleculares associados a patógenos derivados (PAMPs) são capazes de promover sintomas neuropsiquiátricos importantes, mas também evidências translacionais apontam que o tratamento com citocinas pró-inflamatórias exógenas pode induzir um espectro semelhante de anormalidades neuroimunes (DANTZER E KELLEY, 2007). . Digno de nota, os IFNs são uma superfamília de citocinas pró-inflamatórias que desempenham um papel nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Essas citocinas são usadas no tratamento de uma variedade de condições clínicas, como doenças autoimunes (por exemplo, esclerose múltipla), virais (por exemplo, hepatite B e C crônica) e neoplasias (por exemplo, melanoma maligno,

leucemia de células pilosas) (PESTKA; KRAUSE; WALTER, 2004). No entanto, os sintomas adversos neuropsiquiátricos são um efeito problemático comum e grave desta terapia. Neste contexto, uma porção significativa de pacientes apresentam sintomas agudos significativos da doença, como fadiga, mal-estar, mialgia, artralgia, anorexia, apatia e alterações cognitivas. Uma proporção menor, mas ainda significativa, desenvolve transtornos psiquiátricos graves, principalmente depressão (LOTRICH, 2009)

Nesse sentido, a prevalência de depressão induzida por IFN α pode chegar a 70% em algumas populações clínicas. O pico dos sintomas depressivos é comumente visto no início da terapia, entre 4 e 16 semanas de exposição (LOTRICH, 2009). No entanto, há relatos de recorrência de depressão e pensamentos suicidas mesmo 6 meses após o término do tratamento antiviral (HORIKAWA et al., 2003). Além disso, um estudo prospectivo de base populacional em Taiwan estabeleceu uma ligação associativa entre a depressão induzida por IFN- α e o aumento do risco de depressão recorrente ao longo de 12 anos de acompanhamento (CHIU et al., 2017). No entanto, nem todos os pacientes desenvolvem depressão ou outras condições psiquiátricas importantes. Tem sido sugerido que alguns fatores clínicos aumentam o risco de depressão após exposição ao IFN, quais sejam: (i) história prévia de depressão antes da terapia; (ii) aumento dos níveis de IL-6, IL-10 e receptor solúvel de IL-2 (sIL-2R) após exposição ao IFN; (iii) resposta exagerada do eixo hipotálamo-hipófise adrenal (HHA) após a primeira dose de IFN α , medida pelos níveis reativos de corticosterona plasmática, e (iv) alguns polimorfismos associados à inflamação, como o polimorfismo AG do gene da ciclo-oxigenase 2 (COX2) (rs4648308); polimorfismo GG do gene da fosfolipase A2 (PLA2) (rs10798052); e polimorfismo CC na região promotora do gene que codifica indoleamina-2,3-dioxigenase 1 (IDO1) (rs9657182) (PINTO; ANDRADE, 2016).

Além disso, em estudos experimentais, há evidências de suporte para a ativação pró-inflamatória da microglia induzida por IFN como um fator subjacente para o espectro de sintomas neuropsiquiátricos associados (KANEKO; NAKAMURA; SAWAMOTO, 2020; ZHENG et al., 2014). De fato, os camundongos tratados com IFN α (durante 4 semanas) mostraram comportamento semelhante à depressão que foi emparelhado por supressão acentuada da proliferação de células-tronco neurais (NSC) e diferenciação reduzida em neurônios recém-nascidos na zona neurogênica ventricular (ZHENG et al., 2014). Mais recentemente, o mesmo grupo de pesquisa demonstrou que os efeitos deste IFN α são dependentes da indução da produção endógena da mesma citocina na microglia,

juntamente com o desenvolvimento de um fenótipo pró-inflamatório. Por sua vez, o IFN α derivado da micróglia agindo via receptor de IFN tipo 1 (IFNAR) expresso em NSC suprimiu sua proliferação e induziu um comportamento semelhante à depressão. Curiosamente, ambas as anormalidades celulares e comportamentais induzidas por IFN α foram inibidas pelo tratamento supressor da microglia com minociclina (ZHENG; KANEKO; SAWAMOTO, 2015).

Portanto, desafios inflamatórios periféricos e centrais podem afetar o comportamento e levar ao desenvolvimento de sintomas relacionados à depressão. Infecções, citocinas pró-inflamatórias, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) podem provocar respostas inflamatórias sistêmicas, por meio da estimulação de células imunes periféricas e secreção de mediadores inflamatórios, que por sua vez transmitem esses sinais sobre o estado imunológico sistêmico à microglia por meio de vias humorais e neurais (DANTZER E KELLEY, 2007). Em condições normais, as interações entre as células imunes periféricas e a microglia são reguladas pelo plexo coróide e pela barreira-hematoencefálica. Sob condições patológicas (por exemplo, infecção, exposição a citocinas, trauma), as funções de barreira ficam comprometidas e as células imunes da periferia podem entrar no parênquima cerebral e modular a resposta inflamatória de células residentes (WANG et al., 2022). Independentemente da sua origem, se de origem infecciosa, PAMPs e/ou DAMPs, bem como os mediadores inflamatórios e neurotransmissores, esses estímulos atuam diretamente na micróglia via receptores específicos, promovendo a secreção de mediadores inflamatórios adicionais que, por sua vez, resultam em maior ativação microglial e possivelmente no desenvolvimento de sintomatologia neuropsiquiátrica relacionada (LASSELIN, 2021).

1.4. Micróglia e Patogênese da Depressão: Um paradigma complexo

Como mencionado anteriormente, nos últimos cinquenta anos, a desregulação da neurotransmissão monoaminérgica, incluindo serotonina e dopamina, foi uma teoria amplamente aceita para explicar a patofisiologia da depressão. Ela foi baseado na observação fortuita de que a maioria das drogas antidepressivas atuais agem aumentando a biodisponibilidade sináptica de monoaminas (por exemplo, inibidores de

transportadores de recaptção, inibidores de enzimas degradantes) (ELHWUEGI, 2004). No entanto, o aumento da percepção da ineficácia e o tempo de latência prolongado para início da ação dos antidepressivos monoaminérgicos, juntamente com os progressos mais recentes na compreensão dos correlatos moleculares e celulares da depressão, levaram ao desenvolvimento de outras hipóteses para explicar a complexa neurobiologia dessa doença. (TROUBAT et al., 2021). Esse é o caso da hipótese neuroinflamatória da depressão, na qual a micróglia tem papel central. Conceitualmente, a neuroinflamação refere-se aos processos inflamatórios adaptativos que ocorrem no SNC para neutralizar a infecção, eliminar detritos celulares e geralmente proteger a integridade do SNC. Como um componente essencial do repertório imunológico inato do SNC, a micróglia como células imunes residentes do cérebro desempenham um papel importante na orquestração das respostas inflamatórias cerebrais (TROUBAT et al., 2021).

No cérebro adulto, a microglia está envolvida em várias atividades neurais e funções imunológicas. Sob condições fisiológicas, a micróglia permanece no fenótipo quiescente, mas altamente ativo e está envolvida em várias funções de suporte de sinapses, como a secreção de fatores neurotróficos, fagocitose ativa de restos celulares e poda de sinapses disfuncionais. Curiosamente, a interação micróglia-sinapse é particularmente sensível aos níveis de atividade neuronal, como estimulação/privação sensorial e tarefas específicas de aprendizado e memória (TREMBLAY; LOWERY; MAJEWSKA, 2010; WAKE et al., 2009). No entanto, quando o cérebro sofre injúria e a homeostase do microambiente neural é perturbada, a microglia muda sua estrutura e função para fenótipos reativos e secreta mediadores pró-inflamatórios/anti-inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, EROS e NO (Varnum & Ikezu, 2012). Nos últimos anos, tem ficado evidente que a reatividade microglial não é um processo “tudo ou nada”; ou seja, a microglia pode sofrer múltiplas alterações ou engajar em programas funcionais diversos, que conferem adaptação específica para o enfrentamento de diversas condições patológicas no CNS (TREMBLAY, 2021).

Após as primeiras proposições da associação entre inflamação anormal e depressão (MAES et al., 1991, p. 199; SMITH, 1991), várias linhas de pesquisa tem apontado o envolvimento de uma resposta pró-inflamatória anormal ou inflamação anormal de baixo grau nessa doença. Resumidamente, essas evidências compreendem: i) evidências diretas e meta-análise mostrando níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias no sangue e no soro de pacientes deprimidos, como TNF- α e IL-6 (DOWLATI et al., 2010; LIU et al.,

2020); ii) a associação direta entre os níveis periféricos de marcadores pró-inflamatórios e a gravidade dos sintomas depressivos e outros resultados clínicos relevantes (por exemplo, tempo de doença, perfil de resposta a antidepressivos e risco de depressão pós-parto) (LIU et al., 2020); iii) aumento da incidência de depressão e sintomas relacionados em condições inflamatórias crônicas, como doença arterial coronariana, artrite reumatóide e obesidade (ZHANG, 2021), e iv) a capacidade de agentes pró-inflamatórios exógenos citocinas e inflamatórios, como LPS, para imitar sintomas semelhantes aos da depressão e aumentar o risco de depressão e episódios recorrentes (no caso da terapia com IFN- α), conforme discutido anteriormente (FRITZ et al., 2020; LASSELIN, 2021).

Durante décadas, foi amplamente aceito que o envolvimento microglial na depressão era unicamente baseado numa resposta pró-inflamatória anormalmente aumentada. Embora essa hipótese tenha encontrado evidências que a suportem e podem explicar pelo menos parcialmente a base neuroimune de alguns subconjuntos clínicos de depressão, o cenário proposto mais recentemente parece ser mais complexo (YIRMIYA; RIMMERMAN; RESHEF, 2015). De fato, há evidências emergentes de que algumas condições patológicas crônicas, como infecções crônicas, doenças neurodegenerativas ou mesmo após estresse crônico, podem induzir um estado de disfunção microglial, marcado por declínio e senescência, chamado de estado “distrófico” (SHAHIDEHPOUR et al., 2021; YIRMIYA; RIMMERMAN; RESHEF, 2015). Esse estado microglial, que pode coexistir com estados microgliais pró-inflamatórios, pode impactar no comportamento, cognição e humor e pode ser duradouro. Nesse contexto, uma condição patológica na qual a estrutura e função microglial aberrante é o principal desencadeador dos sintomas e progressão da doença é considerada uma “microgliopatia” (BIANCHIN; SNOW, 2022). Portanto, foi levantada a hipótese de que a depressão pode ser interpretada como uma microgliopatia em que o “ganho de função” pró-inflamatório excessivo é inicialmente induzido após o estresse ambiental e outros eventos neuroimunes, como infecções e outros tipos de inflamação estéril, como estresse agudo, e ao longo da exposição crônica a esses eventos adversos da vida, ocorrem estados distróficos e disfuncionais, caracterizados por “perda de função” microglial, que juntos resultam em uma grande variedade de sintomas neurocomportamentais que caracterizam essa doença (YIRMIYA; RIMMERMAN; RESHEF, 2015).

Nesse contexto, o estado microglial em pacientes com depressão maior sem uma condição médica comórbida foi avaliado em amostras de cérebro humano post-mortem e usando

estudos de imagem PET (DUNLOP; MAYBERG, 2017). Em geral, vários estudos post-mortem obtiveram resultados negativos ou inconclusivos quando relacionados a marcadores de ativação microglial, provavelmente porque a depressão pode estar associada tanto à reatividade microglial quanto à distrofia e, portanto, a média do estado microglial em amostras inteiras pode levar a resultados inconclusivos (YIRMIYA; RIMMERMAN; RESHEF, 2015). Além disso, nível importante de evidências já demonstraram grande heterogeneidade microglial na morfologia e funções entre regiões do cérebro, e considerando que diferentes regiões do cérebro podem estar diferenciadamente envolvidas na resposta ao estresse crônico e na apresentação de diferentes sintomas de humor, isso também pode contribuir para a heterogeneidade dos achados relacionados aos estados microgliais obtidos de pacientes com depressão (HEALY; ZIA; PLEMEL, 2022).

Especificamente, um estudo post-mortem demonstrou a presença de fenótipos de micróglia reativa, definida pela marcação do antígeno leucocitário humano – isotipo DR (HLA-DR), em um dos seis pacientes com transtorno afetivo avaliados (Bayer et al., 1999), enquanto três estudos adicionais não relataram nenhuma diferença nas características microgliais analisadas (densidade e morfologia das células marcadas com Iba1 e co-imunoreatividade para CD68) no córtex cingulado anterior dorsal (ACC) e no córtex pré-frontal de pacientes deprimidos e controles (FOSTER et al., 2006; SCHNIEDER et al., 2014; TORRES-PLATAS et al., 2014). Portanto, a depressão associada ao suicídio tem sido mais fortemente associada a marcadores aumentados de reatividade microglial pró-inflamatória, definidos pela morfologia amebóide de células marcadas com Iba1 e aumento da co-imunoexpressão de CD68, bem como densidade elevada de macrófagos perivasculares, definidos pela alta expressão do marcador CD45 e da proteína quimioatraente de monócitos quimiocina 1 (MCP-1), ao redor dos vasos sanguíneos (SCHNIEDER et al., 2014). Curiosamente, uma análise post-mortem de cérebros de pacientes deprimidos unipolares revelou um aumento significativo no número de micróglia expressando ácido quinolínico (QUIN), uma neurotoxina derivada do triptofano. Esse aumento foi particularmente evidente no giro cingulado anterior subgenual e no ACC médio anterior, que contêm uma alta densidade de receptores glutamatérgicos, além de receptores NMDA e AMPA, que podem estar envolvidos na neurotoxicidade mediada por QUIN (STEINER et al., 2011).

Curiosamente, QUIN é um potente agonista dos receptores NMDA, com efeitos neurotóxicos marcantes, que envolvem receptores pré-sinápticos, disfunção energética, aumento do estresse oxidativo e interrupção da morte celular apoptótica. Ao longo da via da quinurenina, sob a ação sequencial das enzimas quinurenina-3-monooxigenase (KMO), quinureninase (KYNU) e ácido 3-hidroxiantranólico dioxigenase (3-HAO), os metabólitos, 3-hidroxiquinurenina (3-HK), O ácido 3-hidroxi antranílico (3-HANA) e QUIN são produzidos posteriormente (LUGO-HUITRÓN et al., 2013). Sob a ação de citocinas pró-inflamatórias, como IFN γ e IL-6, é induzida uma mudança no metabolismo do triptofano da síntese de serotonina para a via da quinurenina. A microglia pró-inflamatória reativa e os macrófagos produzem preferencialmente QUIN, através da superexpressão de KMO, enquanto os astrócitos, principalmente, superexpressam as quinureninas aminotransferases (KATs I-IV), produzindo o ácido quinurênico antagonista do receptor NMDA, que pode ter propriedades neuroprotetoras em algumas doenças do CNS (GUILLEMIN et al., 2001, 2005). Portanto, esses achados de síntese de QUIN específica de região aumentada, juntamente com co-localização aumentada com micróglia no ACC de pacientes suicidas deprimidos, destacam a hipótese de uma produção aumentada de QUIN pela micróglia nesta região que tem uma suscetibilidade específica ao débito anormal de glutamato, e conectaria a lacuna entre o desbalanço neuroquímico e patologia imuno-mediada na depressão, sobretudo com características suicidas (GONÇALVES DE ANDRADE; GONZÁLEZ IBÁÑEZ; TREMBLAY, 2022).

Em relação aos estudos de neuroimagem, um estudo pioneiro TSPO PET, usando o ligante [11C]PK-11195, não revelou diferença entre grupos deprimidos e controles em qualquer região do cérebro (HANNESTAD et al., 2013), enquanto um estudo subsequente, usando o PET ligando [18F]-FEPPA, relataram elevações significativas associadas à depressão na distribuição do volume TSPO no PFC, ínsula e córtex cingulado anterior (ACC) que se correlacionaram positivamente com a gravidade da depressão (SETIAWAN et al., 2015). Além disso, a ligação elevada de [11C] PK-11195 foi encontrada no hipocampo direito de pacientes eutímicos com transtorno bipolar, em comparação com controles saudáveis, com tendências para aumento da ligação no hipocampo esquerdo e diminuição da ligação no PFC dorsolateral esquerdo (HAARMAN et al., 2014). Um estudo adicional também relatou uma ligação elevada de [11C]PK-11195 no hipocampo de pacientes com esclerose múltipla que se correlacionou com sintomatologia depressiva (COLASANTI et al., 2016).

De fato, o estresse crônico é um fator de risco bem reconhecido para transtornos do humor, principalmente depressão. Nesse contexto, os modelos de estresse crônico podem recapitular várias características centrais desse transtorno. Entre esses modelos, o estresse moderado imprevisível crônico (CUMS) e o estresse de derrota social possuem uma forte validade translacional, devido a seus aspectos de construto, face e validade preditiva (NOLLET; LE GUIQUET; BELZUNG, 2013). Como mencionado acima, o eixo HPA é o principal sistema neuroendócrino interrompido em condições de estresse crônico. Embora os glicocorticóides sejam normalmente anti-inflamatórios, eles se tornam pró-inflamatórios em condições especiais, particularmente no cérebro (SUGAMA; KAKINUMA, 2020). Especificamente, após a exposição a estresse repetido, os glicocorticóides induzem um estado de ativação microglial com uma resposta exacerbada a desafios imunológicos subsequentes, como lesão, estresse ou infecção (SUGAMA; KAKINUMA, 2020). O papel dos glicocorticóides é evidenciado por achados de que o estresse psicológico crônico e a administração exógena de corticosterona aumentam o número microglial e a expressão de marcadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , IL-6 e inibidor de NF κ B α fosforilação, enquanto a inibição da produção de corticosterona por adrenalectomia ou o bloqueio das ações de seus receptores por meio do antagonista do receptor GR RU486 aboliu a proliferação microglial induzida por estresse agudo ou crônico e as respostas pró-inflamatórias (CHEIRAN PEREIRA et al., 2022; DELPECH et al., 2015). O estresse crônico também suprime a expressão microglial de genes envolvidos em funções anti-inflamatórias e neuroprotetoras dos glicocorticóides, como o zíper de leucina induzido por glicocorticóides (GILZ) e a proteína de ligação FK506-51 (FKBP51), o que contribui para o aumento da reatividade ao estresse do eixo HPA, medida pelos níveis séricos de corticosterona (SCHMIDT et al., 2015).

Além das influências diretas na reatividade do HPA, foi demonstrado que o estresse crônico é capaz de aumentar a liberação de DAMPs, também denominados alarminas, nas áreas cerebrais responsivas ao estresse, como o hipocampo e o hipotálamo. Essas moléculas podem sinalizar via microglial Toll-like receptor 4 (TLR4) na microglia e traduzir sinais de inflamação relacionados ao estresse para microglia e consequências neurodegenerativas (DELPECH et al., 2015). Especificamente, o estresse crônico induz a secreção do DAMP Hmgb1 pelas células danificadas, o que é necessário e suficiente para induzir estados pró-inflamatórios da microglia. Essas moléculas estimulam a microglia para a secreção de citocinas inflamatórias por meio da ativação do inflamassoma NRPL3

e causam disfunção das vias metabólicas da mitocôndria, como a mitofagia (XU et al., 2020). Além disso, a forma madura da IL-1 β , resultante da clivagem através da caspase-1 após a ativação de NRPL3, é produzida no cérebro durante a exposição a muitos tipos de estressores agudos e crônicos, desempenha um papel importante no desenvolvimento do comportamento tipo-depressão induzida por estresse crônico (XU et al., 2020). Camundongos geneticamente deficientes de receptores de IL-1 (IL-1R) são resistentes à ativação microglial induzida por estresse crônico e alterações comportamentais tipo-depressão (LOTRICH et al., 2014).

A ativação do sistema noradrenérgico também foi proposta para mediar a ativação microglial induzida por estresse psicológico, principalmente porque todos os estressores psicossociais induzem a liberação de catecolaminas, que sinalizam em muitos tipos de células imunes, bem como na microglia via receptores β -adrenérgicos (EIDEN, 2013). Papel dessa sinalização nas alterações microgliais induzidas pelo estresse foi demonstrado por descobertas de que os antagonistas dos receptores β -adrenérgicos, como o propranolol, podem bloquear os efeitos do estresse crônico repetido na reatividade pró-inflamatória microglial, indicado pela morfologia amebóide de células marcadas para Iba1 e a expressão de marcadores de superfície, como CD14, CD86 e TLR4 (WOHLEB et al., 2011).

Além disso, a comunicação bidirecional compreendida pelo eixo intestino-cérebro é outro sistema altamente envolvido nas respostas da microglia induzidas pelo estresse. Em geral, sabe-se que a microbiota intestinal influencia a estrutura, a migração e as funções de vários subconjuntos de células imunes. Consistentemente, a microbiota intestinal demonstrou controlar a maturação e o funcionamento da microglia em condições normais de estado estacionário (DESBONNET et al., 2014). Consequentemente, distúrbios nas bactérias intestinais podem resultar em alterações neurais, hormonais e comportamentais. Por exemplo, animais germ-free adultos são hiper-responsivos ao estresse, mostrando respostas HPA exageradas à contenção ou novos estressores ambientais, porém, ao mesmo tempo, eles mostraram um fenótipo microglial marcado por imaturidade imunológica e incapacidade de responder adequadamente a pró-inflamatórios estímulos imunológicos, como LPS, reforçando o importante papel da microbiota intestinal para a homeostase da microglia no cérebro adulto (ERNY et al., 2015, p. 2). Além disso, o tratamento com probióticos demonstrou reverter os sintomas tipo-depressão induzidos pelo estresse psicológico crônico em ratos (CHEVALIER et al., 2020). As vias de

comunicação entre o intestino e a microglia do cérebro ainda não estão totalmente elucidadas, mas sob certas condições, a exposição ao estresse aumenta a permeabilidade intestinal, permitindo que bactérias intestinais ou seus produtos (por exemplo, LPS) transloquem pela mucosa intestinal, estimulem o mecanismos imunes ao cérebro mencionados acima, e resultem em uma resposta microglial pró-inflamatória de forma conjunta com alterações comportamentais, como sintomas do tipo-depressão (ALMAND et al., 2022).

Embora os estudos discutidos acima forneçam fortes evidências para o envolvimento de estados pró-inflamatórios da microglia na depressão, outros estudos apontam que estados da microglia distrófica especialmente em regiões cerebrais associadas à neurogênese no adulto seriam achados-chave para a fisiopatologia da depressão (YIRMIYA; RIMMERMAN; RESHEF, 2015). Nesse sentido, embora em muitos estudos tenha sido associado a aumentos significativos nos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias e outros marcadores inflamatórios, como a PCR, outros estudos pacientes deprimidos apresentaram níveis normais ou mesmo reduzidos de tais marcadores inflamatórios e supressão imunológica (LUNING PRAK et al., 2022; OSIMO et al., 2020).

Como mencionado acima, estudos post-mortem e de PET comparando números microgliais e estados de reatividade em indivíduos deprimidos versus indivíduos de controle relataram resultados mistos ou negativos. Evidências para o status microglial suprimido em alguns pacientes deprimidos também foram fornecidas pela demonstração de reduções no número de células gliais (mas não nos neurônios) no cíngulo anterior subgenua (COTTER et al., 2001), bem como uma tendência à reatividade microglial reduzida (detectado por imagens de PET com o ligante TSPO [11C]PBR28) em muitas áreas do cérebro em pacientes deprimidos (HANNESTAD et al., 2013). Além disso, o declínio microglial e a senescência, em humanos e em animais experimentais, foram encontrados em várias condições neurodegenerativas, incluindo o envelhecimento, que estão associadas ao aumento da prevalência de depressão (SHAHIDEHPOUR et al., 2021).

Em modelos animais, também há evidências de apoio para o envolvimento de fenótipos distróficos da microglia na depressão. No modelo genético de depressão em ratos (linhagem de ratos Flinders sensíveis), os níveis de PCR foram significativamente mais baixos do que em animais de controle, juntamente com neurogênese prejudicada e disfunção mitocondrial no hipocampo (CARBONI et al., 2010). Além disso, evidências

seminais fornecidas por Kreisel et al, 2015 demonstraram o curso das alterações da microglia em camundongos submetidos a um modelo CUMS. Esses autores mostraram que, após exposição curta e imprevisível ao estresse (2-5 dias), a microglia mostra sinais de reatividade pró-inflamatória e proliferação no hipocampo, especialmente no nicho neurogênico do giro denteado. No entanto, com a exposição crônica (5 semanas), o modelo de estresse induz um fenótipo de microglia distrófica, marcado por redução do número de microglia, redução de ramificações e arborização da microglia e aumento de marcadores pró-apoptóticos, que é seguido por neurogênese prejudicada e comportamento do tipo-depressão (KREISEL et al., 2014).

Esses achados foram confirmados por evidências subsequentes demonstrando que diferentes paradigmas de estresse crônico, como estresse de derrota social repetido (por 20 dias), estresse crônico imprevisível (por 6 semanas) e estresse de contenção repetido (por 4 semanas), todos comumente resultaram em reduções no número de microglia, bem como redução do comprimento de seus processos, área de soma e marcadores de ativação microglial no hipocampo, mas não no córtex (TONG et al., 2017). Curiosamente, em todos esses modelos de estresse crônico, depois de estabelecidas as características distróficas da microglia, apenas agentes imunoestimulantes, como LPS, fator estimulador de colônias de macrófagos granulócitos (GM-CSF) ou fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), poderiam restaurar as características da microglia e recuperar a neurogênese do hipocampo e o comportamento tipo-depressão (KREISEL et al., 2014; TONG et al., 2017).

Nesse contexto, a importante contribuição da microglia para os processos de neuroplasticidade, como alterações na estrutura e funcionamento das sinapses, neurogênese e suporte neurotrófico, pode explicar o envolvimento fundamental da supressão dessas funções homeostáticas na gênese da depressão após exposição ao estresse crônico. Digno de nota, o funcionamento normal da microglia é uma característica fundamental para a neurogênese normal no cérebro adulto. Algumas descobertas que suportam esta afirmação são: (i) o nível basal de proliferação microglial na região neurogênica da zona subventricular (SVZ) é muito maior do que nas áreas vizinhas do prosencéfalo (GOINGS; KOZLOWSKI; SZELE, 2006); (ii) a microglia é crucial para a rápida depuração de neurônios recém-nascidos apoptóticos por meio da fagocitose, e a inibição dessa depuração é prejudicial para a neurogênese (LU et al., 2011); (iii) em condições particulares, a microglia secreta citocinas pró-neurogênicas e

fator neurotrófico, como o BDNF, que induzem a proliferação, diferenciação, manutenção e migração de neurônios recém-nascidos (PARKHURST et al., 2013); (iv) enriquecimento ambiental e até terapia eletroconvulsiva, que confere resiliência ao estresse e exerce efeitos antidepressivos sustentados e de ação rápida, respectivamente, não apenas aumenta a neurogênese, mas também induz a proliferação e reatividade leve da microglia, representada pela morfologia amebóide das células marcadas com Iba1 (GOLDFARB et al., 2021; NIKOLAKOPOULOU et al., 2013); (v) o tratamento farmacológico de ação rápida recentemente aprovado para a depressão, o antagonista NMDA, cetamina, também promove um fenótipo microglial reativo que aumenta os contatos da microglia e a remodelação da matriz extracelular juntamente com a restauração da neuroplasticidade juvenil no cérebro adulto, porém esse não foi acompanhado de fenótipo pró-inflamatório (VENTURINO et al., 2021).

Portanto, tomadas em conjunto, as evidências clínicas e pré-clínicas defendem um importante envolvimento de anormalidades da microglia na fisiopatologia da depressão, a ponto de pelo menos algumas formas de depressão poderem ser consideradas microgliopatias. Nesse sentido, desvios nas funções homeostáticas da microglia, nos quais estados pró-inflamatórios anormais de “ganho tóxico de função”, bem como supressão ou declínio da microglia, estados de “perda patológica de função” podem estar subjacentes à fisiopatologia da depressão. A restauração da homeostase da microglia em ambos os estados patológicos, em vez da visão simplista da supressão anti-inflamatória da microglia, deve ser buscada como uma estratégia terapêutica para a depressão (YIRMIYA; RIMMERMAN; RESHEF, 2015). Além disso, apesar de promissoras, a maioria das evidências clínicas são baseadas na ligação TSPO-PET ou estudos post-mortem inconsistentes, portanto, estudos adicionais devem estabelecer a relação entre os subtipos depressivos clínicos e o estado microglial/inflamatório correspondente, auxiliando na implementação da modulação da microglia entre as abordagens antidepressivas.

1.5. Efeito anti-inflamatório e modulador microglial de drogas antidepressivas

Várias evidências indicam que os antidepressivos atualmente aprovados, além de seus alvos monoaminérgicos, também têm efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores

marcantes. Nesse contexto, Tynan et al., 2012 trouxeram evidências importantes comparando os efeitos de diferentes inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), incluindo fluoxetina, sertralina, paroxetina, fluvoxamina e citalopram) e um inibidor da recaptação da serotonina e da noradrenalina (IRSN) venlafaxina em células microglia (linha de camundongo BV2) desafiadas por LPS. Os ISRSs inibiram mais potentemente a produção microglial de TNF- α e NO 4 e 24h após a exposição ao LPS. Além disso, esse efeito foi associado à capacidade dos ISRS de aumentar a produção intracelular de cAMP e a ativação de PKA, uma vez que essa inibição da quinase bloqueou a ação desses antidepressivos nas culturas de micróglia (Tynan et al., 2012). Em concordância, também foi demonstrado que diferentes classes de monoamina AD, com destaque para o ISRS fluvoxamina, o SNRI reboxetina ou o inibidor não seletivo monoaminérgico da recaptação imipramina, inibiram significativamente a produção de IL-6 e NO de maneira dose-dependente na microglia murina estimulado com IFN- γ (Hashioka et al., 2007). Além disso, a amitriptilina e seu metabólito nortriptilina em concentrações que podem ser alcançadas no plasma e nas estruturas cerebrais durante o tratamento inibiram significativamente a secreção de IL-1 β e TNF- α em culturas mistas de células gliais e microgliais primárias de ratos desafiadas com LPS (Obuchowicz et al., 2006). Curiosamente, uma meta-análise recente de estudos pré-clínicos compilou 24 estudos in vitro analisando ISRS, antidepressivos tricíclicos (TCA), SNRI e inibidores da monoamina oxidase em diferentes modelos de cultura (micróglia primária de camundongo ou rato e linhas celulares) expostos a diferentes estímulos inflamatórios, como como LPS, IFN- γ e TNF- α . Em conjunto, sua análise revelou uma redução nos marcadores pró-inflamatórios da microglia (IL-6, TNF- α , IL-1 β ou iNOS) principalmente para SSRIs e TCAs, mas não para SNRIs. Além disso, para fluoxetina, citalopram, clomipramina, paroxetina e sertralina, foi observado um efeito significativo relacionado à concentração, com doses mais altas associadas à maior redução nos marcadores inflamatórios específicos da microglia, notadamente TNF- α , IL-1 β e iNOS (Nicolai, Nettesheim, Witte, et al., 2023).

Em modelos in vivo, o mesmo cenário foi replicado. Os antidepressivos clássicos, em especial os ISRS, demonstraram sua capacidade de neutralizar a reatividade da microglia em vários modelos associados à neuroinflamação, incluindo acidente vascular cerebral isquêmico, esclerose múltipla, epilepsia, hemorragia subaracnoide e lesão cerebral traumática (Lim et al., 2009; Nicolai, Nettesheim, Witte , e outros, 2023). Em modelos

de estresse, as ações modulatórias da microglia de antidepressivos monoaminérgicos foram testadas em diferentes paradigmas de estresse, como CRS, CUMS e CUS. Nesse contexto, a fluoxetina mostrou capacidade de inibir o aumento induzido por CUMS do marcador microglia (Iba1) e das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IFN- γ e TNF- α no giro denteado do hipocampo (DG) (Nieto-Quero et al., 2021). Achados semelhantes de inibição de estados pró-inflamatórios microgliciais foram relatados para outros SSRI sertralina no modelo CUMS (Y. Lu et al., 2019). Além disso, os antidepressivos TCA, notadamente a imipramina, mostraram capacidade de neutralizar alterações morfológicas da microglia, como transformação amebóide, e aumento da expressão de marcadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , induzidos por DSR (Ramirez et al., 2015) e CUMS (Kreisel et al., 2014). Finalmente, em células isoladas da microglia do hipocampo em condições de estresse, a fluoxetina promoveu um aumento na expressão de marcadores anti-inflamatórios (ARG1, YM1, TGF- β , SOCS3, IL-10, IL-1RA, FIZZ1) (Alboni et al., 2016). Por outro lado, também há evidências relatando efeitos negativos ou inconclusivos do antidepressivo monoaminérgico nas funções da microglia no modelo de estresse crônico, que trazem complexidade ao campo e levantam questões sobre a especificidade desse efeito relacionado ao agente antidepressivo e ao modelo de estresse (Nicolai, Nettesheim, de Witte, et al., 2023).

Por fim, alguns estudos clínicos têm demonstrado a associação entre a resposta terapêutica a antidepressivos clássicos e alterações neuroimunes. Nesse contexto, Strawbridge e colaboradores (2015) conduziram uma meta-análise com 35 ensaios clínicos e reportaram que os pacientes que responderam à terapia antidepressiva (redução de 50% de escores de sintomas depressivos) apresentaram redução sérica significativa de IL-6 e TNF α (STRAWBRIDGE et al., 2015). Outra meta-análise conduzida por Hannestad e colaboradores demonstrou que o tratamento com ATC, ISRS e inibidores duais foram capazes de reduzir significativamente os níveis séricos de IL-1 β , enquanto apenas os ISRS reduziram os níveis de IL-6 (HANNESTAD; DELLAGIOIA; BLOCH, 2011). Ademais, o estudo de Dahl e colaboradores traçou um perfil multiplex de citocinas periféricas após 12 semanas de tratamento com ISRS e demonstrou uma redução significativa dos níveis de IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, G-CSF e IFN- γ . Interessantemente, apenas os pacientes que apresentaram resposta clínica apresentaram redução sérica das citocinas pró-inflamatórias (Dahl et al., 2014).

Portanto, linhas de pesquisa convergentes têm sugerido que as classes atuais de antidepressivos, notadamente os ISRS, apresentam acentuada capacidade de suprimir a micróglia e inibir a reatividade pró-inflamatória causada por estímulos pró-inflamatórios diretos, como PAMPs e citocinas exógenas, mas também associada ao estresse crônico exposição em modelos animais (Troubat et al., 2021). Apesar desse nível de evidência, os alvos moleculares diretos para o efeito desses antidepressivos na microglia e suas possíveis interações com suas ações em sistemas monoaminérgicos e outros sistemas de neurotransmissão devem ser esclarecidos por pesquisas futuras.

1.6. Drogas anti-inflamatórias com efeito antidepressivo

Em relação ao reposicionamento de fármacos anti-inflamatórios e imunomoduladores para depressão, o caso mais bem documentado é o dos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) (Eyre et al., 2015). Neste contexto, uma metanálise elegante de 36 ensaios clínicos randomizados (RCTs) de estratégias anti-inflamatórias para depressão, incluindo 13 ensaios de AINEs (N = 4214), 9 de inibidores de citocinas (N = 3345), sete de estatinas (N = 1576), 3 de minociclina (N = 151), 2 de pioglitazona (N = 77) e 2 de glicocorticóides (N = 59) (Köhler-Forsberg et al., 2019). Em geral, os agentes anti-inflamatórios melhoraram os sintomas depressivos em comparação ao placebo, tanto como complemento em pacientes com TDM (SMD = -0,64; 95%-CI = -0,88, -0,40; I2 = 51%; N = 597) quanto como monoterapia (SMD = -0,41; 95%-CI = -0,60, -0,22; I2 = 93%, N = 8825). Os resultados mais impressionantes foram alcançados para a estratégia de adição de anti-inflamatórios, melhorando tanto a taxa de resposta (RR = 1,76; 95%-CI = 1,44-2,16; I2 = 16%; N = 341) quanto a remissão (RR = 2,14; 95%-IC = 1,03-4,48; I2 = 57%; N = 270) (Köhler-Forsberg et al., 2019).

A maioria dos estudos relatando efeitos antidepressivos significativos dos AINEs utilizou o inibidor da ciclooxigenase 2 (COX-2) celecoxibe. Em geral, vários desses estudos foram conduzidos no contexto de uma comorbidade médica física (por exemplo, osteoartrite ou psoríase), sugerindo que a depressão associada a condições médicas pode ser particularmente afetada por medicamentos anti-inflamatórios (Köhler-Forsberg et al., 2017). No entanto, estudos mais recentes foram realizados na população de pacientes com MDD sem comorbidades médicas significativas com resultados mistos (Baune et al.,

2021; Z. Wang et al., 2022). No entanto, um estudo recente relatou a eficácia do tratamento adicional com celecoxibe para melhorar o perfil de resposta aos antidepressivos clássicos (Simon et al., 2021). Apesar do potencial promissor do celecoxibe como terapia adjuvante para TDM, outros inibidores da COX (não seletivos), particularmente a aspirina, mostraram efeitos antidepressivos menos significativos ou inexistentes (Köhler et al., 2014; Köhler-Forsberg et al., 2019). Os resultados altamente heterogêneos com AINEs como antidepressivos sugerem que sua eficácia depende da condição e das características dos pacientes, bem como dos medicamentos testados e da especificidade relacionada (COX-1/COX-2) (Eyre et al., 2015).

Outro caso de destaque de reaproveitamento de anti-inflamatórios para a psiquiatria é a minociclina. A minociclina é uma tetraciclina de segunda geração com propriedades neuroprotetoras demonstradas em várias condições neurodegenerativas, como Parkinson, Huntington e Alzheimer (Askari Rizvi, 2018; Markulin et al., 2022). No cenário clínico da depressão, existem 2 RCT avaliando a eficácia antidepressiva da minociclina como tratamento adjuvante para pacientes com TDM, incluindo pacientes com depressão resistente (Dean et al., 2017; Husain et al., 2015) e um RCT avaliando a minociclina como monoterapia para depressão leve -depressão moderada em pessoas vivendo com HIV (Emadi-Kouchak et al., 2016). Para todos esses estudos, a minociclina mostrou capacidade de melhorar moderadamente os sintomas de depressão, mas os resultados mais significativos foram associados a melhorias na funcionalidade geral e na impressão clínica global (Dean et al., 2017; Emadi-Kouchak et al., 2016; Husain et al., 2017).

Com relação aos estudos em animais, evidências consistentes mostraram efeito antidepressivo da minociclina em vários modelos e propuseram mecanismos relacionados ao sistema imunológico para suas ações. De fato, no teste de nado forçado, a administração aguda de minociclina (sistêmica ou diretamente no núcleo accumbens) reduziu a imobilidade e aumentou os efeitos antidepressivos da desipramina e dos antagonistas dos receptores glutamatérgicos (Molina-Hernández, Tellez-Alcántara, et al., 2008; Molina-Hernández, Téllez-Alcántara, et al., 2008). No modelo de comportamento semelhante à depressão induzida por LPS, a minociclina impediu completamente o desenvolvimento de sintomas semelhantes à depressão, bem como a reatividade da microglia induzida por LPS e neuroinflamação (Henry et al., 2008; Kobayashi et al., 2013). Em outro modelo de depressão induzida por inflamação induzida por IFN- α , a minociclina também preveniu o comportamento semelhante à depressão e restaurou a

neurogênese (Zheng et al., 2015). Uma tetraciclina congênere da minociclina, a doxiciclina, também se mostrou promissora como antidepressiva e capaz de neutralizar as principais alterações pró-inflamatórias da microglia induzidas pelo desafio sistêmico de LPS em camundongos, como aumento da produção de nitrito e expressão de IL-1 β e TNF α (Mello et al. , 2013, 2021). Vale ressaltar que na maioria desses estudos a minociclina e as tetraciclinas congêneres foram administradas principalmente como estratégia preventiva antes ou em conjunto com a exposição a estímulos indutores de neuroinflamação.

Em relação ao modelo de estresse, existem estudos que mostram a capacidade da minociclina tanto para prevenir quanto para reverter o estresse crônico (estresse de contenção repetido) anormalidades comportamentais, como comportamento semelhante à ansiedade e aumento da vulnerabilidade ao vício em cocaína, com ambos os efeitos relacionados à capacidade dessa droga de neutralizar o estresse -transformação pró-inflamatória da microglia induzida em regiões discretas do cérebro, como o hipocampo e o núcleo accumbens (Avalos et al., 2022; H.-Y. Liu et al., 2018). Além disso, no modelo de desamparo aprendido, ratos deprimidos mostraram recuperação do comportamento de fuga normal e anormalidades de monoamina após uma única administração intracerebroventricular de minociclina (Arakawa et al., 2012). Portanto, em conjunto, a minociclina mostrou evidências clínicas e pré-clínicas promissoras de eficácia antidepressiva, principalmente como agente adjuvante, e mecanismos neuroimunes, envolvendo principalmente a modulação da microglia, são o fator subjacente putativo para esse efeito.

Nos últimos anos, a visão atual da medicina personalizada propôs a estratificação de subgrupos de pacientes com distúrbios multifatoriais complexos com base em biomarcadores selecionados para receber terapias direcionadas específicas que serão mais adequadas à base patobiológica de cada grupo de indivíduos (Hamdani et al. , 2013). O mesmo cenário tem sido aplicado para a depressão, e existem alguns ensaios para estratificar pacientes com depressão de acordo com os níveis de alguns biomarcadores pró-inflamatórios, como PCR, IL-6 e TNF- α , e gerando grupos de pacientes com “alta fenótipo de inflamação” e “fenótipo de baixa inflamação” (Subramaniapillai et al., 2017). Para aqueles com alta inflamação, foi proposto que os agentes anti-inflamatórios e imunossuppressores teriam os maiores benefícios. Existem alguns estudos preliminares interessantes de agentes anti-citocinas, como o anticorpo monoclonal anti-TNF- α

infleximabe, mostrando efeitos antidepressivos mais promissores para pacientes com fenótipo de inflamação elevada (representado pelos níveis de PCR) (Raison et al., 2013; Weinberger e outros, 2015). Os futuros esforços de pesquisa no campo devem determinar por meio de estudos de neuroimagem (usando rastreadores de PET melhores e mais seletivos) se esses perfis inflamatórios correspondem a perfis semelhantes de reatividade da micróglia e se os benefícios das estratégias anti-inflamatórias seriam melhor direcionados para micróglia específicas subgrupos de reatividade

1.7. Canabidiol: perfil farmacocinético e farmacodinâmico

Nos últimos 50 anos, vários estudos tem se dedicado a caracterizar as bases biológicas e moleculares dos efeitos terapêuticos da planta *Cannabis sativa* e seus derivados. Até o momento foram identificados mais de 120 fitocanabinóides no extrato de várias partes da planta (folha, caule, raízes), sendo os mais abundantes: D9-trans-tetrahydrocannabinol (THC), cannabigerol, cannabicromeno, canabidiol (CBD), cannabinodiol, cannabielsoin, cannabicyclol, cannabinol e cannabitriol, além de outros identificados em menores proporções (TURNER et al., 2017). O composto majoritário, entretanto, é o THC, caracterizado por Gaoni and Mechoulam in 1964 . O Canabidiol (CBD) é o segundo composto majoritário no extrato da *Cannabis sativa*, sendo isolado primeiramente por Adam e colaboradores em 1940, mas tendo sua estrutura química totalmente resolvida em 1963 pelo grupo de Mechoulam. CBD e THC são isômeros constitutivos, o que significa que possuem a mesma fórmula química, porem possuem características estéricas e ópticas distintas, bem como perfis de propriedades farmacológicas muito diferentes (SAMPSON, 2021).

O THC possui uma estrutura planar com uma longa cadeia alifática que favorece seu perfil de interação e agonismo com o receptor CB1r. Em contraste, o CBD tem uma estrutura angular, que produz um impedimento estérico que dificulta sua capacidade de se ligar a esse receptor (Figura 1). Como consequência, o THC tem uma afinidade mais de 100 vezes maior pelos receptores CB1r e CB2r que o CBD, respectivamente 5-39.5 nM (THC) versus 211-4900 nM (CBD) para o CB1r, e 3-75 nM (THC) versus 96-2860 nM (CBD) para o CB2r. Isso, parcialmente, explica a ausência de efeitos psicoestimulantes e eufóricos do CBD em relação ao THC. Bem como, estudos animais demonstraram ausência de propriedades aditivas do CBD em diferentes modelos usados

para avaliar potencial de abuso, como preferência de lugar condicionada, auto-administração e retirada espontânea. Por outro lado, o THC mantém potencial aditivo, embora com evidências conflitantes (DEVINSKY et al., 2014).

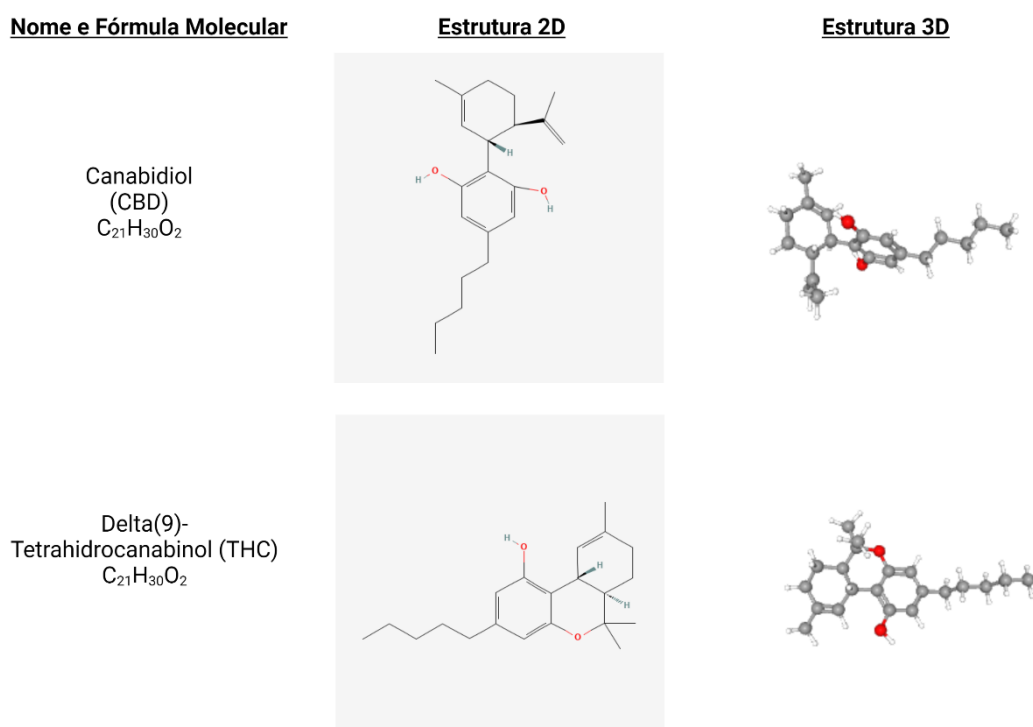


Figura 1. Estrutura química e distribuição 2D-3D do CBD e delta-9-THC. Na figura estão representados os nomes, fórmulas químicas, estruturas molecular 2D e 3D dos dois fitocanabinóides mais abundantes no extrato de Cannabis sativa. Figura criada pelo autor com Biorender.com.

Em relação às propriedades farmacológicas do CBD, principal objeto de estudo desse trabalho, durante os últimos anos, vários estudos tem demonstrado propriedades antimicrobianas, antitumorais, anti-inflamatórias, anticonvulsivantes, além de efeitos antidepressivos e ansiolíticos, os quais serão melhor discutidos adiante (BILBAO; SPANAGEL, 2022; DEVINSKY et al., 2014). Nesse contexto, mais recentemente, alguns usos clínicos do CBD foram aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA), como para o tratamento de espasticidade em pacientes com esclerose múltipla na formulação Sativex (THC 27 mg/mL + CBD 25 mg/mL, apresentação oral spray), e para o tratamento de epilepsias congênitas, como as síndromes de Lennox-Gastaut e Dravet em crianças maiores de dois anos de idade. Ademais, o CBD e suas formulações tem potencial

terapêutico promissor para outras condições neurológicas e neuropsiquiátricas (para revisão no tema, ver (CRIPPA et al., 2018).

Em relação à farmacocinética do CBD, esse composto possui alta lipossolubilidade, entretanto sua biodisponibilidade após administração oral é reduzida (apenas cerca de 6-19% da dose administrada via oral), devida a um intenso metabolismo de primeira passagem hepático. Nesse sentido, outras vias de administração tem sido exploradas, como inalação e mucosal oral-sublingual, por permitirem melhores concentrações séricas e mais rapidamente. Por sua alta lipossolubilidade, o CBD tem boa distribuição entre diferentes tecidos, com maior acumulação no cérebro e tecido adiposo. Como mencionado, esse composto é predominantemente metabolizado pelo fígado por diferentes reações, como oxidação, hidroxilação, glucoronidação e epoxidação, além de ser eliminado predominantemente por via urinária na forma intacta ou conjugada ao glucoronídeo (LUCAS; GALETTIS; SCHNEIDER, 2018). Em relação a seus metabólitos, os mais abundantes no plasma são os derivados hidroxilados 7-COOH do CBD, que semelhantemente são excretados intactos ou conjugados ao glucoronídeo (UJVÁRY; HANUŠ, 2016).

Quadro 1. Características farmacocinéticas do CBD em humanos.

| <i>Parâmetro</i> | <i>Valores</i> | <i>Referência</i> |
|-----------------------------------|---|-----------------------|
| Coeficiente de partição água-óleo | 6-7 | (WANG et al., 2022b) |
| Biodisponibilidade oral | 6-19% | (HUESTIS, 2007) |
| Cmax | 3 ± 3.1 µg/L | (TAYLOR et al., 2018) |
| Tmax | 2.8 ± 1.3 h | (TAYLOR et al., 2018) |
| Volume de distribuição | 32 L/kg | (TAYLOR et al., 2018) |
| Tempo de meia-via (T1/2) | 1.4-10.9 h (via oromucosal agudo) 2-5h (oral crônico) 24h (intravenoso) 31h (inalatória) | (TAYLOR et al., 2018) |

| | | |
|--------------------------|-----------------|-----------------|
| Taxa de depuração plasma | 960-1500 mL/min | (HUESTIS, 2007) |
|--------------------------|-----------------|-----------------|

Adaptado pelo autor de (LUCAS; GALETTIS; SCHNEIDER, 2018). Abreviações: Cmax: concentração máxima; Tmáx: tempo máximo; T1/2: tempo de meia-vida.

Nesse contexto, os primeiros metabólitos do CBD identificados foram isolados do homogenato de fígado de ratos Wistar e suas estruturas foram determinadas como um álcool primário derivado da reação de oxidação no grupo metil C-7 alílico na porção ciclohexeno (7-OH-CBD) e um álcool secundário resultante da reação de oxidação do grupo metileno central (C-3") da cadeia lateral pentila (3"-OH-CBD). Desde então, estudos de biotransformação em mamíferos, incluindo humanos, usando vários tipos de vias de administração do CBD indicaram considerável variabilidade inter-espécies (UJVÁRY; HANUŠ, 2016). Ademais, a maioria dos estudos in vivo têm sido restritos à caracterização de metabólitos urinários de CBD. Sendo um bom substrato das oxidases do complexo CYP450, o CBD sofre extensa hidroxilação em vários locais de sua estrutura química, e ao todo, cerca de 100 metabólitos foram identificados em vários organismos ao longo de sua etapas de metabolização. Conforme mencionado, os metabólitos mais abundantes no plasma e na urina são derivados do ácido CBD-7-óico (7-COOH-CBD) posteriormente oxidado na cadeia lateral do CBD (HARVEY; MECHOULAM, 1990). Interessantemente, a inspeção das estruturas químicas desses derivados 7-COOH-CBD, revelou a cadeia alquila ramificada do ácido (2E)-2-propilpent-2-enóico ($\Delta^2(E)$ -valproato) incorporado na porção de ácido ciclo-hexenocarboxílico de tais metabólitos do CBD (HARVEY; MECHOULAM, 1990; YEUNG et al., 2023). O $\Delta^2(E)$ -valproato é o principal metabólito ativo do ácido valpróico e, ao contrário do ácido saturado original, possui propriedades anticonvulsivantes e não possui hepatotoxicidade e teratogenicidade associados ao ácido valpróico em humanos (GHODKE-PURANIK et al., 2013). Entretanto, se os metabólitos 7-COOH-CBD com estrutura tipo $\Delta^2(E)$ -valproato em sua cadeia alquila possuem propriedades anticonvulsivantes ou outras propriedades farmacológicas promissoras, isso precisa ser melhor esclarecido em estudos futuros.

Em relação à farmacodinâmica do CBD, esse composto tem a particularidade de possuir pelo menos 65 alvos de ligação, incluindo o receptor 1A da serotonina (5-HT1A), os receptores relacionados a canabinóides CB1r e CB2r, receptor 55 acoplado à proteína G (GPR55), receptor transiente potencial vanilóide 1 (TRPV1), transportador de nucleosídeo equilibrado tipo 1 (ETN1), ligação de ácidos graxos proteína (FABP), cálcio

tipo T ativado por voltagem canais, receptores de adenosina e glicina, receptores opióides mu e delta e canais dependentes de voltagem de ânions 1 (VDAC1), entre outros (DE ALMEIDA; DEVI, 2020). Nesse contexto, estudos pioneiros revelaram que o CBD em concentrações micromolares atua como antagonista ou agonista inverso dos receptores CB1r e CB2r. Entretanto, estudos subsequentes demonstraram um perfil mais próximo de um modulador alostérico negativo desses receptores (PERTWEE, 2008). Ademais, alguns estudos indicaram que o CBD inibe a recaptação da anandamida (AEA) e pode reduzir sua metabolização pela enzima amida-hidrolase de ácidos graxos (FAAH), aumentando o tônus canabinóide endógeno, podendo por esse mecanismo exercer efeito de ativação nos receptores CB1r e CB2r (DEUTSCH, 2016).

Além disso, o CBD também atua como um antagonista de receptores relacionados a canabinóides como o GPR55 considerado um dos principais alvos pelos quais o CBD pode exercer suas propriedades no sistema nervoso central (SNC) (LAUCKNER et al., 2008). Alvos adicionais, incluindo receptores opióides, dopaminérgicos, glutamatérgicos e serotoninérgicos têm sido associados às ações centrais do CBD. O CBD também inibe a recaptação de dopamina e glutamato in vitro. Além disso, o CBD é agonista parcial dos receptores D2 da dopamina, o que pode contribuir parcialmente para seus efeitos ansiolíticos e antipsicóticos reforçando seu potencial (SEEMAN, 2016). Por sua farmacologia complexa, entendimento pleno de seus alvos moleculares e vias de sinalização seletivas ativadas pelo CBD está longe de ser completamente esclarecido, e potencialmente esse perfil multi-alvos represente propriedade essencial para seus efeitos terapêuticos promissores no SNC.

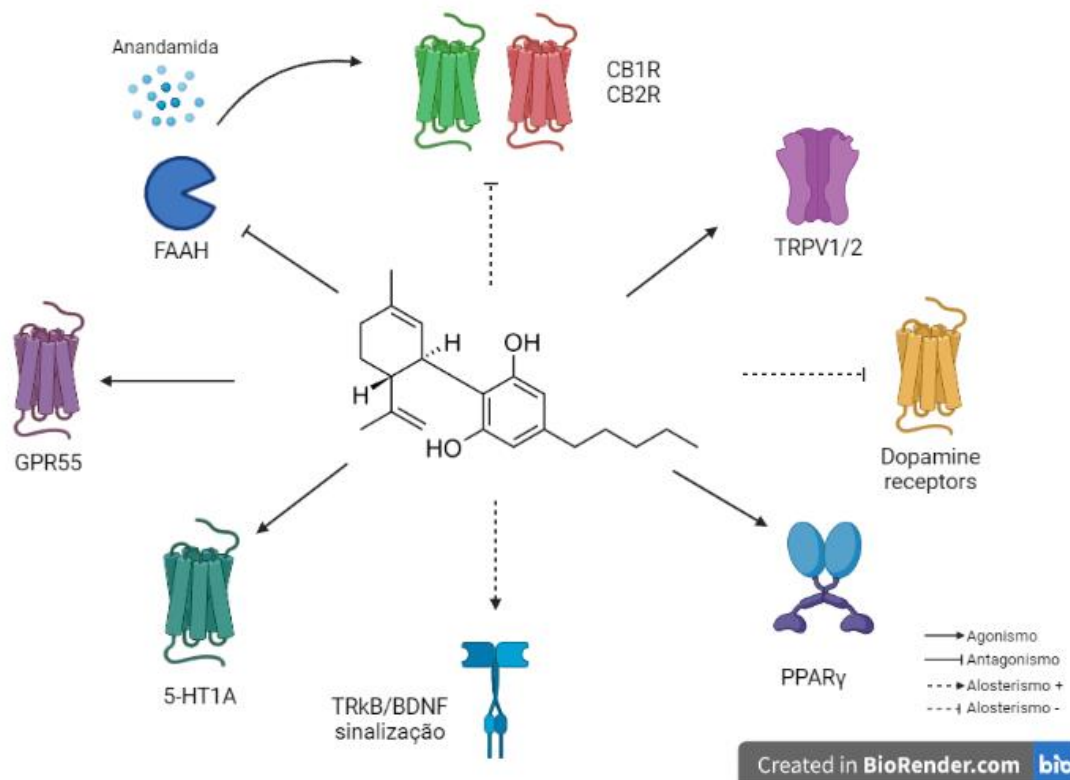


Figura 2. Alvos moleculares envolvidos nos efeitos farmacodinâmicos do CBD. O CBD possui uma farmacologia complexa envolvendo múltiplos alvos, incluindo FAAH e efeito indireto agonista em CB1r e CB2r, agonismo de canais TRPV1 e 2 e receptores 5-HT1A, além de outros. A seta com ponta em flecha indica agonismo, a seta com ponta em traço indica antagonismo. A seta tracejada com ponta em fecho indica modulação alostérica positiva, a seta tracejada com ponta em traço indica modulação alostérica negativa. Abreviações: FAAH: *fatty acid amide hydroxylase*; CB1R: cannabinoid receptor 1; CB2R: cannabinoid receptor 2; GPR55: G-protein receptor 55; TRPV1/2: vanilloid receptor type 1 and 2; PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; BDNF: brain-derived neurotrophic factor; TrkB: tyrosine protein kinase B. Figura criado com Biorender.com.

1.8. Canabidiol: potencialidade como novo agente antidepressivo

Como é bem sabido, os antidepressivos orais disponíveis, genericamente denominados antidepressivos monoaminérgicos, possuem limitações significativas, como considerável tempo de latência para início de seus efeitos (8-12 semanas), e eficácia limitada (aproximadamente 33.3% dos pacientes permanecem não-responsivos mesmo após 4 tentativas com diferentes estratégias de antidepressivos) (PIGOTT, 2015). Essas limitações, além de efeitos adversos importantes, tem motivado a busca de novos

compostos com mecanismo de ação diferente dos alvos monoaminérgicos previamente explorados, e que possam superar as limitações desse grupo anterior de drogas.

Nesse sentido, por seu perfil multi-alvos e ausências dos efeitos psicotrópicos associados ao THC, o CBD tem sido apontado como alvo promissor para o tratamento de vários transtornos neuropsiquiátricos, sobretudo transtornos de humor e de ansiedade específicos (DEVINSKY et al., 2014). A seguir, vamos discutir as principais evidências relacionadas ao efeito antidepressivo e ansiolítico do CBD em modelos pré-clínicos e as evidências clínicas disponíveis, embora ainda escassas, de sua aplicação para esses transtornos.

1.8.1. Evidências em modelos animais e modelos in vitro

Um potencial efeito antidepressivo do CBD foi relatado pela primeira vez por ZANELATI et al., (2010) em camundongos Swiss adultos saudáveis, iniciando uma nova área de investigação sobre o potencial terapêutico dessa droga na depressão (ZANELATI et al., 2010). Embora os estudos que investigam os efeitos do CBD em modelos animais de depressão sejam surpreendentemente poucos, as evidências analisadas aqui sugerem que o CBD pode ter potencial para ser uma nova opção de tratamento da depressão.

O mecanismo de ação subjacente aos efeitos do CBD é complexo e envolve múltiplos alvos como mencionado acima. Curiosamente, muitos dos alvos farmacológicos conhecidos por serem modulados pelo CBD também são alvos descritos por contribuir para a neurobiologia da depressão e/ou o efeito comportamental/terapêutico de drogas antidepressivas (SILOTE et al., 2019).

Por exemplo, o CBD modula o sistema endocanabinóide. Brevemente, o sistema endocanabinóide consiste nos receptores canabinóides CB1r e CB2r, os ligantes endógenos, sobretudo anandamida (AEA) e 2-araquidonoil glicerol (2-AG) e etapas enzimáticas relacionadas à biossíntese, absorção celular e metabolismo desses ligantes. Estudos in vitro mostram que, apesar de ter baixa afinidade pelos receptores canabinóides, o CBD pode atuar como um modulador alostérico negativo dos receptores CB1r e CB2r em concentrações submicromolares (LAPRAIRIE et al., 2015; MARTÍNEZ-PINILLA et al., 2017)

Por outro lado, o CBD inibe a degradação enzimática e a absorção de AEA, facilitando assim a sinalização endocanabinóide desse ligante através dos receptores CB1r e CB2r

(BISOGNO et al., 2001). De fato, o aumento dos níveis de AEA parece mediar alguns dos efeitos centrais do CBD (LEWEKE et al., 2012), e o aumento dos níveis de AEA produz efeitos semelhantes aos observados após a administração de CBD (GOBBI et al., 2005). Além disso, foi relatado que o CBD ativa diretamente os receptores TRPV1, e parte de sua ação pode ser bloqueada por antagonistas seletivos do TRPV1 (CAMPOS; GUIMARÃES, 2009).

Além do sistema endocanabinoide e endovanilóide, o CBD também atua no sistema serotoninérgico. Estudos pré-clínicos mostram que o CBD pode facilitar a neurotransmissão mediada por 5-HT_{1A} (RUSSO et al., 2005), e vários efeitos comportamentais do CBD parecem ser mediados por receptores 5-HT_{1A} (FOGAÇA et al., 2014; SARTIM et al., 2021). Além do sistema serotoninérgico, o CBD também pode modular vários outros sistemas transmissores, como dopaminérgico e glutamatérgico, e alvos diferentes [para maiores detalhes, ver revisão (IBEAS BIH et al., 2015)]

Nesse contexto, o aumento dos níveis de AEA por meio da inibição de sua absorção ou metabolismo, bem como o agonismo direto dos receptores CB_{1r} e CB_{2r}, tem sido associados a efeitos tipo-antidepressivo e ansiolíticos em diferentes modelos de depressão estudos pré-clínicos (GORZALKA; HILL, 2011; HILLARD; LIU, 2014). Entre os vários achados de alvos serotoninérgicos, a disfunção da sinalização 5-HT_{1A} é consistentemente observada em animais cronicamente estressados [(revisado por (KAUFMAN et al., 2016))]. Ademais, a ativação dos receptores 5-HT_{1A} é um mecanismo amplamente proposto envolvido no efeito comportamental de drogas antidepressivas (KAUFMAN et al., 2016). Portanto, essas evidências farmacológicas em conjunto apoiam a suposição do potencial efeito antidepressivo do CBD.

Em relação ao efeito do CBD em modelos animais relacionados à resposta emocional ao estresse, foi inicialmente demonstrado o promissor efeito ansiolítico desse composto. Nesse contexto, Campos e Guimarães, (2009), demonstraram o efeito ansiolítico do CBD quando administrado por injeção intracerebroventricular na região cinzenta dorsolateral periaquedutal (dlPAG) nos testes do labirinto em cruz elevada (LCE) e teste de conflito de Vogel. Adicionalmente, esse efeito foi bloqueado pela co-administração do antagonista dos receptores 5-HT_{1A} WAY100635 e antagonista dos receptores CB_{1r} AM251 (CAMPOS; GUIMARÃES, 2008, 2009). Também, Resstel et al., (2009) demonstrou o efeito ansiolítico do CBD injetado intraperitonealmente em ratos Wistar expostos a estresse por contenção e avaliados no LCE. Similarmente, os efeitos do CBD foram bloqueados pelo pré-tratamento com WAY100635 (RESSTEL et al., 2009).

Baseado nessas evidências, foi hipotetizado que o CBD seriam capaz de promover mecanismos de enfrentamento ou adaptação (em inglês *coping*), de forma semelhante à administração crônica de antidepressivos clássicos. De forma simples, os mecanismos de enfrentamento ou adaptação ao estresse pode ser definido como os esforços comportamentais e fisiológicos desenvolvidos pelo animal com o objetivo de reduzir os efeitos deletérios produzidos pelo estresse e, assim, promover a adaptação (COMMONS et al., 2017; SILOTE et al., 2019). Estratégias de enfrentamento prejudicadas têm sido associadas ao desenvolvimento de doenças psiquiátricas, incluindo depressão (Commons et al., 2017).

Com base nessas descobertas iniciais, foi demonstrado o efeito da administração intraperitoneal do CBD no teste do nado forçado (do inglês *forced swimming test* ou FST), um teste preditivo amplamente utilizado para avaliar o efeito de drogas antidepressivas (NESTLER; HYMAN, 2010). Nesse contexto, o estudo de ZANELATI et al.(2010) pioneiramente testou diferentes doses do CBD (3,10,30 e 100 mg/kg) em camundongos Swiss machos e revelou que o CBD induz efeitos do tipo-antidepressivo dependentes da dose (com a dose efetiva de 30 mg/kg), e que foram bloqueados pela administração prévia do antagonista 5-HT_{1A} WAY100635 (ZANELATI et al., 2010). Um estudo subsequente de EL-ALFY et al. (2010) corroborou esses achados, mostrando que uma única administração intraperitoneal de CBD teve um efeito antidepressivo em camundongos Swiss submetidos tanto ao FST quanto ao teste de suspensão da cauda (outro teste preditivo de efeito tipo-antidepressivo), embora em doses muito mais altas (200 mg/kg) (EL-ALFY et al., 2010).

Ademais, SCHIAVON et al. (2016) demonstrou que o CBD apresentou efeito antidepressivo no teste de suspensão da cauda quando administrado tanto agudamente quanto durante 15 dias (3 e 30 mg/kg, intraperitoneal) em camundongos Swiss machos (SCHIAVON et al., 2016). Resultados semelhantes foram reportados por Réus et al. (2011), que demonstrou que o tratamento tanto agudo quanto crônico por 14 dias com CBD (30 mg/kg) em ratos Wistar machos reduziu o tempo de imobilidade e aumentou o tempo de natação no FST (RÉUS et al., 2011). Adicionalmente, Sales et al. (2018) reportou que a administração combinada de CBD com antidepressivos clássicos serotoninérgicos em subdoses, como a fluoxetina (5 mg/kg), resultou em efeito aditivo e considerável efeito antidepressivo no FST. Efeito aditivo semelhante não foi observado com a combinação com o antidepressivo noradrenérgico desipramina em subdoses (2,5

mg/kg). Além disso, a depleção dos níveis de serotonina pelo tratamento com PCPA, inibidor da síntese de serotonina, mas não de noradrenalina pelo tratamento com DSP-4 (toxina noradrenérgica), foi capaz de abolir os efeitos aditivos do CBD (SALES et al., 2018).

Entretanto, embora esses achados sejam promissores, eles são limitados pelos modelos em que foram demonstrados, tendo em vista de se tratar de modelos com validade predominante preditiva e questionável validade de construto para depressão (NOLLET; LE GUIQUET; BELZUNG, 2013). Nesse ínterim, os efeitos do CBD foram testados no modelo ambiental de desamparo aprendido em ratos Wistar e no modelo genético de ratos espontaneamente deprimidos, do inglês *Flinders sensitive lineage* (FSL) e sua respectiva linhagem controle, do inglês *Flinders resistant lineage* (FRL). Interessantemente, ambos os modelos não são responsivos ao efeito da administração aguda de antidepressivos monoaminérgicos, exceto aos efeitos antidepressivos rápidos da ketamina. Nesse estudo, uma administração única intraperitoneal de CBD (30 mg/kg) reduziu o número de falhas ao escapar no modelo de desamparo aprendido e reduziu o tempo de imobilidade no FST de ratos FSL. Impressionantemente, os efeitos de uma única administração de CBD foram sustentados 7 dias após em ambos os modelos descritos (SALES et al., 2019). Nesse contexto, LINGE et al., (2016) também demonstrou o efeito antidepressivos do tratamento agudo e crônico CBD (50 mg/kg) no modelo de depressão induzido por bulbectomia olfatória. CBD em ambos os esquemas de tratamento foi capaz de reverter a hiperlocomoção no teste do campo aberto e fenótipo anedônico no teste de preferência por sacarose. Adicionalmente, o CBD induziu um aumento agudo dos níveis extracelulares de serotonina e glutamato no córtex pré-frontal ventro-medial, enquanto o tratamento crônico induziu aumento apenas dos níveis de glutamato e normalizou a disfunção dos receptores 5-HT_{1A} observado no núcleo dorsal da rafe, amígdala e hipocampo dos animais submetidos ao modelo de depressão (LINGE et al., 2016).

O modelo de estresse crônico imprevisível tem validade translacional robusta para depressão, por ser capaz de mimetizar não apenas os aspectos fenotípicos da doença, bem como mimetizar a exposição a eventos estressores múltiplos em natureza e intensidade que se assemelham os eventos estressores adversos observados na vida humana moderna (NOLLET; LE GUIQUET; BELZUNG, 2013). Nesse modelo, Campos et al. (2013), demonstrou que o tratamento com CBD (30 mg/kg, diariamente, 2 horas antes de cada evento estressor) foi capaz de atenuar as consequências comportamentais, sobretudo comportamento tipo-ansioso, e os déficits de neurogênese induzidos pelo estresse crônico

por 14 dias. Interessantemente, o CBD foi capaz de aumentar os níveis hipocâmpais de AEA, e seus efeitos protetores foram bloqueados pela administração do antagonista CB1r AM251 (CAMPOS et al., 2013). Esse estudo, portanto, destacou a participação do aumento do tônus endocanabinóide endógeno e sinalização CB1r para os efeitos protetores do CBD em relação às consequências deletérias do estresse crônico.

É importante ainda destacar que parte das evidências mencionadas advogam para um perfil de efeito antidepressivo rápido do CBD semelhante ao da ketamina. De fato, os resultados de Linge et al. (2016) ressaltam a capacidade do CBD de potencializar a neurotransmissão glutamatérgica após administração única e de forma pareado com efeito antidepressivo rápido (LINGE et al., 2016), enquanto Sales et al., (2019) reportou a habilidade do CBD de induzir efeito antidepressivos em ratos e camundongos 30 minutos após dose única, e que foi sustentado após 7 dias do tratamento no FST. Adicionalmente, dose única de CBD aumentou os níveis de expressão de BDNF e das proteínas sinápticas sinaptofisina e PSD95, bem como da densidade de espinhas dendríticas no córtex pré-frontal de camundongos 30 minutos após administração única (SALES et al., 2019). Portanto, conjuntamente, esses achados reforçam o potencial do CBD de atuar como antidepressivo com efeitos rápidos e sustentados semelhantemente à ketamina.

Interessantemente, nesse contexto, foi ainda demonstrado que o tratamento combinado CBD com S-ketamina pode representar uma estratégia promissora para manter os efeitos antidepressivos rápidos da última droga, porém sem os efeitos psico-estimulantes indesejados. De fato, Sartim et al., (2021) realizou o tratamento combinado ou isoladamente de S-cetamina (2.5, 3, 5, 10, 30 mg/kg) e CBD (3, 10, 30 mg/kg) e demonstrou que o CBD sozinho, como esperado, induziu efeito tipo-antidepressivo no teste FST de forma dose-progressiva, e que combinado com S-cetamina, o CBD atenuou a hiperlocomoção induzida por essa droga, sem afetar seu efeito antidepressivo. Interessantemente, o efeito antidepressivo de ambas as drogas foi bloqueado pela administração do antagonista dos receptores AMPA NBQX (SARTIM et al., 2021). Portanto, esses resultados destacam também o potencial promissor da associação CBD e S-ketamina para indução de remissão rápida dos sintomas depressivos com menos efeitos adversos associados à infusão de cetamina.

1.8.2. Evidências Clínicas

Os primeiros ensaios clínicos avaliando as propriedades ansiolíticas do CBD foram conduzidos em 1974 e 1982, demonstrando o potencial do CBD de atenuar os efeitos ansiogênicos associados ao uso de THC por voluntários saudáveis (KARNIOL et al., 1974; ZUARDI et al., 1982). Posteriormente, ensaios clínicos mais robustos duplo-cegos e randomizados, avaliaram os efeitos ansiolíticos do CBD em voluntários saudáveis. De nota, o CBD foi capaz de diminuir a ansiedade e respostas simpáticas fisiológicas induzidas em voluntários saudáveis pela simulação de falar em público. Em outro estudo foi reportado que o CBD reduziu significativamente os escores de ansiedade generalizada de sujeitos não-diagnosticados com transtornos mentais específicos e avaliados pela Escala Visual Analógica de Humor (VAMS). Esse efeito também foi associado a um aumento da sedação mental e menor fluxo de sangue cerebral medido por cintilografia de perfusão cerebral na região temporal medial (complexo amígdala-hipocampo esquerdo, estendendo-se para o hipotálamo) e o giro cingulado posterior esquerdo (CRIPPA et al., 2004).

Ademais, a eficácia do CBD também foi avaliada em ensaios clínicos em subgrupos de pacientes com transtornos de ansiedade específicos. De nota, Crippa et al., (2011) demonstrou a eficácia do CBD (400 mg, dose oral única) de reduzir os escores de ansiedade subjetiva de pacientes com transtorno de ansiedade social generalizada, assim como, sua capacidade de reduzir o fluxo sanguíneo nas regiões do giro parahipocampal esquerdo, hipocampo e giro temporal inferior, ao mesmo tempo que aumentou esse parâmetro no giro cingulado posterior direito (CRIPPA et al., 2011). Posteriormente, esse mesmo grupo demonstrou a eficácia do CBD (600 mg, dose única oral) de significativamente reduzir a ansiedade subjetiva, desconforto ao falar, comprometimento cognitivo e sinais periféricos de alerta, como aumento da pressão arterial, frequência cardíaca e condutância da pele, em indivíduos com transtorno de ansiedade social expostos a simulação de falar em público (BERGAMASCHI et al., 2011).

Adicionalmente, uma avaliação retrospectiva de 103 casos clínicos em clínica psiquiátrica envolvendo o uso adjuntivo de CBD para sintomas de ansiedade e problemas de sono, também reportaram resultados promissores para o CBD. De fato, esses pesquisadores relataram que os escores de ansiedade diminuíram no primeiro mês de tratamento combinado em 67 pacientes e permaneceram diminuídos durante toda a duração do estudo. Os escores de sono melhoraram no primeiro mês em 48 pacientes, mas flutuaram ao longo do tempo. Ademais, o CBD foi bem tolerado em todos os

pacientes, exceto 3 indivíduos que apresentaram efeitos gastrointestinais e sedativos mais severos (SHANNON et al., 2019).

Evidências adicionais do efeito do CBD para sintomas ansiosos vem de ensaios clínicos sugerindo que os nabiximóis, como o Sativex, que contém THC (2,7 mg) e CBD (2,5 mg) e é usado para tratar espasticidade em pacientes com esclerose múltipla, promoveu melhora importante de ansiedade reduzida (ALESSANDRIA et al., 2020) e em pacientes com transtorno de abuso de cannabis, reduziu os sintomas de abstinência, ansiedade e dissociação (ALLSOP et al., 2014; HINDOCHA et al., 2015). Além disso, a vaporização aguda do CBD melhorou o processamento emocional e preveniu o comprometimento de emoções baseados em reconhecimento facial induzido pelo THC (HINDOCHA et al., 2015). Da mesma forma, em um estudo duplo-cego, randomizado e controlado por placebo em usuários de heroína, o tratamento com CBD reduziu a ansiedade e comportamento de busca após sua administração aguda, com efeitos que permaneceram estáveis mesmo após 7 dias (HURD et al., 2019).

Em relação às evidências do efeito antidepressivo do CBD em coortes clínicas, os estudos são mais escassos. Em um ensaio clínico realizado em pacientes com dor crônica neoplásica refratária a opióides, altas doses de nabiximols reduziram significativamente os sintomas depressivos, associado com a melhora dos sintomas álgicos e qualidade de sono (PORTENOY et al., 2012). Também, o uso de nabiximols para o tratamento de pacientes em abstinência de cannabis demonstrou efeito mais promissor para a redução dos sintomas depressivos, irritabilidade e de busca pela droga em relação ao placebo, porém sem diferença significativa no tempo total sem relapso do uso de cannabis (ALLSOP et al., 2014). Nesse mesmo contexto, o tratamento com CBD oral diminuiu significativamente os sintomas depressivos e psicóticos em usuários de cannabis, bem como foi capaz de restaurar a redução de volume das regiões subicular esquerda e *cornu ammonis* 1 (CA1) do hipocampo de usuários crônicos de cannabis (BEALE et al., 2018). Resultados semelhantes foram observados em usuários frequentes de cannabis nos quais o CBD oral reduziu sintomas depressivos e promoveu melhora de vários domínios cognitivos, como atenção, aprendizado verbal e memória (SOLOWIJ et al., 2018).

Em 2018, um grande estudo transversal recrutou mais de 2.409 usuários de CBD por meio de uma pesquisa online projetada para caracterizar quem, como e por que os indivíduos estão usando o CBD. Por meio de questionários anônimos, esse estudo identificou que aproximadamente 62% dos usuários de CBD relataram o uso para tratar alguma condição médica, principalmente dor crônica, ansiedade e depressão. Aproximadamente 36% dos

entrevistados relataram melhora importante de suas condições médicas com o uso do CBD, enquanto apenas 4,3% relataram efeitos insuficientes. Um em cada três usuários relatou um efeito adverso não muito grave. Ademais, as chances de usar o CBD para tratar uma condição médica foram 1,44 vezes maiores entre usuários não regulares de cannabis do que entre usuários regulares (CORROON; PHILLIPS, 2018).

Mais recentemente, um estudo exploratório incluindo 90 usuários de CBD como automedicação para tratamento de sintomas depressivos, relevou que a maioria dos sujeitos envolvidos (53%) relataram um melhora importante dos sintomas depressivos, e 88% dos sujeitos responderam estarem mais susceptíveis a tomar o CBD do que drogas prescritas por psiquiatras (WIECKIEWICZ et al., 2022). Além disso, um ensaio prospectivo randomizado monocêntrico avaliou a eficácia do CBD no tratamento de sintomas de exaustão emocional (do inglês burnout) em 120 profissionais de saúde que atuaram ativamente nos cuidados de pacientes durante a pandemia de COVID-19. Esses pesquisadores identificaram que o CBD (150 mg oral, duas vezes ao dia, por 28 dias) foi capaz de reduzir significativamente os sintomas de exaustão emocional nos dias 14 e 28 de tratamento em relação ao placebo. Em geral, o CBD foi bem tolerado, induzindo efeitos colaterais severos em apenas 4 pacientes, sobretudo hepatotoxicidade e farmacodermia (Crippa et al., 2021).

Portanto, até o momento, embora escassos, os resultados apresentados apontam que o CBD desempenha um papel significativo na regulação da ansiedade e sintomas relacionados à depressão, sobretudo em condições de abstinência de cannabis ou de transtornos de dor crônica. No entanto, é necessário desenvolver mais ensaios clínicos (duplo-cegos, randomizados, controlados) para caracterizar definitivamente a segurança e eficácia do CBD para o tratamento desses transtornos psiquiátricos específicos. Alguns estudos duplo-cegos em andamento propondo o uso do CBD para tratamento de depressão unipolar e bipolar, com conclusão prevista para os próximos anos, trarão informações fundamentais para esse cenário e para o uso racional do CBD para essas doenças.

1.9. Efeitos neuroimunes do Canabidiol: foco na micróglia

Nas últimas décadas, o potencial terapêutico do CBD foi investigado em alguns ensaios clínicos para o tratamento de doenças do CNS, incluindo esclerose múltipla (Filippini et al., 2022), transtornos afetivos (Crippa et al., 2021 ; Rapin et al., 2021), esquizofrenia

(Thiele et al., 2021), epilepsias (O'Brien et al., 2022; Thiele et al., 2021), sintomas pós-AVC (Marinelli et al., 2017, 2022) e sintomas de doença de Alzheimer (ClinicalTrials NCT04436081). O mecanismo subjacente a esses amplos efeitos neuroprotetores do CBD não é totalmente compreendido, mas algumas evidências sugerem que ele surge da capacidade do CBD de restringir ou modular as respostas pró-inflamatórias mediadas pelas células imunes do cérebro, em especial, a micróglia residente (Yousaf et al., 2022).

1.9.1. Estudos pré-clínicos *in vitro*

Nesse contexto, vários estudos mostraram a capacidade *in vitro* do CBD de neutralizar a reatividade microglial induzida por imunógenos, como a endotoxina bacteriana LPS e discutiram possíveis mecanismos relacionados a esse efeito (Dos-Santos-Pereira et al., 2020; Suryavanshi et al., 2022; Yeisley et al., 2021b). Nesse contexto, um elegante estudo realizado por Dos-Santos-Pereira et al. (2020) demonstraram que o CBD (1–10 μM) inibiu a liberação do fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β e glutamato em células microgliais primária murinas expostas ao LPS. Esses pesquisadores mostraram que o CBD possui propriedades intrínsecas de eliminação de radicais livres. Essas propriedades químicas impediram a produção de ROS causada pelo aumento na captação de glicose e na síntese derivada de glicose de NADPH induzida por LPS, o que causaria a ativação da sinalização pró-inflamatória associada ao NF κ B. Portanto, esses pesquisadores demonstraram uma ligação direta entre as ações antioxidantes e anti-inflamatórias do CBD (Dos-Santos-Pereira et al., 2020).

Relacionado a esses achados, foi demonstrado que o CBD também pode modular diretamente a expressão de alvos da sinalização de NF κ B. Verificou-se que o CBD (1, 5 ou 10 μM) reverte parcialmente a degradação da quinase intermediária IRAK-1, que reverte a degradação de I κ B e reduz a fosforilação da subunidade NF κ Bp65 em células BV2-microgliais ativadas por LPS. Esses pesquisadores também mostraram que, após o desafio com LPS, o CBD reduziu de forma concentração-dependente a ativação do fator STAT1 pró-inflamatório e fortaleceu a ativação do fator STAT3 anti-inflamatório, aumentando a expressão de citocinas anti-inflamatórias (Kozela et al., 2010).

Além disso, esses achados foram fortalecidos por evidências recentes que também mostram a capacidade do CBD de reduzir a expressão de marcadores pró-inflamatórios,

como TNF- α , IL-1 β , e aumentar a expressão de anti-inflamatórios, como IL-10 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em macrófagos humanos diferenciados derivados de células THP-1 ativados com lipopolissacarídeo (LPS). Curiosamente, esses pesquisadores observaram uma redução simultânea nos níveis de mTOR, sugerindo o envolvimento de vias pró-autofágicas na capacidade anti-inflamatória do CBD em células macrofágicas (Yeisley et al., 2021a).

1.9.2. Estudos pré-clínicos *in vivo*

Em relação à pesquisa *in vivo*, estudos anteriores associaram as ações neuroprotetoras do CBD à sua capacidade de reduzir a neuroinflamação e controlar a reatividade da micróglia em vários modelos de doenças do SNC (Yousaf et al., 2022). Em primeiro lugar, em relação aos modelos de epilepsia, em convulsões excitotóxicas induzidas por ácido kaínico, o CBD inibiu os sinais de reatividade amebóide microglial e acúmulo de mediadores pró-inflamatórios secretados pelas micróglia, além da redução da expressão induzível de óxido nítrico sintase (iNOS) e diminuição do número de neurônios ectópicos (Victor et al., 2022). Esses achados também foram replicados no modelo bilateral de convulsões induzidas por pilocarpina intra-hipocampal, onde o CBD preveniu neurodegeneração, microgliose e astrocitose de maneira dependente de PI3K γ (Lima et al., 2020).

No entanto, a associação mais direta entre as ações do CBD e as ações supressoras da micróglia foi dada em modelos murinos de esclerose múltipla. De fato, Kozela et al. demonstrou a capacidade do CBD de atenuar a progressão da doença no modelo experimental de encefalomielite autoimune (EAE), o que foi seguido por redução dos sinais de reatividade microglial e recrutamento de células T periféricas na medula espinhal (Kozela et al., 2011). Além disso, no modelo de desmielinização induzido por cuprizona, o CBD reduziu o acúmulo de micróglia e aumento dos marcadores de estresse oxidativo nas lesões desmielinizantes ativas (catalase, superóxido dismutases e glutatona) (Sajjadian et al., 2017). Finalmente, no modelo de camundongos fêmeas susceptíveis à doença desmielinizante induzida pelo vírus da encefalomielite murina de theiler (TMEV-IDD) [32], o CBD reduziu o aumento progressivo de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, inibiu a ativação microglial e baixou a expressão da

molécula-1 de adesão celular vascular, quimiocina (motivo C-C) ligante (CCL)2 e CCL5 (Mecha et al., 2013).

Em relação aos transtornos psiquiátricos, apesar de haver evidências convincentes mostrando efeitos antidepressivos e ansiolíticos/panicolíticos promissores do CBD (Sales et al., 2019; Sartim et al., 2016; Soares & Campos, 2017), poucos estudos abordaram a contribuição de sua ação imunorreguladora para esses efeitos. Até o momento, apenas dois estudos investigaram o perfil dos efeitos comportamentais e neuroimunes do CBD em modelos de depressão baseados em inflamação (Florensa-Zanuy et al., 2021; Tito et al., 2021). Como mencionado, o comportamento tipo-doença é um espectro de respostas neurocomportamentais a ameaças imunológicas que imitam alguns aspectos da depressão e podem ser induzidas em roedores por injeção sistêmica de LPS (Dantzer et al., 2008). No entanto, esse espectro de alterações comportamentais varia de acordo com o tempo após os estímulos imunes. As reações de fase aguda, como hipotonia, febre e hipofagia são predominantes algumas horas após o desafio imunológico, o que caracteriza o comportamento doentio. Mais tarde, após o desafio imunológico (12-24h), as reações agudas diminuem, mas os sintomas relacionados ao humor ainda estão presentes, o que caracteriza o comportamento do tipo-depressão (Custodio et al., 2013).

Nesse contexto, Tito et al., 2021 demonstraram que uma injeção única de CBD (30 mg/kg) preveniu o comportamento tipo-doença induzido pelo LPS no teste de nado forçado (FST). Além disso, o CBD reduziu o aumento da IL-6 e o aumentou o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e do fator de crescimento neural (NGF) causado pelo LPS no hipocampo e hipotálamo de camundongos (Tito et al., 2021). Outra evidência interessante fornecida por Florensa-Zanuy e colaboradores, 2021, mostrou que o CBD (30 mg/kg) preveniu o comportamento do tipo-depressão induzido por LPS no FST e no teste de preferência por sacarose (12h após o desafio). Além disso, o CBD diminuiu a ativação do NFκB, e preveniu o aumento dos níveis de IL-6 no plasma e no cérebro, bem como o aumento das taxas de KYN/TRP e KYN/5-HT no hipocampo e córtex no modelo de injeção sistêmica de LPS (Florensa-Zanuy et al., 2021).

Em relação aos modelos de esquizofrenia e toxicidade induzida por antipsicóticos, Gomes et al. demonstraram que o CBD não apenas melhorou os sintomas comportamentais do tipo-esquizofrenia, mas também reduziu os marcadores de ativação glial, Iba1 e GFAP, em várias regiões cerebrais em camundongos expostos ao antagonista glutamatérgico MK-801 (Gomes et al., 2015). Além disso, no modelo animal de esquizofrenia induzido

por ativação imune pré-natal por ácido poliinosínico:policitidílico (poli I:C), o tratamento com CBD na periadolescência (30-60 dias pós-natal) protegeu contra o surgimento de sintomas tipo-esquizofrenia em adultos (Peres et al., 2016). Além disso, Sonogo et al, 2018 relataram que o tratamento diário com CBD preveniu a discinesia orofacial induzida por haloperidol em camundongos. O CBD reverteu os sinais de ativação da microglial, citocinas pró-inflamatórias e marcadores ROS no corpo estriado de camundongos. Descobertas semelhantes foram replicadas com células microgliais primárias tratadas com CBD e ativadas por LPS. Em ambas as condições, os efeitos do CBD foram bloqueados pela coadministração de um antagonista PPAR γ seletivo GW9662 (Sonogo et al., 2018).

1.9.3. Estudos clínicos

Em relação aos estudos clínicos, não há nenhum ensaio clínico concluído avaliando a eficácia do CBD para transtornos psiquiátricos e sua relação com desfechos imunológicos e inflamatórios. Semelhante à evidência pré-clínica, a maioria dos ensaios clínicos que avaliaram essa associação foram conduzidos com coortes de pacientes com esclerose múltipla. Até onde sabemos, existem cinco estudos realizados com pacientes com essa doença que examinaram o perfil imunológico periférico de pacientes tratados com várias preparações de canabinóides, não apenas CBD (Filippini et al., 2022).

Três desses estudos foram realizados em indivíduos tratados com nabiximols (um extrato específico de Cannabis aprovado em 2010 como medicamento botânico com o nome comercial de Sativex que contém 2,7 mg de Δ 9-THC e 2,5 mg de CBD por puff). Todos os três estudos foram observacionais, os nabiximols foram administrados diariamente por 4 a 6 semanas (Centonze et al., 2009; Santoro et al., 2017; Sorosina et al., 2018). No entanto, nenhum desses estudos relatou qualquer efeito significativo na imunidade periférica e, em particular, Centonze et al. (2009) incluiu resultados detalhados sobre o perfil imunológico dos 20 pacientes recrutados, mostrando nenhuma modificação da frequência de células CD3+, CD14+, CD19+, CD56+, CD4+ ou CD8+ no sangue periférico (Centonze et al., 2009).

Os dois estudos restantes são, ao contrário, ensaios clínicos destinados a avaliar os efeitos dos canabinóides nos sintomas de esclerose múltipla. Nenhum dos estudos empregou

CBD puro como droga de teste, no entanto, eles foram incluídos na análise, pois ambos empregaram preparações contendo quantidades significativas de CBD e relataram dados sobre as funções imunológicas periféricas dos pacientes. No primeiro (Killestein et al., 2003), os pacientes receberam durante 4 semanas dronabinol, extrato padronizado de planta inteira de *C. sativa* (contendo 2,5 mg de THC e 20–30% de CBD) e placebo. Todos os tratamentos não tiveram efeitos na frequência de células T e B circulantes, monócitos e células NK, nem nos níveis plasmáticos de TNF- α , IL-12p40, IL-12p70 e IL-10, nem na proliferação *ex vivo* de células T (Killestein et al., 2003). O segundo (Katona et al., 2012) relatou dados de 100 pacientes com esclerose múltipla, mostrando nenhum efeito nos níveis séricos de IFN- γ , IL-10, IL-12 ou PCR, ou em frequência de células T CD3+ que expressam IFN- γ circulantes após tratamento com essas drogas (Katona et al., 2012). No entanto, nenhum deles avaliou o perfil de marcadores imunológicos no liquor ou por meio de estudos de neuroimagem relacionadas à neuroinflamação, como usando traçadores radioativos para a proteína translocadora 18 kDa (TSPO) ou marcadores derivados, levantando a questão se o CBD poderia estar impactando as respostas inflamatórias no SNC.

Portanto, em conjunto, as evidências pré-clínicas atuais apoiam o uso promissor do CBD para condições relacionadas à neuroinflamação e sugerem um mecanismo relacionado ao controle da reatividade pró-inflamatória da micróglia. No entanto, não há evidências clínicas suficientes que suportem essa afirmação, especialmente para transtornos psiquiátricos. Além disso, quais alvos podem estar potencialmente envolvidos nessa ação do CBD na micróglia e nas respostas imunes cerebrais, como os receptores CB1R, CB2R, adenosina ou vanilóides, bem como quais vias metabólicas e celulares, como a indução da autofagia, também não são compreendidos. Essas e outras questões representam alvos interessantes para pesquisas futuras no campo de estudo CBD e canabinóides.

1.10. Autofagia: Conceito e Relevância para Homeostasia do Sistema Nervoso Central

Em eucariontes, a autofagia é um mecanismo evolutivamente conservado, considerado como o principal sistema de degradação intracelular, onde os diversos componentes citoplasmáticos danificados são destinados à degradação lisossômica. Ademais, esses

componentes e seus derivados podem ser utilizados pela maquinaria celular para geração de energia ou como substrato para síntese de novas moléculas orgânicas ou organelas (AMAN et al., 2021). Vários estímulos extracelulares e intracelulares promovem autofagia, representando um mecanismo essencial pelo qual as células podem se adaptar a mudanças nas condições ambientais. No entanto, níveis basais de autofagia estão presentes em todas as células e compõem mecanismo essencial à manutenção da homeostase (DIKIC; ELAZAR, 2018).

A depender de como o material citoplasmático destinado à autofagia é entregue aos lisossomos, a autofagia pode ser classificada em três subtipos principais: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (AMAN et al., 2021). De forma sucinta, na macroautofagia, aqui referida genericamente como autofagia, por constituir o principal sistema de degradação e renovação celular no SNC, uma porção do citoplasma, incluindo agregados proteicos e organelas danificadas é envolvido por uma vesícula de membrana dupla, chamada de autofagossomo, que passa por uma série de processos de maturação até sua fusão com os lisossomos, originando o autofagolisossomo. Nesse último, a lise enzimática dos conteúdos citoplasmáticos acontecerá. A microautofagia, por sua vez, se refere ao engolfamento de pequenas porções citoplasmáticas pela membrana dos lisossomos, sendo semelhantemente degradadas. Por fim, a autofagia mediada por chaperonas é um tipo particular de autofagia em que proteínas específicas são destinadas à degradação lisossomal por meio de sua ligação e transporte por meio de proteínas reconhecedoras e adaptadoras chamadas chaperonas. Nas células de mamíferos esse tipo de autofagia é predominantemente realizado pela chaperona chamada proteína cognata do choque térmico de 70 kDa, do inglês *heat shock-cognate protein 70 KDa* (HSP70)(TEDESCO et al., 2023).

Na autofagia (ou macroautofagia), várias proteínas chamadas de proteínas relacionadas à autofagia, produto dos genes ATGs, são recrutadas em diferentes etapas, incluindo para formação do autofagossomo, maturação, fusão do autofagossomo com o lisossomo e degradação da carga, seguida pela liberação de produtos de decomposição no citosol (Para uma visão geral das etapas da autofagia, ver Fig.2). As proteínas ATGs contribuem para essas etapas e muitas delas são essenciais para uma função adequada de autofagia. A formação do autofagossomo inicia-se nos locais de montagem do fagóforo (*do inglês phagophore associated sites*, ou PAS), onde uma elongação de membrana de dupla camada em formato de copo se forma englobando parte do citoplasma, formando o

fagóforo, e quando completamente selada, se torna um autofagossomo. Diferentes organelas são consideradas como fontes de membrana para formação do fagóforo, como retículo endoplasmático (ER), mitocôndrias e complexo de Golgi, onde múltiplos PAS podem surgir (CODOGNO; MEHRPOUR; PROIKAS-CEZANNE, 2012)

A formação de fagóforos inicia após a ativação de quinase ULK-1 na superfície dessas membranas, que por sua vez tem como alvo o complexo fosfatidilinositol 3-quinase de classe III, o qual recruta múltiplas ATGs, como VPS34, BECN1, ATG14 e VPS15, para originar o fagóforo. Após isso, o alongamento da membrana do fagóforo e seu selamento em uma vesícula é regulado por duas reações. Na primeira reação, ATG12 é ativado por ATG7 (ou E1 enzima ubiquitina-ativadora) e transferido para ATG10 (E2 enzima ubiquitina-ativadora); após essas duas reações subsequentes, o ATG12 é ligado covalentemente ao ATG5 para formar o conjugado ATG12-ATG5. Este complexo interage com ATG16L1 resultando em um complexo ternário ATG12-ATG5-ATG16L1, que se localiza na membrana do fagóforo e é essencial para o seu alongamento. Este complexo se dissocia quando o autofagossomo está totalmente formado (AMAN et al., 2021; CODOGNO; MEHRPOUR; PROIKAS-CEZANNE, 2012). A segunda reação envolve a conjugação da família ATG8, que inclui a cadeia leve 3 da proteína associada aos microtúbulos (MAP-LC3/ATG8/LC3B), proteína associada ao receptor do ácido γ -amino-butírico (GABARAP) e Golgi- intensificador de ATPase associado de 16 kDa (GATE-16), à fosfatidiletanolamina (FE). LC3B, o membro ATG8 melhor caracterizado, é clivado por ATG4B para produzir a forma citosólica LC3B-I. LC3B-I é conjugado a FE na membrana do autofagossomo por meio da reação envolvendo ATG7 (semelhante a E1) e ATG3 (semelhante a E2), para formar sua isoforma LC3B-II associado à membrana do autofagossomo completamente formado. O complexo ATG12-ATG5-ATG16L também pode contribuir para conjugação de LC3B-I à FE, originando LC3B-II, atuando como uma enzima semelhante à ATG3. O LC3B-II está associado a ambos os lados da membrana do autofagossomo, interna- e externamente, e regula seu tamanho devido à sua capacidade de determinar a curvatura da membrana (CODOGNO; MEHRPOUR; PROIKAS-CEZANNE, 2012).

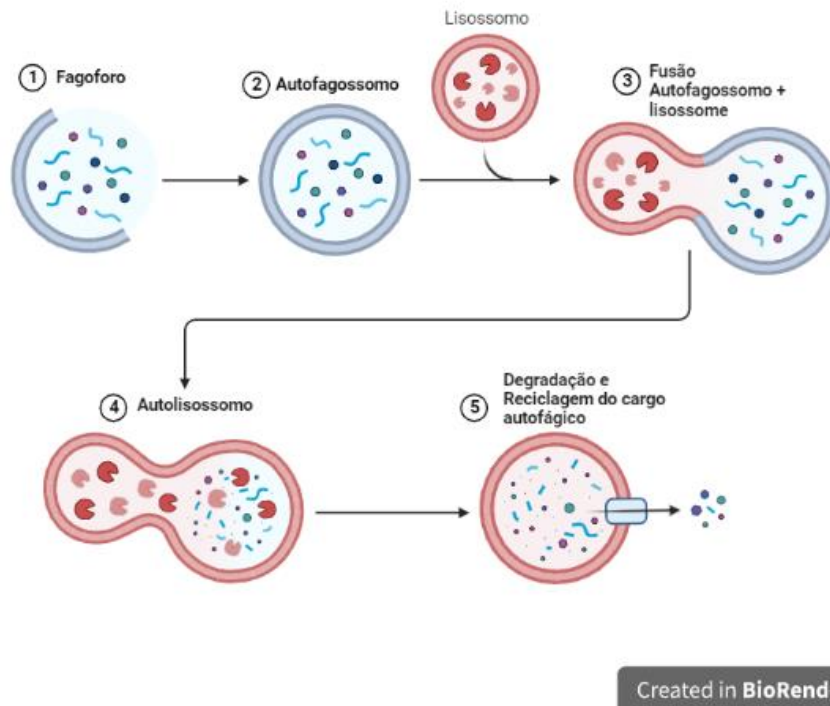
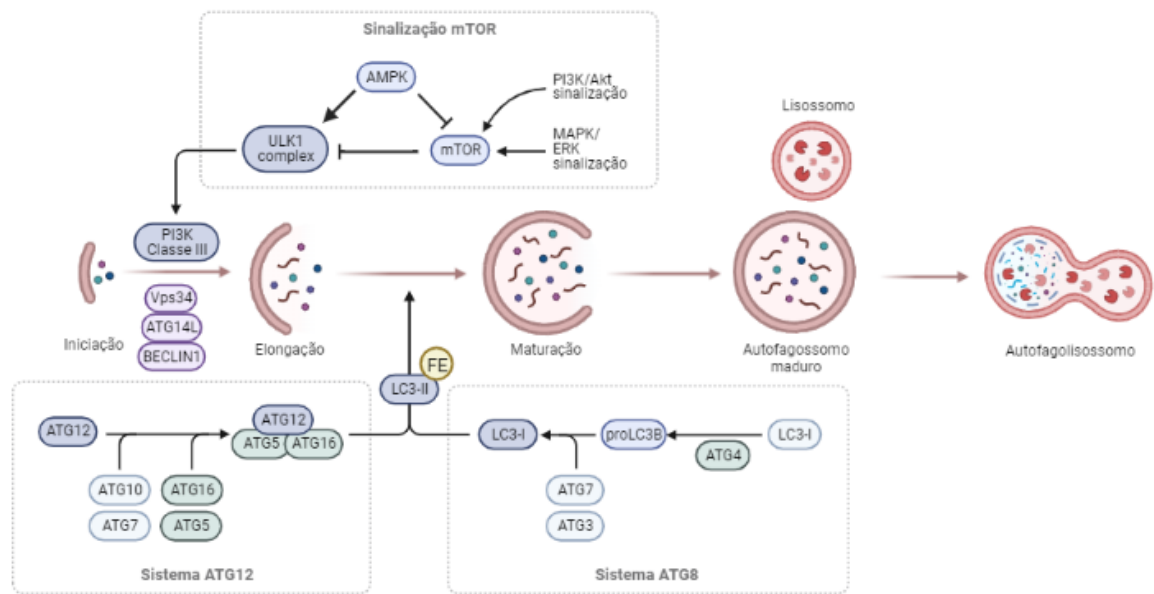


Figura 3. Etapas da (macro)-autofagia. A autofagia se inicia com a formação de uma estrutura membranar em formato de copo, chamado fagoforo, o qual pela ação de diferentes proteínas ATG, como ATG3, ATG5, ATG7, ATG12 e LC3BI-II, se alonga envolvendo um conteúdo (carga citoplasmática) e se fechando ao redor de si mesma, formando uma vesícula de dupla-membrana selada. Esse vesículo o autofagossomo é transportado para regiões perinucleares onde se fundem com os lisossomos, formando os autofagolisossomos. Por fim, o conteúdo dessas vesículas é degradado pelas enzimas líticas lisossomais, e o material originado, como aminoácidos, ácidos nucleicos e lipídeos, pode ser reutilizado em diferentes processos metabólicos pela célula. Figura criado com Biorender.com.

Os autofagossomos são, então, mobilizados em direção aos lisossomos ao longo dos microtúbulos por meio do transporte dependente de dineína; então, a membrana externa do autofagossomo se funde com o lisossomo para formar um autolisossomo, um processo que requer a proteína de membrana lisossômica LAMP-2 e a GTPase Rab7. Logo após a fusão, LC3B-II ligado à membrana externa é removido pela ATG4B e é reciclado a sua forma LC3B-I que pode ser reutilizada nos estágios iniciais do fluxo autofágico (SIL; MUSE; MARTINEZ, 2018). A função adequada e a integridade dos lisossomos são essenciais para que ocorra uma fusão bem-sucedida. A degradação da membrana interna e do conteúdo do autofagossomo, incluindo LC3B-II, depende de hidrolases lisossômicas, como as catepsinas B, D e L. O conteúdo degradado do autolisossomo é liberado no citosol para síntese de proteínas, geração de energia pela síntese de ATP e manutenção da homeostase celular (CASTOLDI; PIETROCOLA, 2021).

Um inibidor central da autofagia é o mTOR, uma proteína quinase Ser/Thr originalmente reconhecida como um alvo da rapamicina, que está envolvida em vários processos celulares, como síntese proteica, crescimento, detecção de alterações nutricionais, ambientais e autofagia. O mTOR integra vários sinais celulares que controlam a atividade autofágica. Sob condições ricas em nutrientes, a ativação do mTOR pelo excesso de aminoácidos, sobretudo triptofano, regula negativamente a autofagia através da inibição do complexo ULK-1 e proteínas associadas, como ATG13, FIP200 e ATG101. Em contraste, após privação de nutrientes (do inglês, starvation) ou inibição pela rapamicina, a inativação do mTOR leva a uma forma estável do complexo ULK-1 ativado, localizado na superfície do fagóforo, induzindo as etapas iniciais do fluxo autofágico (CODOGNO; MEHRPOUR; PROIKAS-CEZANNE, 2012).

Além disso, foram descobertas vias não-canônicas de autofagia, nas quais a formação de autofagossomos ocorre na ausência de algumas proteínas-chave da autofagia, como ATG7, ATG5, LC3 e BECLIN1. Essas vias não canônicas foram identificadas em certas circunstâncias celulares e seu papel na homeostase celular não é completamente esclarecido. De nota, a autofagia independente de LC3B e BECLIN1 e por vias não-canônicas contribui para a apoptose, ou apoptose induzida por autofagia, em neurônios corticais expostos ao agente pró-apoptótico estaurosporina (SIL; MUSE; MARTINEZ, 2018). Por outro lado, fibroblastos embrionários de camundongos *knockout* para ATG5 ou ATG7 podem ter autofagia induzida mesmo na ausência dessas proteínas-chave quando expostos a certos estressores, como estaurosporina e privação de nutrientes. Curiosamente, nessas condições, a lipidação de LC3B-I para LC3B-II não ocorre, sugerindo que as proteínas LC3B e às semelhantes à ubiquitina, de nota ATG3, ATG7 e o complexo ATG12-ATG5-ATG16L, não são necessárias para essa via de autofagia alternativa. No entanto, algumas proteínas convencionais relacionadas à autofagia, incluindo ULK-1 e o complexo VPS34, se mostraram necessárias para a autofagia alternativa (LIANG, 2019; STAVOE; HOLZBAUR, 2019). Esses achados sugerem que, sob certas condições de estresse, pode ocorrer uma via de autofagia alternativa, entretanto as vias de autofagia convencionais ou canônicas são necessárias para a depuração de agregados proteicos e organelas defeituosas nos neurônios em situação de homeostase.



Created in BioRender.com bio

Figura 4. Via canônica da autofagia. Visão esquemática da via "canônica" e das principais proteínas reguladores relacionados à autofagia (ATGs). A imagem mostra as quatro etapas e ATGs envolvidas, a partir da formação do fagóforo, alongamento e maturação do autofagossomo, até a fusão autofagossomo-lisossomo. Para detalhes, consulte o texto. ATG: autophagy-related protein; mTOR: mammalian target of rapamycin; AMPK: AMP-activated protein kinase; PI3K: phosphoinositide-3-kinase; MAPK: Mitogen-activated protein kinases; ERK: Extracellular signal-regulated kinase; FE: fosfoetanolamina. Figura criada pelo autor com Biorender.com.

Ademais, a autofagia pode ser seletiva ou não seletiva. A seletividade é mediada por receptores de autofagia que reconhecem tanto as cargas marcadas com sinais de degradação quanto a membrana do autofagossomo através da região de interação com LC3B-II (TEDESCO et al., 2023). A proteína de ligação à ubiquitina p62/SQSTM1 é o receptor de autofagia mais bem caracterizado e sua degradação no autofagolisossomo tem sido amplamente utilizada como medida do fluxo autofágico e seu acúmulo corresponde a um acúmulo do cargo autofágico e potencialmente comprometimento nos estágios finais de fusão autofagossomo com lisossomos ou da maquinaria enzimática lisossomal (KUMAR; MILLS; LAPIERRE, 2022).

No cérebro adulto de mamíferos, a neurogênese é limitada a sobretudo duas regiões: o giro denteado do hipocampo e a zona subventricular. Assim, como células altamente diferenciadas, não há substancial rotatividade de neurônios no cérebro adulto e eles

devem sobreviver por grande parte da vida do indivíduo. Como células pós-mitóticas, os neurônios dependem da autofagia e de outro sistema de qualidade de proteínas para a manutenção da homeostase intracelular, e, portanto, da viabilidade neuronal. A relevância da autofagia como um mecanismo de controle de qualidade e eficiência celular no SNC é evidenciada em modelos animais onde os genes ATGs são deletados geneticamente (STAVOE; HOLZBAUR, 2019). Camundongos *knockout* para ATG5, ATG7 e FIP200, especificamente no SNC, apresentam defeitos neurológicos e comportamentais, sobretudo déficits desenvolvimentais, incluindo reflexos anormais de aperto de membros, ataxia locomotora, déficits na coordenação motora e comprometimento cognitivo, o que resulta em morte precoce (DANA et al., 2020; TANG et al., 2014). A deficiência desses genes relacionados à autofagia causa o acúmulo de proteínas poli-ubiquitinadas em quase todas as regiões do cérebro, formando corpos de inclusão que aumentam de tamanho e número com a idade do animal. Além disso, os animais apresentam degeneração axonal e morte neuronal precoce no córtex cerebral e cerebelar (DENG et al., 2021). Esses achados destacam a importância de uma depuração contínua de proteínas citosólicas por meio da autofagia basal, a fim de evitar o acúmulo de proteínas anormais, que podem prejudicar a função neuronal, bem como seu papel de destaque para um desenvolvimento normal.

A autofagia também desempenha um papel importante na degradação de proteínas propensas à formação de agregados neuropatogênicos, como a huntingtina (relacionada à doença de Huntington) e a α -sinucleína (relacionada à Doença de Parkinson). Em concordância, a disfunção da autofagia, levando ao acúmulo de proteínas patogênicas e vacúolos de autofagia, tem sido relatada em diversos distúrbios neurodegenerativos (GUO et al., 2018). Por outro lado, a estimulação da autofagia reduz o acúmulo de HTT e α -sinucleína em diferentes áreas cerebrais, como hipocampo e substância nigra, reduz as alterações comportamentais características dessas doenças em diferentes modelos animais, e se apresenta como um mecanismo adaptativo potencial contra essas alterações neuropatogênicas. Além de um papel de degradação e reciclagem de componentes celulares, a autofagia funciona como uma resposta adaptativa exercendo ações citoprotetoras e anti-inflamatórias (CHANG, 2020). A inibição farmacológica ou genética da autofagia diminui a capacidade neuronal de responder a insultos nutricionais, físicos e químicos, sugerindo um papel adaptativo que contribui para restabelecer as condições fisiológicas. Em contraste, também há evidências de que a autofagia pode levar

à morte celular, denominada morte celular autofágica, inclusive em neurônios, sob certas condições, como privação de nutrientes e hipóxia/isquemia. Assim, a autofagia pode exercer uma ação citotóxica em vez de citoprotetora em algumas circunstâncias (JUNG; JEONG; YU, 2020). O papel diferencial da autofagia como uma resposta adaptativa ou um mecanismo que contribui para a morte celular está relacionado com a intensidade e a duração do estímulo estressor, da etapa desenvolvimental e do tipo celular envolvido (células mitóticas versus pós-mitóticas) (JUNG; JEONG; YU, 2020).

As sinapses são componentes neuronais críticos para a função cerebral. A atividade sináptica requer a participação de uma grande quantidade de proteínas, que são altamente susceptíveis a danos que levam ao seu acúmulo e prejuízo de função. A reciclagem de proteínas relacionada à autofagia desempenha um papel crucial na remoção de proteínas danificadas e na manutenção da homeostase nas sinapses. Além disso, a autofagia regula a estrutura e a função pré-sináptica (LIANG, 2019). Foi relatado que a deficiência de autofagia em neurônios dopaminérgicos resulta em secreção aumentada de dopamina em resposta à estimulação elétrica e recaptação pré-sináptica acelerada devido à falta de renovação das vesículas de neurotransmissores. Por outro lado, a autofagia aumentada induzida pela rapamicina diminuiu a densidade das vesículas sinápticas dopaminérgicas por uma liberação excessiva desse neurotransmissor (DECRESSAC et al., 2013; VIDYADHARA et al., 2023). Isso sugere que a autofagia regula a neurotransmissão por meio da degradação das vesículas sinápticas, alterando o volume do terminal sináptico e a liberação de alguns neurotransmissores. Além disso, a autofagia está envolvida na plasticidade sináptica. Após o fenômeno de depressão de longa duração, processo de plasticidade usualmente associado com a extinção de memórias e deleção de algumas sinapses, autofagossomos se acumulam nos dendritos e espinhos dendríticos das sinapses afetadas e contribuem parcialmente para a degradação do receptor AMPA de glutamato (COMPANS et al., 2021). Nessas condições, o *knockout* de ATG7 e consequente inibição da autofagia canônica recuperou parcialmente os níveis do receptor AMPA na superfície sináptica, sugerindo também o envolvimento de outros sistemas de degradação (COMPANS et al., 2021).

Além disso, devido às suas altas exigências demanda energética e taxa de consumo de oxigênio, o cérebro é altamente propenso à produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e particularmente vulnerável ao dano ou estresse oxidativo. A capacidade antioxidante endógena do cérebro para neutralizar EROS também é limitada em

comparação com outros órgãos(SALIM, 2017). Além disso, o cérebro contém altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados, que são alvos da peroxidação lipídica pelos EROS, e podem gerar metabólitos lipídicos, como eicosanóides e leucotrienos, que atuam como mediadores pró-oxidantes e pró-inflamatórios(AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014). O estresse oxidativo tem sido implicado na patogênese de distúrbios neurodegenerativos e neuropsiquiátricos, que são caracterizados por altos níveis de EROS. Nessas circunstâncias, a autofagia tem sido relacionada à redução do dano oxidativo e dos níveis de EROS por meio da remoção de agregados de proteínas pró-oxidantes e organelas danificadas (FILOMENI; DE ZIO; CECCONI, 2015).

Os EROS, por sua vez, também atuam como moléculas sinalizadoras e modulam várias vias, incluindo a autofagia, por meio da regulação redox de proteínas. O aumento de EROS normalmente leva à ativação da autofagia e ao acúmulo de autofagossomos em diferentes tipos celulares, como neurônios e células gliais (FILOMENI; DE ZIO; CECCONI, 2015). Por exemplo, o aumento de EROS mitocondriais, principalmente $O_2^{\cdot-}$, induz autofagia mediada pela ativação da AMPK durante a privação de nutrientes (TRIPATHI et al., 2013). Da mesma forma, em células de glioblastoma U87, os inibidores dos complexos mitocondriais I e II induzem a autofagia mediada por EROS, e a super-expressão da enzima antioxidante SOD2 reduz acentuadamente a formação de autofagossomos (CHEN; AZAD; GIBSON, 2009). A inibição da autofagia reduz a toxicidade dos inibidores da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais, sugerindo que a autofagia contribui para a morte celular nessas condições. Em cultura de astrócitos primários de camundongo, a inibição dos complexos mitocondriais leva falha na cadeia de transporte de elétrons e liberação de EROS mitocondriais e indução da autofagia (KULKARNI et al., 2020). Em contraste, em células de neuroblastoma humano diferenciadas SH-SY5Y, o tratamento com a neurotoxina rotenona (inibidor do complexo mitocondrial I) inibe o fluxo autofágico e leva à morte celular, enquanto o tratamento com resveratrol, um conhecido indutor de autofagia, previne parcialmente a toxicidade induzida pela rotenona nessas células (LIN et al., 2014; ZHANG et al., 2018).

Em modelos animais de injúria no SNC como a lesão cerebral traumática, isquemia/reperfusão e hipóxia, a produção excessiva de EROS estimula o estresse celular e à indução da autofagia. A produção excessiva de EROS provenientes da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH oxidase) desempenham um papel importante na morte neuronal induzida por hipóxia-isquemia e isquemia/reperfusão *in vitro* e *in vivo*

(ZHANG; WANG, 2018). Porém, embora induzido por esse estímulo, não se sabe se o aumento do fluxo autofágico evidenciado é uma consequência patológica em cascata ou um mecanismo adaptativo de compensação a esse estresse celular (WU; LIPINSKI, 2019). Nesse contexto, foi demonstrado que o tratamento com o inibidor de autofagia 3-metiladenina (3-MA), que inibe o complexo PI3K de classe III, efetivamente reduz a abundância de marcadores de autofagia e a morte neuronal induzida por autofagia. Além disso, a inibição da NADPH oxidase diminuiu a autofagia em um modelo de hipóxia e privação de glicose, sugerindo que a autofagia dependente de estresse oxidativo, contribui para a lesão cerebral nessas condições (XIAO et al., 2021). Também, durante condições de hipóxia, a autofagia também pode ser regulada pelo fator induzível por hipóxia-1 (HIF1), um elemento-chave na resposta celular à hipóxia. O HIF é estabilizado por EROS e pode ativar genes-alvo pró-inflamatórios, como os elementos de resposta transcricional ao NF κ B, como IL-6 e TNF α (WANG et al., 2017).

Como mencionado, os neurônios são particularmente vulneráveis ao acúmulo de proteínas mal dobradas e organelas danificadas; devido à sua natureza pós-mitótica altamente diferenciada, os agregados proteicos não são dissipados pela divisão celular nessas células. Além disso, o declínio dos sistemas de degradação e controle de qualidade de proteínas com o envelhecimento contribui ainda mais para a vulnerabilidade neuronal aos efeitos patogênicos desses agregados tóxicos. Para dar um exemplo ilustrativo, aproximadamente 30% das proteínas recentemente traduzidas são mal dobradas e estão propensas a formar agregados intracelulares (STAVOE; HOLZBAUR, 2019). Portanto, os sistemas de eficiência e controle celular operam continuamente para garantir o fluxo e degradação de proteínas mal dobradas e manter a proteostase (homeostasia de proteínas). Esta maquinaria envolve o sistema de redobramento, composto por chaperones, e de degradação e reciclagem, composto pelo sistema de autofagia e ubiquitina-proteassoma (LIANG, 2019).

O sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) representa a primeira linha de defesa contra proteínas mal-dobradas. No entanto, agregados ou formas oligoméricas de proteínas mal dobradas normalmente não são eficientemente degradadas pelo sistema UPS. Além disso, o acúmulo de agregados de proteínas leva à inibição do proteassoma, resultando em acúmulo adicional de proteínas mal dobradas, em uma alça de retroalimentação positiva patológica (TÜRKER; COOK; MARGOLIS, 2021). Por outro lado, a autofagia pode degradar grandes complexos proteicos, agregados e organelas danificadas. Após a

inibição do UPS, a atividade de autofagia aumenta como um mecanismo compensatório para aliviar o estresse proteotóxico subsequente. A autofagia neuronal basal é crítica para evitar o acúmulo de proteínas ubiquitinadas e corpos de inclusão neuropatogênicos (LOTTE; COX, 2020). Assim, manipulações genéticas ou farmacológicas que aumentem ou reduzam a autofagia basal podem impactar fortemente na depuração de uma variedade de proteínas propensas a formar agregados intracelulares com consequências neuropatogênicas.

Como mencionamos anteriormente, o p62/SQSTM1 é o receptor de autofagia mais bem caracterizado, exercendo papel importante na degradação via autofagia de proteínas ubiquitinadas, agregados proteicos e organelas disfuncionais. Ademais, alterações na expressão e modificações pós-translacionais da p62/SQSTM1 é um achado comum entre várias doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (KUMAR; MILLS; LAPIERRE, 2022, p. 62). Por exemplo, a fosforilação de p62/SQSTM1 na serina 403 pela caseína quinase 2 (CSK2) aumenta a afinidade de p62/SQSTM1 para proteínas poli-ubiquitinadas e a subsequente degradação mediada por autofagia. Por exemplo, a super-expressão de CSK2 reduz a formação de grandes inclusões de HTT, reduzindo a neurotoxicidade desses agregados (MATSUMOTO et al., 2011). Ademais, a super-expressão de HTT induz um aumento concomitante na expressão de p62/SQSTM1, sugerindo que p62 desempenha um papel importante de resposta adaptativa à proteo-toxicidade em modelos de doenças de Huntinton (RUÉ et al., 2013). Da mesma forma, o estresse proteotóxico induzido pela inibição do sistema UPS causa fosforilação dependente de ULK1 da p62/SQSTM1 na Serina 409. Essa fosforilação aumenta a afinidade de ligação da p62 às proteínas ubiquitinadas e aumenta a eficiência da degradação do cargo autofágico. Em contraste, a fosforilação de p62/SQSTM1 por ULK1 não ocorre sob privação de nutrientes, sugerindo que a ativação da sinalização ULK1-p62/SQSTM1 está envolvida na detecção de estresse celular e não relacionada a condições de privação de aminoácidos e glicose (LIM et al., 2015).

Outra proteína envolvida na interação entre proteassoma e autofagia é a histona desacetilase 6 (HDAC6), uma desacetilase associada a microtúbulos que interage com proteínas poli-ubiquitinadas. Em moscas *Drosophila*, a atividade de HDAC6 é crítica para garantir o fluxo autofágico basal. Além disso, a expressão ectópica de HDAC6 é suficiente para prevenir a degeneração causada pela inibição do proteassoma e toxicidade por agregados ubiquitinados (LEE et al., 2010). Além disso, o HDAC6 controla a fusão

do autofagossomo com os lisossomos nesse organismo sendo fundamental para a degradação dos agregados proteicos. Curiosamente, o HDAC6 não é necessária para a autofagia induzida pela privação de nutrientes (ZHAN et al., 2020).

Essas duas proteínas de ligação a cargos intracelulares ubiquitinados, p62/SQSTM1 e HDAC6, conferem especificidade ao controle de qualidade da autofagia e distinguem agregados proteicos aberrantes e organelas danificadas. p62/SQSTM1 e HDAC6 ligam-se preferencialmente a proteínas ubiquitinadas associadas à lisina 63 (K63). A deleção de p62/SQSTM1 ou HDAC6 induz um acúmulo robusto de cadeias de ubiquitina ligadas a K63 no cérebro de camundongos e causa alterações neurodegenerativas. Isso sugere que o tipo específico de cadeias de ubiquitina adicionadas a proteínas mal dobradas determina a qual via de degradação elas são entregues (YAN et al., 2013).

Além dos agregados proteicos, organelas danificadas, como as mitocôndrias, podem ser marcadas com ubiquitina e desencadear a autofagia seletiva, chamada de mitofagia. Após o dano mitocondrial por diferentes fatores, como estresse oxidativo, a ubiquitina quinase PINK1 é translocada para a membrana externa da mitocôndria e ativa a ubiquitina ligase Parkin, que constrói cadeias de ubiquitina para recrutar receptores de autofagia. Após, isso as proteínas ligases responsáveis pela formação do fagóforo, como ULK-1, e posteriormente, a maquinaria de maturação das vesículas autofágicas se formam ao redor da mitocôndria danificada (JETTO; NAMBIAR; MANJITHAYA, 2022). Nessas condições, PINK1 recruta os receptores de autofagia NDP52 e optineurina, e não p62/SQSTM1 (GELMETTI et al., 2017). Nos últimos anos, evidências crescentes tem apontado o papel da mitofagia e sua disfunção na gênese de vários transtornos neurodegenerativos e neuropsiquiátricos. Entretanto, esse não é foco principal desse trabalho, para revisões no tema, por favor, consulte (WANG; LIU; LU, 2019).

Por fim, com essas evidências, fica claro que a autofagia é um mecanismo fundamental para a homeostasia do SNC. Esse processo de auto-degradação está presente em todas as células de mamíferos e tecidos, tendo papel importante no SNC, sobretudo em neurônios por sua natureza altamente diferenciada. Portanto, esse processo garante a essas células um mecanismo direcionado à degradação de materiais intracelulares desnecessários ou danificados e contribui para a reciclagem basal e qualidade das proteínas e complexos intracelulares produzidos. Por outro lado, situações de estresse celular, como privação de nutrientes e morte celular, podem desencadear uma resposta que pode ser citoprotetora ou citotóxica a depender da intensidade, duração do estímulo e tipo celular.

Entretanto, parece ser consenso, de que um fluxo basal adequado de vesículas autofágicas e sua degradação é mecanismo fundamental para a sobrevivência neuronal e funcionamento ótimo do SNC.

1.11. Autofagia e regulação das funções de Micróglia e Macrófagos

Embora muitos estudos tenham focado no papel da autofagia em neurônios no contexto de homeostasia e patologia do SNC. Mais recentemente o papel da autofagia também tem sido destacado para o controle das funções microgliais. As micróglia são os principais orquestradores do sistema imune inato no cérebro, e portanto das respostas inflamatórias nesse órgão. Semelhantemente, evidências crescentes indicam que a autofagia regula finamente as respostas imunes inatas e adaptativas periféricas, influenciando ativamente a secreção de mediadores pró-inflamatórios, fagocitose e apresentação de antígenos, em macrófagos e outras células monocíticas periféricas, o que também parece ser verdade para a micróglia (PLAZA-ZABALA; SIERRA-TORRE; SIERRA, 2017; SIL; MUSE; MARTINEZ, 2018).

De fato, as micróglia são os fagócitos profissionais do cérebro, capazes de englobar e degradar micro-organismos, bem como células apoptóticas, fragmentos de mielina, restos axonais, depósitos de proteínas e sinapses. A fagocitose é um mecanismo evolutivamente conservado pelo qual uma célula reconhece, engloba e degrada componentes extracelulares nos lisossomos utilizando uma maquinaria celular que, até certo ponto, é semelhante à da autofagia (BROWN; NEHER, 2014). Certamente, autofagia e fagocitose compartilham semelhanças morfológicas e mecânicas marcantes, uma vez que ambos os processos dependem da formação de estruturas vesiculares transitórias (autofagossomos e fagossomos, respectivamente) que engolfam e entregam carga englobada aos lisossomos para lise. Além disso, autofagia e fagocitose são formas primitivas de aquisição de nutrientes, e ambos os processos desempenham funções essenciais na manutenção da homeostase celular e tecidual através da degradação de material de conteúdos intra- e extracelulares. Entretanto, ao contrário da autofagia, que pode ser encontrado em praticamente todos os tipos celulares e tecidos em mamíferos, a fagocitose é uma atividade especializada de um conjunto de células imunes, incluindo macrófagos e micróglia, células dendríticas e neutrófilos. Curiosamente, evidências recentes indicam uma interação funcional importante entre autofagia e fagocitose durante

a resposta imune inata em macrófagos periféricos, bem como na micróglia. A potencial ação reguladora da autofagia sobre a fagocitose pode ocorrer em diferentes etapas da cascata fagocítica, incluindo engolfamento de carga, maturação de fagossomos e sua fusão (PLAZA-ZABALA; SIERRA-TORRE; SIERRA, 2017).

Nesse contexto, um exemplo ilustrativo da relação entre autofagia e fagocitose é a participação de proteínas ATGs em mecanismos de fagocitose, em especial a fagocitose mediada pela proteína LC3B. De fato, durante esse último processo, a maquinaria de proteínas relacionadas à LC3B é direcionada para os fagossomos recém-englobados para promover um adequado transporte e fusão com os lisossomos (MÜNZ, 2016; ROMAO et al., 2013). Nesse contexto, a fagocitose mediada por LC3B tem papel importante nas respostas desencadeadas por apresentação de antígenos extracelulares e regulação do processo inflamatório após ativação de receptores do tipo Toll (do inglês, toll-like receptors ou TLRs), ou por células apoptóticas. Em todas essas condições, a proteína LC3B é recrutada para o fagossomo de membrana única, dependendo da atividade de outras proteínas autofágicas, como BECLIN-1, ATG-5 e ATG-7, porém independente do recrutamento da enzima ULK-1 (MARTINEZ et al., 2011). Como consequência, LC3B associa-se a fagossomos de membrana única, sugerindo indução de fagocitose na ausência de uma resposta autofágica (MÜNZ, 2016). Portanto, durante a fagocitose mediada por LC3B, o recrutamento da maquinaria de autofagia promove a degradação eficiente da carga extracelular por fagocitose. No entanto, não está claro se a translocação dessas proteínas ATGs para fagossomos é um evento essencial para a conclusão da fagocitose, uma vez que foi demonstrado que macrófagos periféricos derivados de camundongos *knockout* para ATG-5 e ATG-7 não exibem um atraso na maturação de fagossomos contendo partículas opsonizadas e sua degradação em fagolisossomas (SANJUAN et al., 2007). Isso sugere que as proteínas ATGs podem não ser necessárias para todos os tipos de fagocitose.

Além disso, a autofagia foi sugerida como um mecanismo importante para a fagocitose de corpos apoptóticos mediada por micróglia e macrófagos. De fato, o tratamento com o inibidor autofágico 3-MA, que bloqueia a ativação do complexo PI3K de classe III induzidos pela ULK-1, foi capaz de reduzir a função fagocítica e impactar negativamente a viabilidade de macrófagos murinos em cultura, indicando um possível efeito citoprotetor da autofagia para essas células (ZHOU et al., 2016). Também, o tratamento com o 3-MA foi capaz de inibir a fagocitose basal mediada por LC3B em macrófagos, entretanto, não foi esclarecido em quais etapas celulares o 3-MA de fato estaria inibindo

para impactar nos mecanismos de fagocitose, uma vez que a fagocitose dependente de LC3B seria independente da função da ULK-1 (ROMAO et al., 2013).

Por outro lado, foi demonstrado que eventos indutores de autofagia, como privação de nutrientes ou o inibidor do complexo mTOR rapamicina diminuem de forma reversível a atividade fagocítica de macrófagos periféricos em cultivo celular, sugerindo que a indução de autofagia também pode diminuir a capacidade fagocítica de macrófagos. No entanto, esse estudo não demonstrou de forma conclusiva se o fluxo de autofagia foi induzido por falta de nutrientes e rapamicina, nem qual etapa da fagocitose foi impedida por esse processo, como reconhecimento, internalização, ou a degradação de substratos fagocíticos (LIMA et al., 2011). Em alinhamento com as evidências anteriores acerca da participação da autofagia como regular positivo da fagocitose, outro estudo demonstrou que a privação de nutrientes, com consequente aumento do fluxo autofágico em macrófagos periféricos, regulou positivamente a fagocitose de bactérias. No entanto, esse estudo também reportou que o aumento da atividade fagocitária não dependeu da indução de vias canônicas autofágicas, uma vez que o *knockdown* do gene de ATG-7 não impactou nessa resposta (MARTINET et al., 2009). Em conclusão, mais estudos são necessários esclarecer as consequências da ativação da autofagia na resposta fagocitária de macrófagos. Estudos semelhantes também precisam ser conduzidos para linhagens e células microgliais primárias.

No SNC, a remoção de células apoptóticas pelas micróglia é um mecanismo crucial para prevenir o extravasamento de substratos tóxicos e pró-inflamatórios para o parênquima cerebral, conhecidos genericamente como padrões moleculares associados ao dano (do inglês, *damage associated molecular patterns* ou DAMPs). Isso evita o desencadeamento de mecanismos de autoimunidade contra epítomos do SNC e inflamação crônica (MÁRQUEZ-ROPERO et al., 2020). Nesse contexto, manipulações genéticas de proteínas relacionadas à fagocitose em moscas *Drosophila* demonstraram o impacto da fagocitose de células apoptóticas para a prevenção da neurodegeneração associada ao envelhecimento. Por exemplo, a deleção do receptor fagocítico Draper nessas moscas levou ao acúmulo de neurônios apoptóticos, que persistem não degradados, ao longo da vida e induzem a neurodegeneração precoce (ETCHEGARAY et al., 2016). Análise dos receptores fagocíticos relacionados ao englobamento e/ou degradação indicou que os defeitos na fagocitose mediada sobretudo por micróglia, estavam relacionados sobretudo a disfunções da maturação do fagossoma, nas quais proteínas ATGs, como LC3B tem

papel importante. Também foi demonstrado que a fagocitose por células gliais de *Drosophila* depende da ativação do complexo TORC1 (proteína homóloga à MTORC1 de mamíferos) e inibição de ATG1 (uma proteína homóloga à ULK-1 de mamíferos), uma vez que a deleção genética ou inibição desses fatores, além de inibir o fluxo autofágico, previne o acúmulo de corpos apoptóticos e neurodegeneração relacionada (ETCHEGARAY et al., 2016). Portanto, é possível hipotetizar que a inibição da autofagia pode permitir a translocação da maquinaria de formação de autofagossomos para a fagocitose de corpos apoptóticos. Portanto, é possível especular que mecanismos semelhantes ocorram durante a fagocitose de células apoptóticas pela micróglia no cérebro de mamíferos, porém mais estudos precisam ser conduzidos.

Ainda em relação à autofagia e fagocitose em micróglia, foi demonstrado que os emaranhados neurofibrilares de proteína tau, outra alteração neuropatológica da Doença de Alzheimer, podem ser degradadas pela micróglia por mecanismos envolvendo autofagia. De fato, a micróglia pode internalizar essas fibras intracelulares por mecanismos não completamente esclarecidos e são degradadas pela formação de vesículas de membrana dupla que lembram autofagossomos e de forma dependente de ATG-7 e LC3B (CHO et al., 2014). Esse estudo, porém, não esclareceu se esses emaranhados são internalizados, por exemplo, por endocitose, fagocitose ou outros mecanismos, e não é possível descartar a possibilidade de depuração desses filamentos por fagocitose mediada por LC3B, como mencionado para macrófagos periféricos.

A microglia adulta também pode desempenhar um papel fundamental na homeostasia sináptica no cérebro adulto e durante o desenvolvimento (TAY et al., 2018). De fato, diversas evidências apontam a participação de um remodelamento sináptico disfuncional microglial e fagocitose excessiva de elementos sinápticos em diferentes doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas. Muitas vezes, a perda anormal de sinapses é um elemento precoce na história natural da doença e precede o surgimento de alterações neuropatológicas mais marcantes, como os depósitos de beta-amilóide, e a perda cognitiva generalizada na Doença de Alzheimer (TAY et al., 2018). Estudos avaliando o papel da poda sináptica microglial em doenças neurodegenerativas apontam o possível envolvimento da autofagia no refinamento das sinapses pela micróglia. Ademais, foi reportado que os genes relacionados à autofagia ATGs podem desempenhar um papel no desenvolvimento de transtornos desenvolvimentais, como o transtorno do espectro do autista (TEA) (DENG et al., 2021). De fato, a deleção condicional de ATG-7 de células de origem mieloide, incluindo micróglia, provocam alterações na eficiência da poda

sináptica, levando a um número aberrante de sinapses e prejuízo da conectividade funcional entre regiões cerebrais, bem como o aparecimento de anormalidades comportamentais características do TEA, incluindo defeitos sociais e comportamentos estereotipados (KIM et al., 2017).

Além da fagocitose e suas consequências para a homeostasia no SNC, como poda sináptica e degradação de corpos apoptóticos, a autofagia também desempenha papel importante na modulação das respostas inflamatórias microgлияis. De fato, as micrógлия são os efetores imunes do cérebro e respondem a modificações no ambiente externo e interno do SNC (JÜLG; STROHM; BEHREND, 2021). Usualmente, em resposta à injúria (morte celular) ou infecções, a micrógлия assume um estado pró-inflamatório, que é iniciado com o objetivo de neutralizar a ameaça existente e promover reparo tecidual. Porém, a ativação sustentada ou anormal dessa resposta pró-inflamatória pode cursar com consequências neurotóxicas e doenças do SNC (TAY et al., 2018).

Nesse contexto, a resposta imune inata pode ser regulada em diferentes níveis celulares, como ligação a receptores de membrana, transcrição, modificações pós-translacionais e epigenética, cujo desfecho final será descrito no balanço entre citocinas e outros mediadores pró- e anti-inflamatórios. Nos últimos, tem sido dado destaque no papel dos sistemas de degradação proteolítica para controle da resposta imune inata. Evidências prévias já reportaram o papel do sistema UPS na regulação da inflamação em macrófagos e micrógлия (DERETIC; SAITOH; AKIRA, 2013). Interessantemente, alguns estudos também destacam o papel da autofagia no controle da resposta imune dessas células (SU et al., 2016). Nesse contexto, inflamosomas são complexos macromoleculares citosólicos que são formados após o estímulo de DAMPs e ou moléculas derivadas de microorganismos a receptores associados a padrões (do inglês, *pattern recognition receptors*, PRR) e ativando respostas imunes específicas. Diversos tipos de inflamosomas foram identificados e eles regulam diferentemente proteases inflamatórias, da família das caspases. Ademais, os inflamosomas possuem uma proteína sensor de ligante e adaptadora, chamada de proteína *speck* associada à apoptose (do inglês *apoptosis-associated Speck-like protein*, ASC). Essa última leva à conversão da caspase-1 para sua forma ativada e clivagem das citocinas pró-inflamatórias pro-IL-1 β e pro-IL-18 em suas formas maduras (GUO; CALLAWAY; TING, 2015).

Nos últimos anos, estudos tem demonstrado que a indução de autofagia suprime a ativação do inflamosoma chamado de domínio piridina 3 da família NLR (NRPL3) (PLAZA-ZABALA; SIERRA-TORRE; SIERRA, 2017). Por outro lado, a inibição do fluxo

autofágico por ferramentas farmacológicas ou genéticas, como *knockout* de ATG7 e ATG13 aumenta a secreção das formas maduras de IL-1 β e IL-18, dependentes do inflamassoma, em modelos murinos de inflamação periférica, como de Doença de Crohn e doenças cardiovasculares (MURTHY et al., 2014; RAZANI et al., 2012). Adicionalmente, o tratamento com compostos que ativam o fluxo autofágico, como o antioxidante polifenólico resveratrol, foi capaz de diminuir a atividade do inflammasoma NRLP3 e a expressão de citocinas pró-inflamatórias relacionadas. Os mecanismos pelos quais a autofagia pode inativar o inflamassoma incluem a degradação proteolítica de sua proteína adaptadora ASC e ou das formas precursoras pro-IL-1 β e pro-IL18, e por meio da reciclagem de organelas danificadas, como as mitocôndrias por meio de mitofagia (CHANG et al., 2015). Em modelos de doenças neuroinflamatórias, como o modelo de encefalomielite aguda induzida, indutores de autofagia, como rapamicina e drogas experimentais, como o ativador de autofagia AZD8055, foram capazes de regular negativamente a atividade do inflamassoma com melhora consequente nos déficits comportamentais e motores associados a esse modelo (HE et al., 2021a).

Por outro lado, nesse mesmo modelo, a inibição da autofagia por 3-MA por 10 dias, não apenas comprometeu a progressão do fluxo autofágico, representado pela expressão reduzida de LC3B-II e BECLIN1, como também promoveu aumento da infiltração de monócitos periféricos ativados, microgliose (aumento da densidade microglial), e aumento do número de neurônios apoptóticos, o que foi seguido por piora dos déficits motores e comportamentais associados ao modelo. A indução de autofagia com tratamento com rapamicina foi capaz de reverter as alterações relacionadas ao fluxo autofágico reduzido, e parcialmente atenuou os déficits clínicos relacionados ao modelo (FENG et al., 2017).

Como mencionado, há evidências robustas de que a liberação de mediadores pró-inflamatórios pela micróglia impacta substancialmente no desenvolvimento e progressão de diferentes doenças neurológicas e neuropsiquiátricas. Além disso, a resposta inflamatória microglial contribui para a infiltração de células efetoras imunológicas periféricas, que contribuem ainda mais para a liberação de mediadores inflamatórios (TAY et al., 2018; WANG et al., 2022a). Nesse contexto, a micróglia de camundongos idosos (mais do que 10 meses de vida) exibe níveis basais aumentados de diferentes mediadores inflamatórios, como TNF α , IL-1 β e IL-6. Interessantemente, essas mesmas micróglia também demonstram sinais de acúmulo de componentes intracelulares (grânulos de lipofuscina, glicogênio, aglomerados de proteínas e organelas danificadas),

sugerindo que o envelhecimento pode estar relacionado ao comprometimento de mecanismos de depuração lisossômica e autofagia nessas células (FRANCESCHI et al., 2017). Esses achados tem sido reforçados por outro estudo demonstrando que a deficiência de genes relacionados à autofagia ATGs está positivamente associada ao aparecimento de fenótipo pro-inflamatório em macrófagos periféricos. Assim, os macrófagos *knockout* para ATG-7 exibem aumento da atividade do inflamassoma NLRP3 e aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e TNF- α em níveis basais e após exposição à toxina bacteriana LPS. Esses resultados indicam que a deleção de ATG-7 induz um perfil pró-inflamatório em macrófagos (STRANKS et al., 2015).

A resposta inflamatória microglial também é decisiva para a inflamação no SNC após eventos isquêmico e hipóxia e a autofagia também parece desempenhar papel modulador importante nessas respostas (GUO et al., 2018). De fato, a isquemia cerebral provoca agudamente um fenótipo microglial pró-inflamatório que pode cursar com consequências neurotóxicas e morte neuronal aumentada, entretanto, esse estado deve ser posteriormente substituído por estágios microgliais relacionados à uma resposta anti-inflamatória e de reparação tecidual (HICKMAN et al., 2018). Curiosamente, relatórios recentes indicam que a autofagia pode modular a inflamação microglial em modelos de isquemia cerebral em roedores. Assim, camundongos submetidos ao modelo de oclusão permanente da artéria cerebral medial exibem consistentemente um aumento tempo-dependente da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 no córtex cerebral, bem como aumento da densidade de micróglia e mudança para um fenótipo reativo amebóide (YANG et al., 2015). Este fenômeno parece ser fortemente influenciado pela autofagia, pois o tratamento com o inibidor de autofagia 3-MA diminui essa resposta aguda pró-inflamatória e microglial. Por outro lado, o tratamento com rapamicina aumenta os níveis corticais desses mediadores e ativação microglial, embora os efeitos da rapamicina no fluxo de autofagia microglial não tenham sido diretamente avaliados nesse estudo (YANG et al., 2015).

A inflamação crônica também é característica comum entre várias doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (FRANCESCHI et al., 2017). Achados recentes também sugerem que a autofagia pode desempenhar um papel na modulação do resposta inflamatória microglial no contexto de inflamação crônica associada a doenças neurodegenerativas, como Doença de Alzheimer e de Parkinson. Na doença de Alzheimer, a autofagia parece regular a ativação do inflamassoma mediada por

aglomerados beta-amilóide na micróglia. Nesse contexto, *knockout* de LC3B ou ATG-7 em células microgliais murinas em cultura promove a ativação do inflamassoma (NLRP3) e aumenta a secreção de IL-1 β em após exposição à proteína amilóide (CHO et al., 2014). Em contraste, o *knockout* de LC3B não afetou os níveis secretados de TNF- α após exposição à proteína amilóide, sugerindo que a maquinaria da autofagia pode influenciar seletivamente o inflamassoma NLRP3(CHO et al., 2014). Além disso, o meio condicionado de micróglia *knockout* para LC3B e expostas à proteína amilóide foi capaz acentuar o dano neuronal em comparação com o meio de micróglia sem deleção de LC3B, indicado pela expressão de marcadores pró-apoptóticos e redução de viabilidade celular de neurônios *in vitro* (CHO et al., 2014; PLAZA-ZABALA; SIERRA-TORRE; SIERRA, 2017).

Em relação à Doença de Parkinson, estudos recentes também apontam que a autofagia pode regular as funções micróglia nesse contexto. Por exemplo, a infusão intra-substância negra da tóxina 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺) em ratos aumenta a atividade da caspase-1 e secreção de IL-1 β na micróglia dessa região cerebral. Curiosamente, o flavonoide fenólico anti-inflamatório, baicaleína, é capaz de atenuar a inflamação microglial e concomitantemente, aumentar os níveis de expressão da isoforma LC3-II no SN de ratos injetados com MPP⁺(HUNG et al., 2016). Porém, esse estudo não determinou se os aumentos induzidos por MPP⁺ nos níveis de LC3-II estavam associados à ativação ou bloqueio do fluxo autofágico diretamente e, portanto, foi inconclusivo sobre a possível contribuição da autofagia para inflamação microglial. Outro estudo recente também mostrou que a metformina, uma droga antidiabética e inibidora do complexo MTORC1, pode induzir aumento do fluxo autofágico na substância negra de camundongos expostos à injeção intracerebral da toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina/probenecida (MPTPp), outro modelo de Doença de Parkinson (LU et al., 2016). Apesar desses achados promissores, estudos adicionais são necessários para desvendar o potencial envolvimento da autofagia na neuroinflamação microglial relacionada a essas condições neurodegenerativas.

Por fim, Jin et al. (2018) adicionou uma importante evidência ao campo, ao demonstrar que em células microgliais murinas BV2, o tratamento com a citocina pró-inflamatória TNF α causou um comprometimento do fluxo autofágico evidenciado pela taxa de conversão LC3B-I para LC3B-II, bem como aumentou a expressão de outros marcadores pró-inflamatórios, como óxido nítrico, IL-1 β e IL-6. Por outro lado, indução de autofagia por meio da privação de nutrientes (privação de soro) ou farmacologicamente (via

tratamento com rapamicina ou resveratrol) suprimiram o aumento de marcadores pró-inflamatórios e induziram a expressão de mediadores anti-inflamatórios, como Arginase1, Ym1/2, and IL-10. Inibição da autofagia por meio do tratamento com 3-MA ou do *knockdown* de ATG5 mimetizaram o fenótipo pró-inflamatório causado pelo TNF α (JIN et al., 2018, p. 20). Adicionalmente, Li et al. (2018) demonstrou o microRNA mir223 tem papel importante para o controle da autofagia microglial em condições pró-inflamatórias, como no modelo de EAE e exposição ao LPS. De fato, a deficiência de mir233 significativamente reduziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias, desmielinização e sintomas clínicos no modelo de EAE, ao mesmo tempo que aumentou a abundância do fenótipo homeostático microglial e autofagia nessas células. Esse efeito foi dependente do aumento da expressão de ATG16L1 e LC3B-II, o que foi revertido pelo co-tratamento com 3-MA e super-expressão de mir233. Portanto, esse microRNA parece ser um alvo promissor para a regulação da autofagia em células microgliais em contextos de inflamação no SNC (LI et al., 2018).

Portanto, considerando conjuntamente, essas evidências apontam que a autofagia é um processo fundamental para a regulação das funções microgliais tanto em situações de patologia quanto homeostasia no SNC. De nota, a autofagia parece regular a resposta inflamatória da micróglia frente a eventos agudos e crônicos no SNC, porém mais estudos são necessários para entender a dinâmica tempo-dependente entre o fluxo autofágico e outros processos celulares, como fagocitose, mas também como a modulação da autofagia pode representar ganhos terapêuticos para patologias do SNC.

1.12. Autofagia e Depressão: Interface com Sistema Imune

Como mencionado, a depressão é um transtorno mental severo e incapacitante que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo. Ademais, as grandes limitações no tratamento atual da depressão, pelo menos considerando as drogas de primeira-linhas, como inibidores de recaptção de serotonina, acentuam ainda mais o impacto negativo dessa doença como problema de saúde pública. Embora a depressão seja uma condição multifatorial em que fatores de risco genético e ambientais interajam para a determinação da doença, esta cada vez mais evidente o papel da neuroinflamação e respostas anormais microgliais para a gênese desse transtorno (WANG et al., 2022a). Nesse contexto, a autofagia é um processo ubíquo evolutivamente conservado em todas as células de

mamíferos e que parece ser essencial não apenas para a homeostasia do SNC, mas também para a adaptação a eventos estressores celulares (SU et al., 2016).

Os inflamassomas, incluindo o complexo NLRP3, funcionam como sensores para uma ampla gama de estímulos e sinais celulares neuroimunes, como DAMPs e PAMPs. Diversas evidências tem apontado o papel do inflamassoma como mediador importante da neuroinflamação associada a transtornos neuropsiquiátricos, como depressão (GUO; CALLAWAY; TING, 2015). Nesse contexto, expressão gênica aumentada de NLRP3 e de caspase 1 foi demonstrado em células mononucleares periféricas de pacientes com MDD, bem como aumento concomitante dos níveis séricos de IL-1 β e IL-18 (ALCOCER-GÓMEZ et al., 2014). Eventos estressores psicossociais são fator de risco estabelecido para MDD. Nesse contexto, ampla gama de evidências clínicas e preclínicas advogam para o potencial de eventos estressores ambientais de estimular uma resposta pró-inflamatória sistêmica e cerebral via ativação do inflamassoma (LU; ZHANG; YANG, 2022).

Interessantemente, camundongos *knockout* para NLRP3 se mostraram resistentes aos efeitos do estresse crônico de indução de elevação de IL-1 β e transformação microglial para estados pró-inflamatórios no hipocampo, bem como para comportamentos tipo-depressivos (SU et al., 2017). Ademais, inibidores seletivos do inflamassoma como VX-765 podem prevenir a ativação do NLRP3 e resposta pró-inflamatória microglial no hipocampo e aliviar o comportamento do tipo-depressivo de camundongos submetidos ao modelo de estresse crônico imprevisível (ZHANG et al., 2015). Esses achados sugerem que ativação do complexo inflamassoma NLRP3 e a consequente produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, em especial IL-1 β , é um mecanismo fundamental para o desenvolvimento das consequências comportamentais e neuroimunes relacionadas ao estresse crônico.

De fato, tem sido hipotetizado que autofagia tenha evoluído como um importante mecanismo de adaptação e sobrevivência para organismos unicelulares lidarem com condições adversas, mas também para organismos multicelulares frente a diferentes estressores ambientais (DERETIC; SAITOH; AKIRA, 2013). Essas hipóteses são sobretudo relevantes no contexto da plasticidade das respostas imunes, inclusive no cérebro, frente a diferentes eventos estressores. Como mencionado anteriormente, a atividade do inflamassoma, capacidade fagocítica e produção de citocinas pró-inflamatórias em monócitos, macrófagos e micróglia é fortemente modulada pela

autofagia, e diferentes estratégias que diminuem o fluxo autofágico ou a eficiência do sistema de proteólise, cursa com um estado anormal hiper-inflamado dessas células(LU; ZHANG; YANG, 2022).

De fato, como um mecanismo regulador negativo do inflamassoma, a indução de autofagia é capaz de direcionar as formas precursoras pró-IL-1 β e pró-IL18 para os autofagossomos para degradação em resposta à estimulação inflamatória. Em macrófagos, a pró-IL-1 β foi especificamente sequestrada em autofagossomos após estimulação de receptores TLR4 por LPS, enquanto a ativação adicional da autofagia com rapamicina induziu maior degradação da pró-IL-1 β e bloqueou a secreção subsequente da citocina madura mesmo após estímulo imune com a endotoxina [(HARRIS et al., 2011). Resultados semelhantes de que indutores de autofagia, como rapamicina, bloqueou o aumento da secreção sérica de IL-1 β em resposta ao desafio com LPS também foram observados em camundongos in vivo após desafio sistêmico com essa endotoxina (1 mg/kg)(JIA et al., 2019). Em células microgliais BV2, a secreção de IL-1 β desencadeada por LPS depende da inibição do complexo ULK-1 via ativação da proteína quinase ativada por mitógeno p38a (p38 MAPK). Por outro lado, a inibição de ULK-1 sozinha pelo inibidor farmacológico específico SB203580 foi capaz de induzir a transformação pró-inflamatória microglial e secreção aumentada de IL-1 β , sem estímulos imunes adicionais (HE et al., 2017).

A neuroinflamação é um componente fisiopatológico chave compartilhado pelos transtornos neurodegenerativos e neuropsiquiátricos. Nesse ínterim, a disfunção da autofagia é proposto como um fator contribuinte para a patofisiologia da depressão. Nesse ínterim, foi demonstrado que a neurotrofina BDNF, fundamental para os mecanismos de plasticidade sináptica alterados na MDD e alvo para o efeito de múltiplas drogas antidepressivas, foi capaz de induzir autofagia, aumento da conversão de LC3B-I em LC3B-II e formação de autofagossomos em neurônios hipocámpais primários de ratos. Ademais, por meio desse efeito, o BDNF protegeu os neurônios contra os efeitos citotóxicos da exposição á hipóxia (CHEN et al., 2013). Ademais, foi demonstrado uma redução do fluxo autofágico (representado pela expressão de LC3B-II e BECLIN-1) no hipocampo de camundongos expostos à administração crônica de corticosterona ou estresse crônico imprevisível (CUS), ambos modelos animais bem estabelecidos de depressão (CHOI et al., 2021; XIAO et al., 2018).

Diversos antidepressivos parecem ter efeito importante no fluxo autofágico. De fato, HWANG et al. (2021) reportaram que o antidepressivo sertralina ativou o fluxo autofágico via modulação da sinalização AMPK-mTOR em células umbilicais endoteliais humanas (HWANG et al., 2021). Adicionalmente, outro estudo que avaliou o tratamento com nove antidepressivos (fluoxetina, paroxetina, mianserina, mirtazapina, venlafaxina, desvenlafaxina, amitriptilina, imipramina e agomelatina), mostrou um aumento da formação de vesículas autofágicas e dos níveis de expressão de mRNA de BECLIN-1 e LC3B em células mononucleares sanguíneas de pacientes deprimidos (ALCOCER-GÓMEZ et al., 2017). Em astrócitos e neurônios primários de camundongos, os antidepressivos amitriptilina e citalopram significativamente aumentaram a expressão de marcadores de autofagia, como LC3B-II e BECLIN-1, de forma parcialmente dependentes da inibição da via PI3K-AKT-mTOR (ZSCHOCKE et al., 2011). É importante ressaltar que há evidências de um modelo de estresse social crônico revelador de que os efeitos antidepressivos da paroxetina dependem da proteína de ligação FK506 51 (FKBP51), uma co-chaperona Hsp90 e reguladora do receptor de glicocorticóide, que pode interagir com a proteína ATG BECLIN-1, alterando sua fosforilação e desencadeando vias autofágicas (GASSEN et al., 2014). Esses resultados juntos destacam como potencial efeito comum de diferentes drogas antidepressivas a ativação de vias pró-autofágicas.

Entre estratégias não-farmacológicas antidepressivas, foi demonstrado que um modelo de eletroconvulsoterapia induzido por estímulos convulsivos em ratos foi capaz de aumentar o fluxo autofágico no hipocampo representado pelo aumento da expressão do complexo conjugado ATG5-ATG12 e da isoforma LC3B-II (OTABE et al., 2014). O enriquecimento ambiental é outra estratégia com efeito antidepressivo e capacidade de aumentar a neurogênese e a sinaptogênese, exercendo efeitos antidepressivos e ansiolíticos em vários modelos animais [143]. Interessantemente, o enriquecimento ambiental foi capaz de aumentar a conversão de LC3B-I para LC3B-II no hipocampo de ratos (TAKAHASHI et al., 2014). Semelhantemente, o exercício físico tem inúmeros benefícios para a saúde mental e é usado como uma estratégia comportamental de tratamento para MDD [145]. O treinamento físico de camundongos executados em uma esteira foi capaz de aumentar a conversão de LC3B-I para LC3B-II e a degradação de SQSTM1/p62 no córtex cerebral (HE; SUMPTER; LEVINE, 2012). Também foi demonstrado que o exercício físico em esteira por 2 semanas em camundongos foi capaz

de induzir autofagia no hipocampo desses animais e aumento da expressão hipocampal de BDNF. Adicionalmente, o exercício causou melhora do aprendizado espacial e retenção de memórias, de forma dependente da indução de autofagia, uma vez que co-tratamento com o inibidor autofágico hidroxicloroquina, bloqueou os efeitos benéficos do exercício físico (KHOURY et al., 2023).

É importante ressaltar ainda que o CBD cujos efeitos antidepressivos, inclusive efeito antidepressivo rápido, tem sido demonstrado em diferentes modelos animais, também parece ser um importante regulador da autofagia em células do SNC. De fato, Vrechi et al. (2021) reportou que o CBD foi capaz de induzir aumento do fluxo autofágico em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e astrócitos murinos. Esse efeito foi parcialmente dependente da ativação dos receptores CB1r, CB2r e TRPV1, uma vez que o tratamento com antagonistas específicos desses alvos, parcialmente bloquearam o efeito do CBD na autofagia. Adicionalmente, o CBD induziu autofagia de forma dependente da enzima iniciadora de ULK-1, mas independente de mTORC1, sugerindo a indução de uma via não-canônica de autofagia (VRECHI et al., 2021).

Nesse contexto, é importante ressaltar que uma associação promissora tem sido estabelecida entre o efeito antidepressivo e anti-inflamatório de drogas antidepressivas clássicas e novos agentes, por meio da autofagia. De fato, foi demonstrado em camundongos C57BL/6J submetidos a estresse crônico de contenção (30 dias) e em células de fibroblastos embrionários humanos que diferentes antidepressivos (fluoxetina, paroxetina, mianserina, mirtazapina, venlafaxina, desvenlafaxina, amitriptilina, imipramina e agomelatina) foi capaz de inibir a ativação do inflamassoma NRLP3 de forma dependente da autofagia, uma vez que o *knockdown* de ATG5 bloqueiou esse efeito (ALCOCER-GÓMEZ et al., 2017). Ademais, o ácido salvianólico B (SalB), um composto natural que contém propriedades anti-inflamatórias e antidepressivas, atenuou o comportamento tipo-depressivo induzido pela injeção sistêmica de LPS (0.5 mg/ kg) em camundongos, inibiu a ativação do inflamassoma NRLP3 e produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , no hipocampo, bem como restaurou o comprometimento do fluxo autofágico induzido por LPS nessa mesma região cerebral (JIANG et al., 2017). Portanto, é importante considerar a regulação do fluxo autofágico como um importante mecanismo subjacente aos efeitos anti-inflamatórios e neuroimunes de diferentes drogas com efeito antidepressivo, entretanto maior conhecimento é necessário sobre quais etapas do fluxo autofágico são especificamente afetadas pelos antidepressivos, bem como quais

tipos celulares no SNC são impactados por esse efeito, e as consequências para suas funções. Nesse contexto, a modulação da autofagia na micróglia desponta como um alvo promissor para a convergência desses efeitos, considerando o importante papel dessas células para orquestrar as respostas imunes no SNC, sobretudo em situações de estresse fisiológico.

2. JUSTIFICATIVA

A depressão ou MDD constitui umas das principais causas de morbidade e perda de anos produtivos de vida no mundo, além de ser uma doença altamente prevalente com estimativas de afetar mais de 300 milhões de indivíduos ao redor do mundo por ano. A depressão também é associada a um enorme custo socioeconômico da ordem de pelo menos 340 milhões de dólares/ano nos EUA. Estatísticas precisas não estão disponíveis para o Brasil. Apesar disso, o tratamento farmacológico de primeira linha para depressão apresenta limitações consideráveis, em especial: eficácia reduzida (apenas cerca de 1/3 dos pacientes respondem ou apresentam melhora de 50% na severidade dos sintomas depressivos), e grande tempo de latência para início de seus efeitos (pelo menos 8 semanas conforme alguns estudos). Ademais, é importante ressaltar que parcela considerável de pacientes permanece refratária a diversas estratégias terapêuticas com diferentes drogas, em alguns estudos esses pacientes compõem até 33% da amostragem de pacientes com MDD.

Embora grandes avanços tenham sido feitos em relação ao entendimento de potenciais mecanismos neurobiológicos envolvidos na doença, seu completo entendimento está longe de ser alcançado. Entretanto, nas últimas décadas, evidências robustas apontam para o envolvimento da inflamação no SNC e da resposta anormal das células imunes residentes do cérebro, as micróglia, na gênese e progressão desse transtorno. De fato, essas células frente a diferentes eventos neuroimunes ambientais, como estresse, infecções ou trauma, assumem estados reativos pró-inflamatórios que cursa com a secreção abundante de mediadores pró-inflamatórios (citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e EROS), que podem induzir consequências neurodegenerativas. Em especial, na depressão, essa resposta microglial parece ser anormalmente exacerbada e crônica e não sucedida de uma resposta adaptativa anti-inflamatória e reparativa.

Nesse contexto, é bem demonstrado que diferentes antidepressivos clássicos são capazes de modular as respostas microgliais, usualmente atenuando as respostas pró-inflamatórias e promovendo um fenótipo neuroprotetor e anti-inflamatório. Ademais, drogas com efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios tem mostrado efeito tipo-antidepressivo em diversos modelos animais de depressão, e algumas têm comprovado eficácia em alguns subgrupos de pacientes com MDD. Nesse ínterim, a autofagia tem sido elencada como um mecanismo basal e adaptativo de controle das respostas inflamatórias, sobretudo em

macrófagos e micróglia. Interessantemente, drogas antidepressivas clássicas compartilham a habilidade comum de induzir aumento do fluxo autofágico em diferentes células do SNC. Porém, o entendimento dos mecanismos de autofagia na micróglia e sua modulação para atingir finalidades terapêuticas para depressão ainda permanece muito pouco explorado.

Ademais, nos últimos anos, há um crescimento exponencial de evidências apontando o uso terapêutico do CBD para diferentes transtornos neurodegenerativos e neuropsiquiátricos. A farmacologia do CBD é complexa, envolvendo muitos alvos e vias de sinalização intracelular, e está longe ser completamente entendida. Entretanto, evidências consistentes apontam que o CBD não só apresenta promissor efeito tipo-antidepressivo em diferentes modelos animais, e eficácia para redução de sintomas depressivos e ansiosos em alguns ensaios clínicos menos controlados, como também habilidade de atenuar a resposta inflamatória microglial e induzir um fenótipo anti-inflamatório nessas células. Também, recentemente, foi demonstrado que o CBD é capaz de induzir aumento do fluxo autofágico em células neuronais e astrócitos em cultura, porém esse efeito não foi investigado em micróglia.

Portanto, considerando: i) o grande potencial do CBD como ferramenta farmacológica para o tratamento da depressão; ii) seus efeitos neuroimunes e de modulação microglial já demonstrados, e iii) sua capacidade de induzir autofagia em outras células do SNC, esse estudo visa investigar a participação de mecanismos autofágicos na micróglia para mediação dos efeitos imunomoduladores e antidepressivos do CBD. Esse trabalho é inédito e almeja responder a importantes lacunas na literatura, o que contribui significativamente para o avanço do conhecimento básico sobre os mecanismos de ação do CBD em células micróglia. Também, esse estudo é dotado de relevância social uma vez que o melhor entendimento dos mecanismos associados a um potencial novo agente promissor para o tratamento da depressão pode não só fornecer novas e mais eficazes alternativas terapêuticas, considerando as limitações dos agentes antidepressivos atuais, mas também contribuir para diminuir a morbidade e dano social da depressão.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Investigar a participação de mecanismos relacionados à autofagia nos efeitos imunomodulador do CBD em linhagem de micróglia humana HMC3 desafiada com LPS e em camundongos adultos submetidos ao modelo de comportamento tipo-depressão induzido por LPS.

3.2. Objetivos Específicos:

- Determinar o efeito do CBD em ensaios de citotoxicidade em micróglia humanas HMC3 desafiadas com LPS.
- Determinar o efeito do CBD em marcadores dos estágios precoces e tardios do fluxo autofágico em micróglia humanas HMC3 desafiadas com LPS.
- Determinar o efeito do CBD na expressão de genes relacionados à autofagia (ATGs) em micróglia humanas HMC3 desafiadas com LPS.
- Caracterizar o efeito do CBD no perfil de expressão de marcadores de superfície de polarização pró- ou anti-inflamatória em micróglia humanas HMC3 desafiadas com LPS
- Caracterizar o efeito do CBD na expressão de marcadores pró- e anti-inflamatórios secretados em micróglia humanas HMC3 desafiadas com LPS, e o efeito do co-tratamento com o inibidor inespecífico de autofagia HCQ.
- Caracterizar o efeito do CBD na produção de espécies reativas de oxigênio intracelulares em micróglia humanas HMC3 desafiadas com LPS, e o efeito do co-tratamento com o inibidor inespecífico de autofagia HCQ.
- Investigar o efeito do CBD na atividade fagocítica de micróglia humanas HMC3 desafiadas com LPS, e o efeito do co-tratamento com o inibidor inespecífico de autofagia HCQ.
- Investigar o efeito do CBD na motilidade/migração celular de micróglia humanas HMC3 desafiadas com LPS, e o efeito do co-tratamento com o inibidor inespecífico de autofagia HCQ.

- Investigar o efeito do CBD na reversão do comportamento tipo-depressivo induzido por LPS, e influência da combinação com o inibidor de autofagia HCQ.
- Determinar o nível de expressão das isoformas LC3B-I e LC3B-II, como marcador do fluxo autofágico, e de citocinas pró-inflamatórias no cérebro de camundongos tratados com CBD no modelo de depressão induzido por LPS.

4. MATÉRIAS E MÉTODOS

4.1. Drogas

Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, cepa 055:B5 (SigmaAldrich Corp., St Louis, USA) foi utilizado. Cannabidiol (CBD) com alto grau de pureza (>98%) (THCPharm, Frankfurt, Germany) foi utilizado. Os estoques de CBD foram preparados para concentração-mãe de 5 mM em 5% Tween 80 em água destilada. As concentrações finais de CBD em Tween 80 foi rediluídas em meio de cultura para concentrações iguais ou menores que 0.01% de Tween 80. Sulfato de Hidroxicloroquina (HCQ) com alto grau de pureza (>98%) (Sigma-Aldrich, Ref#H0915) foi utilizada. Os estoques de HCQ foram preparados para a concentração-mãe de 5 mM em meio de cultura e diluídos para concentração final no dia de uso. Ambos CBD e HCQ foram preparados e armazenados protegidos da luz e à temperatura de -20°C. Todos os demais reagentes utilizados nesse trabalho foram de grau analítico e preparados no dia de uso.

4.2. Linhagem celular e Cultivo de Células

A linhagem microglial humana HMC3 (ATCC-CRL-3304™) foi gentilmente doada pelos professores Dr. Thiago Mattar Cunha (FMRP-USP) e Dr. Daniel Martins-de-Souza (UNICAMP). Essa linhagem foi transformada a partir de imortalização com vetor viral SV40 em cultura primária fetal de micróglia humanas e retêm propriedades e reatividade semelhante a micróglia primárias em estado quiescente (não-estimulado). Essas células foram recebidas em passagem (P)5, repicadas para construção do banco local de células e utilizadas em experimento no máximo até a P21.

As células foram manuseadas em câmaras de fluxo laminar vertical (ESCO, modelo Airstream classe II-B2; VECO, modelo Biosafe 12 classe II) e mantidas em incubadoras de CO₂ a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Elas foram cultivadas em garrafas de plástico para cultura T75 (75 cm², volume de 250 mL, KASVI, alta-adesão) crescendo em meio completo composto de: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco, Ref#10564011), com alta concentração de glucose 25 mM e 1% de glutamina (GlutaMAX™, Gibco), suplementado com 10 % de soro bovino fetal (FBS, Gibco, Ref#26140079) e 1% de antibiótico (estreptomicina e penicilina 10,000 U/mL, Gibco, Ref#15140122).

O crescimento das culturas foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido (modelo) e o repique para meio de cultura novo foi feito usualmente a cada 48 horas quando as células atingiram confluência próxima a 70-80% em garrafas T75. Para o desprendimento das células aderidas utilizou-se uma solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10X em tampão fosfato salino (PBS) (*phosphate buffered saline*). Para as diferentes condições experimentais, as células foram semeadas com as respectivas concentrações: $2,5 \times 10^4$ células/poço para placas de 96 poços; 1×10^5 células/poço para placas de 24 poços, e 2×10^5 células/poço para placas de 12 poços. Após um período de 24 horas do plaqueamento, o meio das células foi trocado por meio sem suplementação de FBS e foram feitos os experimentos.

4.3. Protocolo experimental *in vitro*

Para esse estudo foram realizados dois protocolos de tratamento das células em cultivo: pré- e pós-tratamento. Para ambas as condições, em todos os experimentos, as células tiveram sua viabilidade (>90%) e confluência (70-80%) conferidas. Primeiramente, para o protocolo de pré-tratamento, as células foram tratadas com CBD (10 μ M, em meio DMEM com 0.01% de Tween 80) com ou sem adição simultânea do inibidor inespecífico da acidificação lisossomal HCQ (10 μ M, em meio DMEM). Após 24 horas, as células tiveram metade do meio removido e acrescentado LPS (concentração final de 100 ng/mL em meio DMEM). Após mais 24 horas, o meio sobrenadante ou amostras de células foram colhidas para os diferentes ensaios envolvidos nesse estudo. Para o protocolo de pós-tratamento, as células foram primeiro estimuladas com LPS (concentração final de 100 ng/mL em meio DMEM), e após, 24 horas, tratadas com CBD (10 μ M, em meio DMEM com 0.01% de Tween 80) com ou sem adição simultânea do inibidor inespecífico da acidificação lisossomal HCQ (10 μ M, em meio DMEM). Após mais 24 horas, o meio sobrenadante ou amostras de células foram colhidas para os diferentes ensaios envolvidos nesse estudo. Em ambas as condições, foram incluídos grupos controle negativo (CTL) de células apenas tratadas com veículo em que foi diluído o CBD (meio DMEM com 0.01% de Tween 80), e grupo STV (do inglês *starvation*), como controle positivo para indução de autofagia, por meio da adição de solução balanceada de Hank (*Hank's balanced salt solution*, HBSS, sem fenol) por 2 horas.

Excepcionalmente, para os ensaios de viabilidade celular/citotoxicidade, os protocolos acima foram aplicados, porém diferentes concentrações de CBD em curva crescente (1,10, 50 e 100 μ M) foram testadas a fim selecionar a concentração mais segura para continuação nos ensaios subsequentes. Também, para o ensaio de western blott, considerando os resultados mais promissores obtidos no protocolo de pós-tratamento para os outros ensaios relacionados à indução de autofagia com CBD, apenas esse protocolo foi incluído nesse experimento. Baseado em estudos anteriores nos quais o fluxo autofágico foi semelhantemente determinado pela expressão das isoformas LC3BI e II e do receptor de autofagia p62/SQSTM1, os grupos experimentais foram expostos às duas condições: com e sem o inibidor de acidificação intracelular, cloreto de amônio (NH_4Cl) por 2 horas (KLIONSKY et al., 2021). Nesse experimento, não foi realizado o co-tratamento com HCQ como inibidor da acidificação de lisossomas, uma vez que NH_4Cl foi utilizado para esse fim. As concentrações, diluição e tempo de exposição de CBD (DOS-SANTOS-PEREIRA et al., 2020), HCQ (HSU et al., 2020) e NH_4Cl (VRECHI et al., 2021) foram baseados em estudos prévios *in vitro* com finalidades relacionadas à autofagia.

4.4. Ensaios de Citotoxicidade

4.4.1. Ensaio de MTT

Nesse ensaio, a avaliação de citotoxicidade foi feita através do teste do MTT. Este consiste em uma análise colorimétrica que quantifica o número de células viáveis, onde o anel tetrazólio do sal de coloração amarela, brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), é clivado pelas desidrogenases mitocondriais e citoplasmáticas presentes em células metabolicamente ativas, transformando-se em um composto de coloração púrpura chamado de nome E, Z-1-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-1,3-difenilformazan (Formazan), tendo este o formato de cristais insolúveis em água. A ausência da redução do MTT reflete o estudo funcional da cadeia celular respiratória, sendo sua diminuição indicativo da alteração da atividade metabólica, ou seja, redução da viabilidade celular (MOSMANN, 1983). As células foram cultivadas a uma densidade de 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços, após os tratamentos descritos acima, metade do meio foi retirado (100 μ L) e foi adicionada 10 μ L de solução de MTT na

concentração de 5 mg/mL em cada um dos poços, e incubadas por 90 minutos a 37°C e 5% CO₂. Decorrido este tempo, o sobrenadante foi descartado e para lise das células e solubilização do sal de formazan foi adicionado 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) puro por 30 minutos. Utilizando-se de agitador de placas orbital, a placa foi agitada por mais 15 minutos e a absorbância medida em leitor de microplaca a 570 nm. O resultado foi expresso em % de viabilidade em relação ao grupo controle.

4.4.2. Ensaio de LDH

A enzima lactato desidrogenase (LDH) catalisa a conversão do piruvato a lactato na presença de NADH. O decréscimo da absorbância em 340 nm devido a oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH para NAD⁺) é proporcional à atividade da LDH na amostra. Para esse ensaio foi usado kit de detecção da atividade da LDH colorimétrico (LDH Liquiform, Labtest, Ref#86). Brevemente, amostras de sobrenadante dos cultivos foram colhidas (20 µL). Foi imediatamente preparado o reagente de trabalho, conforme orientações do fabricante, utilizando a proporção de 4 volumes do Reagente 1 e 1 volume do Reagente 2. Adicionar 200 µL do reagente de trabalho ao volume das amostras (20 µL), homogeneizar e transferir o conteúdo total de cada reação para cada poço de uma placa de 96 poços. Após 1 min, prosseguir com a leitura a 340 nm em leitor de placa (instante A₀). Após 2 minutos, repetir a leitura no mesmo comprimento de onda (instante A₁). O cálculo da atividade da LDH é feito pela seguinte equação:

Atividade da Desidrogenase Láctica (U/L) = $(A_0 - A_1)/2 \times$ Fator de absorvidade do NADH

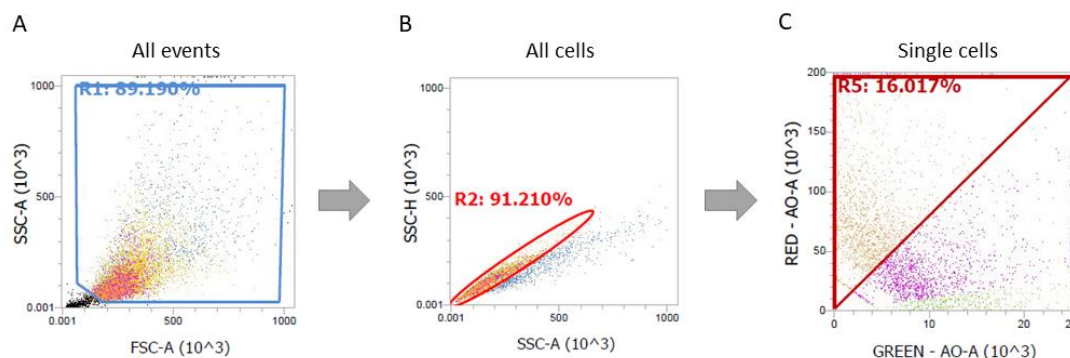
Conforme orientações do fabricante para condições padrões do kit, esse fator é igual a 8095. Os resultados do ensaio foram expressos em (U de LDH/mL de meio).

4.5. Ensaio de Determinação de Vesículas Ácidas (AVOS) por Citometria de Fluxo

Laranja de acridina (*acridine orange*, AO) é um corante lisotrópico que em sua forma sem carga é capaz de atravessar livremente os compartimentos celulares e acumular-se em vesículas ácidas de forma dependente do pH. Em pH próximo a 7,0, esse corante emite

fluorescência com espectro de aproximadamente 519 nm, fluorescendo na cor verde. Em locais com $\text{pH} < 5.0$, como em organelas de vesículas ácidas (AVOs, do inglês *acidic vacuolar organelles*), a AO encontra-se em sua forma protonada, cuja permeabilidade pelas membranas é mínima, ficando retida e atingindo concentração pelo menos 250 vezes maior que em compartimentos de pH neutro. Nessas condições, a AO forma dímeros e emite fluorescência no espectro de aproximadamente 680 nm, fluorescendo na cor avermelhada. Com a análise combinada da relação entre as fluorescências emitidas em verde e vermelho (red/green ou R/G), é possível medir a detecção de vesículas ácidas, como autofagolisossomos e lisossomos maduros, que aumentam na ocorrência de autofagia (THOME et al., 2016). Para esse ensaio, as células foram tratadas com CBD (10 μM) nos protocolos de pré- e pós-tratamento com LPS, sozinho ou em combinação com o inibidor da acidificação lisossomal HCQ (10 μM). Como controle positivo indutor de autofagia, as células foram expostas à solução balanceada de Hank (HBSS, *Hank's balanced salt solution*) por 2 horas. Após o tratamento das células, o meio foi completamente retirado e elas foram incubadas com solução de tripsina-EDTA 0,5% diluída 10X em tampão PBS a 37°C por 10 minutos. Após isso, a solução de tripsina foi inativada com FBS, e o volume total de cada poço colhido para centrifugação (500 rpm, 08 min, 4°C). O pellet obtido foi ressuscitado em 300 μL de uma solução de AO a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluído em PBS. Após 15 minutos de incubação no escuro, a 37°C, as amostras foram lavadas com PBS para retirar o excesso de AO, ressuscitadas em solução de FACS (1% de albumina bovina sérica em PBS) e analisadas em citômetro de fluxo (Attune NxT Flow Cytometer, ThermoFisher). A intensidade de emissão de fluorescência em escala linear dos espectros verde e vermelho foi obtida conforme estratégia de *gates* descrita no Quadro 2. Os dados obtidos foram analisados no software prioritário do citômetro Attune NxT Flow Cytometer e transferidos para análise estatística no software GraphPad Prism.

Quadro 2. Estratégia de *gates* para determinação de Vesículas Ácidas (AVOS) por citometria de fluxo



Inicialmente, foi definido o *gate all cells* (A), a partir desse *gate* foi definido o *gate single cells* (B). Desse último foi criado um *gate* para verificar as células que apresentavam o aumento de AVOs a partir da relação da fluorescência vermelha pela fluorescência verde emitidas pela Acridina laranja. As células que apresentam alteração de fluorescência e ficaram dentro do espaço do *gate* de AVOs (triângulo superior, C) foram consideradas como formadoras de vesículas autofágicas. Os valores das quantidades de células que estavam dentro do *gate* de AVOs foram analisados no Prism para a comparação de diferenças entre os grupos. Ref: (THOMÉ et al., 2016).

4.6. Expressão proteica das isoformas LC3BI e LC3BII e p62/SQSTM1 por Western Blott

Após os tratamentos, o meio sobrenadante dos cultivos foi completamente retirado e foram acrescentados em cada poço 300 μ l de tampão RIPA gelado (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) com inibidor de protease (SigmaAldrich, EUA, 1 μ L de inibidor de protease: 100 μ L de RIPA). As células foram, então, incubadas por 15 minutos à -20°C (temperatura de freezer). Depois disso, com auxílio de um raspador estéril de plástico (*Cell Scraper*, KASVI), as células foram raspadas do fundo dos poços e colhidas em microtubos de 2 ml. Os lisados foram então centrifugados 12.000 rpm por 20 min a 4 °C, e os sobrenadantes (lisado com as proteínas em suspensão) coletados em novos tubos para as etapas subsequentes. A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada pelo método de Bradford, usando reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate - BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Brevemente, após ligação à proteína a absorvância da solução ácida *Coomassie Brilliant Blue G-250*, presente no reagente de Bradford, muda de 465 para 595 nm. Foram pipetados 10 μ L de

amostra e 200 μ L de solução de Bradford diluída em tampão PBS (1:4 volumes) em placas de 96 poços. A leitura foi feita por espectrofotômetro (595 nm), utilizando-se uma curva de calibração de albumina bovina sérica (BSA) de 0,1 a 2,0 mg / mL.

Para o ensaio de western blot, 150 μ g de proteína de cada amostra foi adicionada a tampão de carregamento (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) com β -mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 segundos, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 10% a 60 V nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 V para o restante da corrida. Após a corrida, efetuou-se a transferência das proteínas do gel para uma membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) por meio de eletrotransferência semi-seco com o aparelho (Power Blotter–Semi-dry Transfer System, ThermoFisher) por 50 minutos com limite máximo de corrente em 1.0 A, usando tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante com solução de BSA 5% (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween20). Em seguida, as diferentes membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos primários: anti-LC3B IgG policlonal produzido em coelho (1:1000, ThermoFisher, USA), anti-p62/SQSTM1 IgG policlonal produzido em coelho (1:2000, Abcam, USA, ab91526) e anti- β -actina IgG monoclonal produzido em camundongo (1:4000; Sigma, USA), ambos diluídos em 1% de BSA em TBS-T. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBS-T. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit IgG (1:2000; Invitrogen, USA) ou HRP-goat anti-mouse IgG (1:3000; Sigma, USA) por uma hora em temperatura ambiente sob agitação constante. As membranas foram lavadas 3 vezes, duração de 10 min cada, com TBS-T. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, Clarity western ECL blotting substrate) e as membranas foram agitadas por 5 min, protegidas da luz. As imagens das membranas foram obtidas em modo de detecção automático pelo sistema de fotodocumentação iBright CL750 Imaging System (ThermoFisher, EUA). As bandas referentes às isoformas LC3B I e II foram diferenciadas baseadas em seu peso molecular, respectivamente 12-13kDa e 15 kDa. As bandas referentes à p62/SQSTM1 foram identificadas pelo seu peso

molecular de aproximadamente 55-62 kDa. A densidade das bandas foi mensurada por meio do software ImageJ (NIH, Bethesda, EUA) e normalizada pela expressão relativa de β -actina.

4.7. Real-time PCR para Genes relacionados à Autofagia

Após os tratamentos, o meio sobrenadante dos cultivos em placas de 12 poços (pelo menos 3 poços por condição experimental) foi completamente retirado, as células foram lavadas uma vez com 300 μ L de tampão PBS em cada poço, e posteriormente acrescentado mais 300 μ L de tampão PBS por poço. Depois disso, com auxílio de um raspador estéril de plástico (*Cell Scraper*, KASVI), as células foram raspadas do fundo dos poços e colhidas em microtubos de 2 mL. As células foram centrifugadas (500 rpm, 08 min, 4°C) e o pellet obtido ressuspendido em 500 μ L de Trizol gelado (TRIZOL™ Reagent, ThermoFisher, Ref# 15596026). As células foram homogeneizadas por movimentos de *up-down* usando pipeta automática de 1000 μ L e incubadas por 15 minutos no gelo. Após isso, foram adicionados 100 μ L de clorofórmio (P.A., alta pureza), e as amostras agitadas vigorosamente em vórtex por 1 minuto, seguido de incubação em gelo por 3 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C. A fase aquosa (incolor) foi transferida para novos microtubos (livres de RNase e endotoxinas), com cuidado para não tocar na interface com a fase orgânica. Foram, então, adicionados 250 μ L de álcool isopropílico (P.A., alta pureza) a cada microtubo. Agitar no vórtex por 1 minuto. Incubar no gelo por 10 minutos e centrifugar a 12.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Foi desprezado o sobrenadante, com muito cuidado, para não desfazer o *pellet* formado no fundo do tubo do tubo. Adicionar 500 μ L de álcool etílico 75%. Agitar no vórtex por 1 minuto, e centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos, 4°C. Repetir mais uma vez essa etapa. Foi removido o sobrenadante e deixado o pellet secar, a temperatura ambiente, em fluxo laminar estéril, por cerca de 10 minutos. Após isso, o *pellet* final foi dissolvido em 40 μ L de água tratada com DEPC autoclavada (UltraPure™ DEPC-Treated, Invitrogen, Ref# 750023).

Após a extração do RNA de cada amostra, efetuou-se a sua quantificação, com 1 μ L de RNA de cada amostra utilizando Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, EUA). Concomitante a dosagem em ng/ μ L, realizou-se a avaliação da qualidade do RNA

extraído, a qual foi obtida por meio da relação 260/280. Foram utilizadas para as etapas subsequentes apenas as amostras com relação 260/280 entre 1.8 e 2.0, uma vez que a avaliação da quantidade de RNA presente em cada amostra e sua pureza são de extrema importância para o sucesso da próxima etapa, a saber: síntese do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). O cDNA foi sintetizado usando com o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems, USA, Ref#4368814). O volume final de cada amostra foi de 20µL: 2 µL do reagente 10x tampão da enzima; 0,8 µL de oligonucleotídeos; 2 µL de primer provido no kit; 1 µL da enzima transcriptase reversa; 500 ng de RNA, onde o volume utilizado em µL foi dependente da concentração inicial extraída; H2O livre de RNase e DNase para completar 20 µL. O protocolo da reação foi realizado à 25° C por 10 min, 37° C por 120 min, 85° C por 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20° C até a sua utilização no qPCR. A expressão gênica foi avaliada por meio do sistema de PCR em tempo real (Light cycler 96, Roche), utilizando kit de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies, Ref# A46012). O gene de referência utilizado foi a β-actina. Todos os primers utilizados estão apresentadas no quadro 3. A sequência dos oligonucleotídeos usados como primers foram desenhadas usando o servidor *web* aberto PrimerBLAST (NIH, USA). Os ensaios foram selecionados baseados em amplificação de todas as isoformas/variantes dos genes alvos. Os valores de *Threshold cycle* (Cq ou Ct) dos genes avaliados foram obtidos pelo software do equipamento (Light cycler 96, Roche), e os níveis relativos de RNAm foram calculados de acordo com a metodologia descrita por (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Quadro 3. Sequência dos alvos gênicos e primers utilizados para a técnica de qPCR.

| <i>Gene</i> | <i>Primer Forward</i> | <i>Primer Reverse</i> |
|-------------|-------------------------|-----------------------|
| ATG5 | AAGCAAACCTCTGGATGGGATTG | TCCTAGTGTGTGCAACTGTCC |
| ATG12 | GGAGGGGAAGGACTTACGGA | TTCGCTCTACTGCCCACTTC |
| BECLIN1 | TCCCGAGGTGAAGAGCATCG | GCCTGGGCTGTGGTAAGTAA |
| P62 | GAGATTCGCCGCTTCAGCTT | GGAAAAGGCAACCAAGTCCC |
| B-ACTIN | AGAGCTACGAGCTGCCTGAC | CACCTTCACCGTTCAGTTT |

Fonte: Primers elaborados pelo autor utilizando o servidor online PrimerBlast (em 18/06/2019)

4.8. Ensaio de Griess para determinação dos níveis de Nitrito

Para determinação da produção de óxido nítrico as células foram cultivadas a uma densidade de 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços; A determinação do óxido nítrico se dá de forma indireta, através da mensuração do nitrito, que é um dos produtos primários do NO, onde esse ao reagir com a sulfanilamida e o N-1-naftiletilenodiamina (NEED) origina, em condições ácidas, o diazonium, composto este de coloração rósea. Após as 2 horas de adição das substâncias, foram coletados 100 μ L do sobrenadante de cada um dos poços e transferidos para outra placa e a cada poço desta foi adicionado 100 μ L do reagente de Griess (proporção 1:1 de sulfanilamida 1% diluída em H₃PO₄ 5% e, NEED 0,1% diluído em água destilada). Para o branco, foi adicionado 100 μ L do reagente e 100 μ L de meio de cultura celular. A absorbância foi medida utilizando um leitor de placa a 540 nm. A curva padrão utilizada para a determinação da concentração de nitrito nas amostras foi feita utilizando-se nitrito de sódio (100 μ M - 5 μ M) (GREEN et al., 1981).

4.9. Ensaio de determinação da Atividade da enzima Arginase

Para o ensaio da atividade da arginase, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 1.10^6 células /poço. Após isso, as células foram submetidas ao protocolo de tratamento descrito acima. Ao final desse protocolo, as placas foram centrifugadas por 5 minutos a 300 g. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e precipitado foi resuspendido em 250 μ L de tampão de lise (0,2% Triton X-100) em agitação suave. Posteriormente foram retirados 100 μ L para a dosagem de proteínas e 150 μ L restantes para o ensaio de arginase. Ao final, foi utilizado 50 μ g de proteína/poço para a dosagem da atividade da enzima arginase conforme descrito anteriormente (CORRALIZA et al., 1994). O resultado foi expresso em μ g de uréia/ μ g de proteína.

4.10. Determinação de Mediadores Pró- e Anti-inflamatórios e BDNF por ELISA

Para esses ensaios, as células foram plaqueadas em poços de 96 poços na densidade de 3.10^5 /poço. Após isso, as células foram submetidas ao protocolo de tratamento descrito acima. Ao final desse protocolo, as placas foram centrifugadas 5 minutos a 300 g e foi retirado 100 μ l do sobrenadante de cada poço. A dosagem das citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimáticos para TNF α , IL-1 β , IFN γ , IL-4, TGF- β (Kits ELISA TMB Human Preprotech, USA) e BDNF (R&D, DuoSet BDNF Human-Mouse Kit), conforme descrito anteriormente. O resultado foi expresso em pg/ml de meio sobrenadante.

4.10. Imunofluorescência para iNOS/Arg1/DAPI

As células foram semeadas (2×10^4 células/poço) em placas de 12 poços contendo lamínulas estéreis de vidro. Após os respectivos tratamentos, o meio foi completamente retirado, as células lavadas com 300 μ L de tampão PBS por poço, e fixadas com solução de paraformaldeído a 4% (pH 7.4) em PBS por 15 minutos à temperatura ambiente. Após isso, as células foram lavadas com 300 μ L tampão PBS, três vezes, sucessivamente. As células foram então submetidas ao protocolo de recuperação antigênica usando tampão citrato (Tampão Citrato de Sódio 10mM, 0.05% Tween 20, pH 6.0) aquecido a 90° C por 10 minutos. Após isso, as células foram deixadas esfriar à temperatura ambiente por 20 minutos, e posteriormente lavadas três vezes com tampão PBS. A seguir, foi adicionado 300 μ L de tampão de permeabilização (0.1% de Triton X-100, 1 % de ABS em PBS) por 15 minutos, e as células foram novamente lavadas uma vez com tampão PBS. Após isso, foi acrescentado 500 μ L de tampão de bloqueio (3% ABS, 50mM de glicina, em PBS) por poço por 50 minutos à temperatura ambiente. Então, as células foram incubadas *overnight* a 4 ° C com os anticorpos primários: anti-iNOS IgG monoclonal produzido em camundongo (1:150, SantaCruz Biotechnology, Ref# Sc-7271) e anti-Arg1 IgG policlonal produzido em coelho (1:400, ThermoFisher, Ref# PA5-29645). Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpos secundários: Alexa Fluor 594 anti-IgG de camundongo (1: 400, Invitrogen) e Alexa Fluor 488 anti-IgG de coelho (1: 400, Invitrogen). Por fim, foi adicionado 1 μ g/mL de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para marcação nuclear por 10 minutos. As lamínulas foram, então retiradas dos poços, lavadas em PBS, e montadas em lâminas de vidro para microscopia usando o meio de montagem anti-desbotamento (Prolong Gold Antifade

Mountant, ThermoFisher Scientific, Ref# P36930). As lâminas foram fotografadas usando um leitor de slides Cytation 3 (Carl Zeiss, White Plains, NY, EUA) nas objetivas de 10 e 20x, com exposição, ganho e deslocamento constantes. De cada poço, foram fotografados pelo menos 4 campos randômicos e para cada grupo foram analisados pelo menos 4 poços em cada experimento. A análise da intensidade de fluorescência foi semiquantitativa, usando o pacote de software aberto Fiji/ImageJ (NIH, Bethesda, EUA), usando as variáveis intensidade média de fluorescência e área marcada (%). A análise de colocalização foi realizada usando o plugin Coloc2 (ImageJ, NIH, EUA), e obtido coeficiente de colocalização por meio do coeficiente de Pearson ajustado de cada sobreposição.

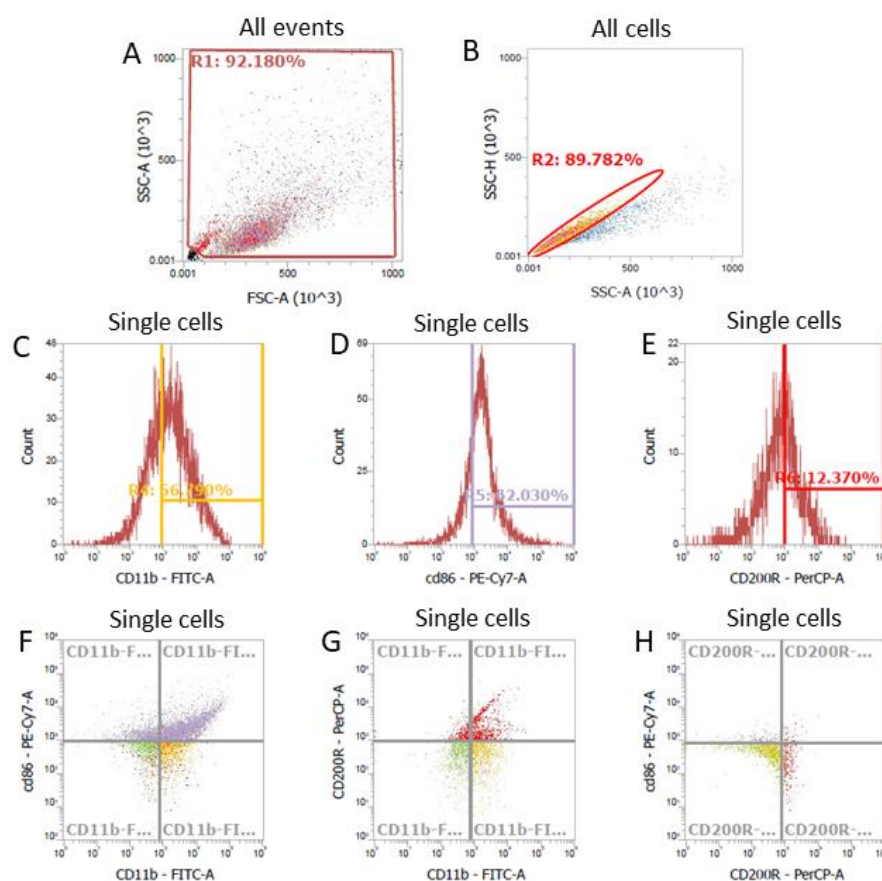
4.11. Ensaio de Imunofenotipagem para marcadores de superfície por Citometria de Fluxo

Alguns marcadores externalizados na superfície de células fagocíticas, como micróglia, ajudam a entender o perfil de polarização pró- ou anti-inflamatório dessas células. Nesse contexto, a clássica distinção entre perfil classicamente ativado “M1” e alternativamente ativado “M2”, apesar de didática, é supra-simplificada e não consegue capturar a diversidade de estados que essas células podem assumir, e, portanto, serão evitados. Apesar disso, alguns marcadores de superfície estão supra-regulados em condições pró-inflamatórias, como CD86 and iNOS, enquanto outros como CD200R e Arg1, estão usualmente supra-regulados em condições anti-inflamatórias. Nesse estudo, nós identificamos na superfície das células microgliciais o marcador constitutivo CD11b, além dos marcadores de polarização pró- e anti-inflamatória, CD86 e CD206, respectivamente (Park et al., 2016).(ZHOU et al., 2017).

Para esse ensaio, as células foram semeadas em placas de 12 poços na concentração de 2×10^5 células/poço, e, após os tratamentos, foram fixadas em paraformaldeído 0,25% por 5 minutos, e lavadas com PBS. Após isso, foram centrifugadas (500 rpm, 08 min, 4°C), e o pellet de cada poço ressuspendido em 300µL tampão de FACS. Após isso, as células foram incubadas com o mix de anticorpos com fluoróforos conjugados (3 µL de cada anticorpo por microtubo) para os referentes alvos: anti-IgG monoclonal CD11b-FITC (1:100, ThermoFisher, Ref#11-0112-41), anti-IgG monoclonal CD86-PE-Cy7 (1:100,

ThermoFisher, Ref#25-0862-82), e anti-IgG monoclonal CD200R-PerCP-eFluor™ 710 (1:100, ThermoFisher, Ref## 46-5201-82), por 45 minutos, no escuro e em gelo. Posteriormente, essas células foram novamente lavadas com tampão de FACS, então, foram centrifugadas (500 rpm, 08 min, 4°C) e ressuspendidas em tampão FACS (300 µL) para aquisição por citometria de fluxo. As células foram então analisadas em citômetro de fluxo (Attune NxT Flow Cytometer, ThermoFisher), conforme estratégia de *gates* descrita no Quadro 4. Os dados obtidos foram analisados no software prioritário do citômetro Attune NxT Flow Cytometer e transferidos para análise estatística no software GraphPad Prism.

Quadro 4. Estratégia de *gates* para a imunofenotipagem por marcadores de superfície (CD11b, CD86 e CD200R) por citometria de fluxo.



Inicialmente, foi definido o gate *all cells* (A), a partir desse *gate* foi definido o *gate single cells* (B). A partir do gate de *single cells*, foram montados histogramas para a distribuição da intensidade média de fluorescência (ou MFI) das células para CD11b (C), CD86 (D) e CD200R (E). Em cada um desses gráficos, foi definido um gate em colchete para a população de células + (MFI > 1×10^3). A partir do *gate* de *single cells*, foram também

montados gráficos de *dot plot* para as diferentes marcações, respectivamente, CD86(eixo y)/CD11b(eixo x) (F), CD200R(eixo y)/CD11b(eixo x) (G), e CD86 (eixo y)/CD200R(eixo x) (H). Nesses últimos, foram definidos *gates* em quadrantes para identificação das populações duplamente com alta e baixa expressão dos referidos marcadores de superfície. Os valores das quantidades de células que estavam dentro do *gates* selecionados foram analisados no Prism para a comparação de diferenças entre os grupos. Ref: (ZHOU et al., 2017).

4.12. Ensaios de Formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) Intracelulares

4.12.1. Ensaio de NBT

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) intracelular pode ser medida por meio da reação da solução de nitroblue tetrazolium (NBT) com os ânions superóxido gerados pelo sistema xantina oxidase. Nesse contexto, essa reação geram um produto roxo que se precipita no fundo da placa (cristais de formazan) que possuem absorvância ótima no espectro de 630 nm. Brevemente, as células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^4 , e após os tratamentos, tiveram o meio completamente removido. Foi adicionado em cada poço 100 μ L de solução de NBT (1 mg/mL de NBT em PBS), após o qual, as células foram incubadas a 37°C por 90 minutos. Após isso, foram acrescentados 50 μ L de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) (P.A., Sigma-Aldrich) por poço, e as placas foram colocadas em agitação suave por 30 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. Ao final, a absorvância foi medida em leitor de placas a 630nm. Como controle positivo interno pró-oxidativo para esse ensaio, pelo menos uma coluna de células distintas (8 poços) em cada placa foi tratada com PMA (1 μ g/mL, Sigma Aldrich) por 1 hora a 37°C para induzir um estresse mitocondrial respiratório e então submetidas às demais etapas do protocolo (JAVVAJI et al., 2020; TUNC; THOMPSON; TREMELLEN, 2010)

4.12.2. Ensaio de DCFDA

A detecção de EROS intracelulares pode também ser mensurada pela reação da probe fluorescente 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina diacetato (H2DCFDA), a qual por suas propriedades ácidas fica retida dentro dos compartimentos intracelulares (NG; OOI,

2021). Então, por reação de desacetilação induzida por esterases intracelulares, H2DCFDA é oxidada gerando o derivado fluorescente verde DCF. Brevemente, para esse ensaio, as células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^4 , e após os tratamentos, tiveram o meio completamente removido. Foi adicionado em cada poço 100 μ L de solução de H2DCFDA 20 μ M (Thermo Fisher Scientific, Ref#D399) pré-aquecida à 37°C. Então, as placas foram incubadas à 37°C por 30 minutos, protegidas da luz. Após isso, a fluorescência resultante foi lida em leitor de placas Cytation 3 (Carl Zeiss, White Plains, NY, EUA) com os comprimentos de onda: excitação 494 nm/emissão 522 nm. Como controle positivo interno pró-oxidativo para esse ensaio, pelo menos uma coluna de células distintas (8 poços) em cada placa foi tratada com solução de peróxido de hidrogênio (10% diluído em PBS) por 1 hora, e então submetidas às demais etapas do protocolo (NG; OOI, 2021).

4.13. Ensaio de Atividade Fagocítica com Beads-FITC conjugadas

Para esse ensaio foi usado o kit comercial Vybrant-Phagocytosis Assay Kit (ThermoFisher, Ref#V-6694). Esse kit provê um modelo para avaliar o efeito de drogas e outras condições ambientais na atividade fagocítica de células em cultura. O kit se vale da fluorescência emitidas por partículas (*beads*) internalizadas por células fagocíticas, como também da mitigação da fluorescência externa, ou seja, de partículas não-internalizadas (não-fagocitadas), pelo corante intravital azul de tripan.^{1,2} As partículas fluorescentes contidas no kit são conjugadas com fluoresceína (BioParticles®, ThermoFisher), fluorescendo no espectro verde (Absorbância/Emissão: 494/518 nm). Para esse ensaio, as células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/poço (> 90% de viabilidade), conforme recomendado pelo fabricante, e, após os tratamentos, tiveram o meio completamente colhido e repostado por 100 μ L de meio DMEM novo. Após isso, foi acrescentado 100 μ L de solução com as partículas fluorescentes (1 mg/mL, diluída em solução de HBSS), e as células retornaram para incubadora por 2 horas (37°C, 5% de CO₂). A solução de azul de tripan foi preparada nesse intervalo, diluindo-a 10x em água bidestilada estéril, e, então foi acrescentado 50 μ L em cada poço e incubado por 1 minuto à temperatura ambiente, protegido da luz. Após isso, foi retirado todo o meio sobrenadante, e as células foram lavadas uma vez com

solução de HBSS (200 μ L/poço). Imediatamente, a fluorescência das placas foi lida em leitor de placas Cytation 3 (Carl Zeiss, White Plains, NY, EUA) com os comprimentos de onda: excitação 480 nm e emissão 520 nm. Controles negativos, contendo apenas meio, sem células foram utilizados, e os resultados foram expressos como % da intensidade média de fluorescência em relação ao controle (células não-tratadas). Após a leitura, pelo menos 3 campos aleatórios de cada poço foram fotografados com a objetiva de 20x no leitor de placas Cytation 3 (Carl Zeiss, White Plains, NY, EUA) para confirmar a eficiência do ensaio.

4.14. Ensaio de *Scratch* de Motilidade Celular

O ensaio de *scratch* (arranhão) é um ensaio simples e de baixo custo que envolve a criação de um rompimento em uma camada de células aderentes e capturar imagens em tempos regulares durante a migração dessas células em direção à borda de ruptura para determinar, assim, a taxa de migração celular (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Brevemente, nesse ensaio, as células foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^5 células/poço (70-80% de confluência). Após isso, o meio foi completamente removido, e com auxílio de uma ponteira P200 estéril, foi realizado um arranhão vertical reto no fundo de cada poço. O meio foi novamente retirado, as células lavadas uma vez com tampão PBS e novo meio foi acrescentado (500 μ L/poço). Nesse estágio, foram acrescentadas as drogas testes em diferentes condições experimentais (pré- e pós-tratamento). As células voltaram para a incubadora por mais 48 horas. Após isso, elas foram lavadas uma vez com PBS, e fixadas com solução de PFA 4.0% por 10 minutos. Com auxílio de um microscópio invertido em contraste de fase pelo menos 4 campos aleatórios contendo a região do arranhão de cada poço foi fotografado nas objetivas de 10x e 20x por um observador cegado das condições de tratamento. As fotos foram avaliadas no software *ImageJ*, com auxílio da ferramenta region of interest (ROI) para definir a região e bordas do arranhão, e então, foi quantificado o número de células migrantes e o % da área do arranhão ocupado.

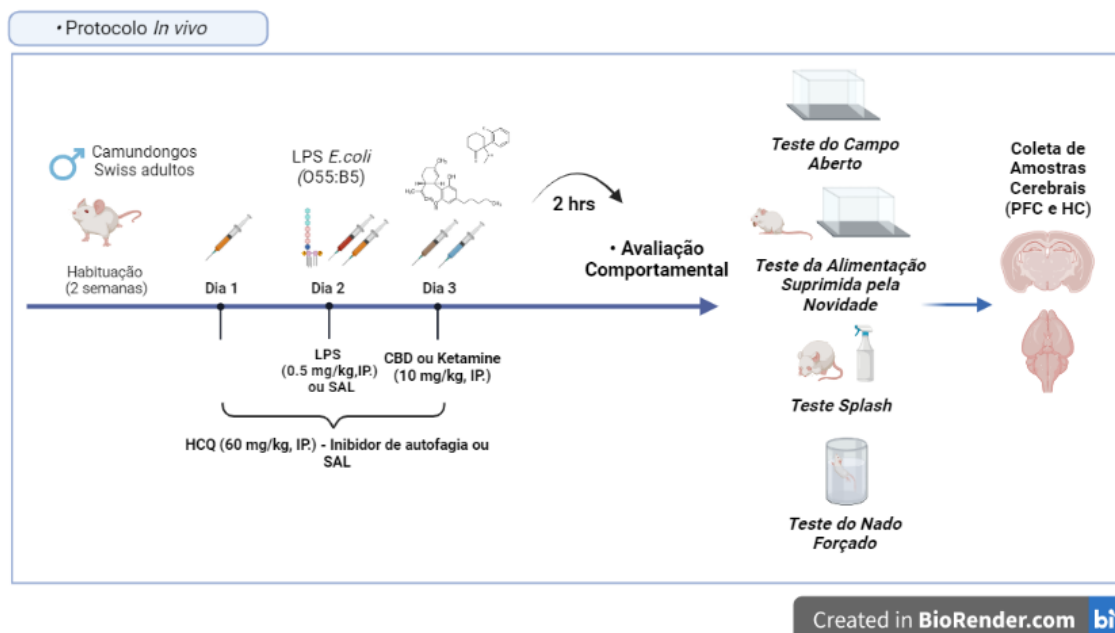
4.15. Animais

Camundongos *swiss* machos adultos (70 dias de vida, 25-30 gramas) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará foram usados. Os animais foram alocados em caixas de policarbonato de dimensões padrão (42×20.5×20 cm/4 animais/caixa) e mantidos em sala com temperatura e umidade controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$; umidade $60\% \pm 5$), ração e água ad libitum e ciclos claro/escuro de 12/12 horas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEUA-UFC) sob número 7839060721 e os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais de uso de animais em experimentação. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais envolvidos nas etapas de experimentação

4.16. Delineamento experimental - Protocolo *in vivo*

Camundongos machos foram randomicamente alocados em suas caixas-moradia (5 animais/caixa) e habituados por 7 dias antes do início do protocolo experimental. Após isso, iniciando no dia 1 de protocolo até o dia 3 de protocolo, os animais foram tratados com sulfato de HCQ (60 mg/kg, IP.) ou salina 0.9% (SAL). No dia 2 de protocolo, os animais receberam LPS (0.5 mg/kg, IP.) ou SAL, e 24 horas após foram tratados com CBD (10 mg/kg, IP.), S-cetamina (10 mg/kg, IP.) ou SAL. Duas horas após esse último tratamento, os animais foram avaliados para testes comportamentais relacionados a comportamento tipo-depressão: campo aberto, teste da alimentação suprimida pela novidade, teste do *splash* e teste do nado forçado. Imediatamente após os testes, os animais foram eutanasiados por decaptação e tiveram as áreas cerebrais dissecadas: córtex pré-frontal (PFC) e hipocampo (HC) para análises moleculares posteriores. As amostras foram armazenadas em freezer -70°C até realização dos ensaios moleculares.

Os comportamentos foram organizados em ordem de potencial estressor (menor para o maior potencial estressor). A dose de LPS, via de administração e tempo de avaliação foram baseados em trabalhos previamente publicados na literatura (MELLO et al., 2018; TOMAZ, V. de S. et al., 2020), bem como as doses usadas de S-cetamina (YANG, C. et al., 2015; ZHANG, J. C.; LI; HASHIMOTO, 2014), CBD (SALES et al., 2019) e sulfato de HCQ (RUIZ et al., 2016) (ver Quadro 5).



Quadro 5. Delineamento experimental do protocolo *in vivo*. Figura elaborada pelo autor com auxílio Biorender.com. Abreviações: CBD: Canabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; HCQ: hidroxicloroquina; HC: hipocampo; PFC: pré-frontal córtex.

4.17. Teste do Campo Aberto

Com a finalidade de analisar a atividade locomotora, os animais foram avaliados no teste do campo aberto. A arena para o teste é feita de acrílico (30 x 30 x 15 cm) com o chão dividido em nove quadrados iguais. A atividade exploratória do animal foi registrada durante 6 minutos, sendo 1 minuto de habituação e 5 minutos de teste (ARCHER, 1973). Os parâmetros avaliados foram: o número de quadrados s parâmetros avaliados foram: o número de quadrados atravessados pelo animal (número de cruzamentos), número de entradas e tempo no quadrante central (em segundos). Os experimentos foram realizados em uma sala de som atenuado, sob baixa intensidade de luz vermelha, por dois observadores treinados.

4.18. Teste da alimentação suprimida pela novidade (*Novel Suppressed Feeding Test*)

O teste da alimentação suprimida pela novidade foi realizado como descrito anteriormente (WARNER-SCHMIDT & DUMAN, 2007). Antes do teste, os animais foram privados de alimentos durante à noite (12 horas). No dia do teste, os animais foram colocados em uma arena de acrílico (30 x 30 x 15 cm) rodeado por paredes escuras, com um pequeno pellet de pasta de amendoim (Paçoquita, Brasil) no centro. O teste teve duração total de 8 min. Nesse período, os animais exploraram toda a arena. Foi registrado a latência de cada animal para alimentar-se, ou seja, o tempo que o animal levou para dar a primeira mordida no alimento, bem como a diferença de peso inicial e ao final do teste do pellet de comida (parâmetro de apetite do animal).

4.19. Teste do *Splash*

O teste de *Splash* avalia o comportamento auto-motivacional ou de auto-cuidado do animal (YALCIN; AKSU; BELZUNG, 2005). Para isso, no dia anterior ao teste, os animais foram separados em caixas individuais por um período de 12 horas a fim de diminuir o componente ansioso referente à exposição a um novo ambiente. No dia do teste, foi esguichado um jato de solução de sacarose a 10% no dorso do animal em sua gaiola. Devido à sua viscosidade, a solução de sacarose adere a pele e o animal estimula o comportamento de limpeza. Após a aplicação da solução de sacarose, foi registrado a latência, o tempo para início do comportamento de auto-limpeza (*grooming*) e a duração total desse comportamento por um período de 5 minutos (ISINGRINI et al., 2010).

4.20. Teste do Nado Forçado

Os animais foram colocados individualmente em um cilindro de acrílico (altura 35 cm; diâmetro 24 cm), contendo 13,5 cm de água mantida a 22-24 ° C. Após 2 minutos de habituação, o tempo de imobilidade (em segundos) dos animais foi avaliado durante 4 minutos, em um tempo total de 6 minutos no interior do cilindro. Considera-se como imobilidade quando o animal faz apenas os movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água. Ademais, os movimentos de nado lateral (*swimming*), nado vertical

(*climbing*) e mergulho (*diving*) foram registrados conjuntamente como comportamento de nado ativo (em segundos) (PORSOLT; LE PICHON; JAL FRE, 1977).

4.21. Determinação da expressão proteica das isoformas LC3B-I e LC3B-II por Western Blott nos homogenatos cerebrais

Após os tratamentos, as áreas cerebrais (PFC e HC) foram homogeneizadas em 200 μ L de tampão RIPA gelado (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) com inibidor de protease (SigmaAldrich, EUA, 1 μ L de inibidor de protease: 100 μ L de RIPA). Os lisados foram então centrifugados 12.000 rpm por 20 min a 4 °C, e os sobrenadantes (lisado com as proteínas em suspensão) coletados em novos tubos para as etapas subsequentes. A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada pelo método de Bradford, usando reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate - BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), como descrito anteriormente. Para o ensaio de western blot, 150 μ g de proteína de cada amostra foi adicionada a tampão de carregamento (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) com β -mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 segundos, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 10% a 60 V nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 V para o restante da corrida. Após a corrida, efetuou-se a transferência das proteínas do gel para uma membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) por meio de eletrotransferência semi-seco com o aparelho (Power Blotter–Semi-dry Transfer System, ThermoFisher) por 50 minutos com limite máximo de corrente em 1.0 A, usando tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante com solução de BSA 5% (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween20). Em seguida, as diferentes membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos primários: anti-LC3B IgG policlonal produzido em coelho (1:1000, ThermoFisher, USA), e anti- β -actina IgG monoclonal produzido em camundongo (1:4000; Sigma, USA),

ambos diluídos em 1% de BSA em TBS-T. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBS-T. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit IgG (1:2000; Invitrogen, USA) ou HRP-goat anti-mouse IgG (1:3000; Sigma, USA) por uma hora em temperatura ambiente sob agitação constante. As membranas foram lavadas 3 vezes, duração de 10 min cada, com TBS-T. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, Clarity western ECL blotting substrate) e as membranas foram agitadas por 5 min, protegidas da luz. As imagens das membranas foram obtidas em modo de detecção automático pelo sistema de fotodocumentação iBright CL750 Imaging System (ThermoFisher, EUA). As bandas referentes às isoformas LC3B I e II foram diferenciadas baseadas em seu peso molecular, respectivamente 12-14kDa e 15-16 kDa.. A densidade das bandas foi mensurada por meio do software ImageJ (NIH, Bethesda, EUA) e normalizada pela expressão relativa de β -actina.

4.22. Determinação de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α por ELISA nos homogenatos cerebrais

Para esses ensaios, as áreas cerebrais foram homogeneizadas em tampão PBS na diluição 1:9 vezes (título massa:volume). A dosagem das citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimáticos (Kits IL-1 β e TNF- α ELISA TMB Mouse Preprotech,USA) conforme descrito anteriormente. A concentração de proteína de cada amostra foi determinada pelo ensaio de Bradford como descrito acima (Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate - BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Os resultados foram expressos em pg/mg de proteína.

4.23. Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism versão 8.0 para Windows, GraphPad Software Inc., San Diego Califórnia EUA Copyright ©. A normalidade dos dados foi testada por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Quando paramétricos, os dados foram analisados pelo teste ANOVA de uma-via seguido pelo teste de *Tukey* de comparações múltiplas. Se não-paramétricos, os dados foram

analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn de comparações múltiplas. Para o ensaio de imunofenotipagem microglial por citometria de fluxo, os dados gerados foram analisados por ANOVA regular de duas-vias considerando os fatores “tratamento” e “fenótipo celular”. Após análise ANOVA, foi realizado o teste de Tukey como teste de comparações múltiplas. Os dados foram expressos como média \pm EPM. Foi considerado nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Efeito citotóxico e curva de concentrações do CBD após 24 e 48 horas

Nos ensaios de MTT e LDH, foi testado o tratamento com concentrações diferentes de CBD (1-100 μ M) por 24 e 48 hrs, correspondendo respectivamente às durações de tratamento dos protocolos de pós-tratamento e pré-tratamento, e comparados com as condições controle com apenas meio de cultivo (CTL) e veículo de diluição do CBD (VEH). No ensaio de MTT, na análise de comparações múltiplas, observamos uma redução significativa da viabilidade celular da linhagem HMC3 nos grupos tratados com CBD 50 μ M [F (5, 72) = 5.695, P= 0.0185] e 100 μ M [F (5, 72) = 5.695, P=0.0002] comparado ao grupo CTL na avaliação de 24 hrs (Fig.5A). Na avaliação de 48hrs, por outro lado, apenas o grupo tratado com CBD 100 μ M manteve uma redução significativa da viabilidade celular comparado ao grupo CTL [F (5, 72) = 3.790, P=0.0124] (Fig.5B).

No ensaio de LDH, foi observado um aumento significativo da atividade dessa enzima no sobrenadante das células em cultivo tratadas com CBD 100 μ M comparado ao grupo CTL (Kruskal-Wallis: 24,98; P=0.0023) e grupo VEH (Kruskal-Wallis: 24,98; P=0.0015) no intervalo de 24 hrs (Fig.5C). Nenhuma diferença significativa foi observada no intervalo de 48 hrs (Fig.5D).

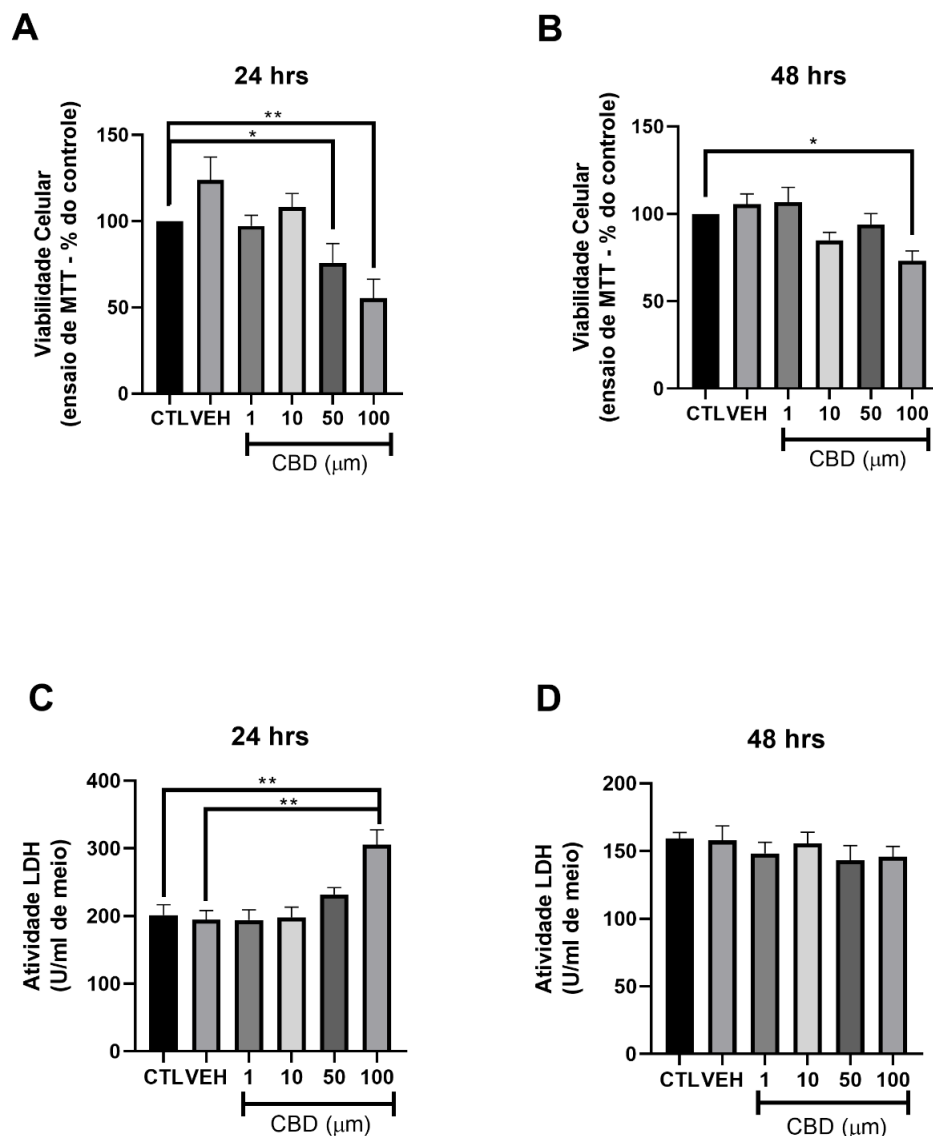


Figura 5. Curva de concentrações do CBD nos ensaios de citotoxicidade por MTT e atividade da enzima LDH em células microglias HMC3. (A) Efeito de diferentes concentrações do CBD (1-100 μ M) no ensaio de citotoxicidade por MTT após 24 horas de exposição (% do controle); (B) Efeito de diferentes concentrações do CBD (1-100 μ M) no ensaio de citotoxicidade por MTT após 48 horas de exposição (% do controle); (C) Efeito de diferentes concentrações do CBD (1-100 μ M) no ensaio de citotoxicidade por atividade da enzima LDH no sobrenadante dos cultivos após 24 horas de exposição; (D) Efeito de diferentes concentrações do CBD (1-100 μ M) no ensaio de citotoxicidade por atividade da enzima LDH no sobrenadante dos cultivos após 48 horas de exposição. Os dados são expressos como média \pm EPM. N composto por três replicatas experimentais independentes com pelo menos 3 replicatas técnicas cada. Os dados foram analisados com o teste ANOVA de uma via com teste de Tukey como teste de comparações múltiplas. *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$). Abreviações: CBD: cannabidiol; MTT: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio); LDH: lactato desidrogenase - *Lactate dehydrogenase*.

5.2. Efeito do CBD e HCQ nos ensaios de citotoxicidade nos protocolos de pré- e pós-tratamento com LPS

Baseado nos dados acima, a maior concentração testada que não afetou significativamente a viabilidade celular em ambos os ensaios de MTT e LDH nos dois intervalos de tempo selecionados foi a de 10 μM , sendo portanto a concentração escolhida para os ensaios subsequentes.

No ensaio de MTT, em ambos os protocolos de pré- e pós-tratamento, nenhuma diferença significativa foi observada nos grupos tratados com CBD (10 μM) com ou sem HCQ (10 μM) em relação ao grupo controle (Fig.6A-B).

No ensaio de LDH, semelhantemente, em ambos os protocolos de pré- e pós-tratamento, nenhuma diferença significativa foi observada nos grupos tratados com CBD (10 μM) com ou sem HCQ (10 μM) em relação ao grupo controle. Entretanto, uma tendência não-significativa de aumento da atividade da LDH foi observada nos grupos tratados com HCQ, LPS+CBD+HCQ (Kruskal-Wallis: 96,76; $P=0.3916$) e LPS+HCQ (Kruskal-Wallis: 96,76; $P=0.2733$), no protocolo de pré-tratamento em relação ao grupo CTL (Fig.6C-D).

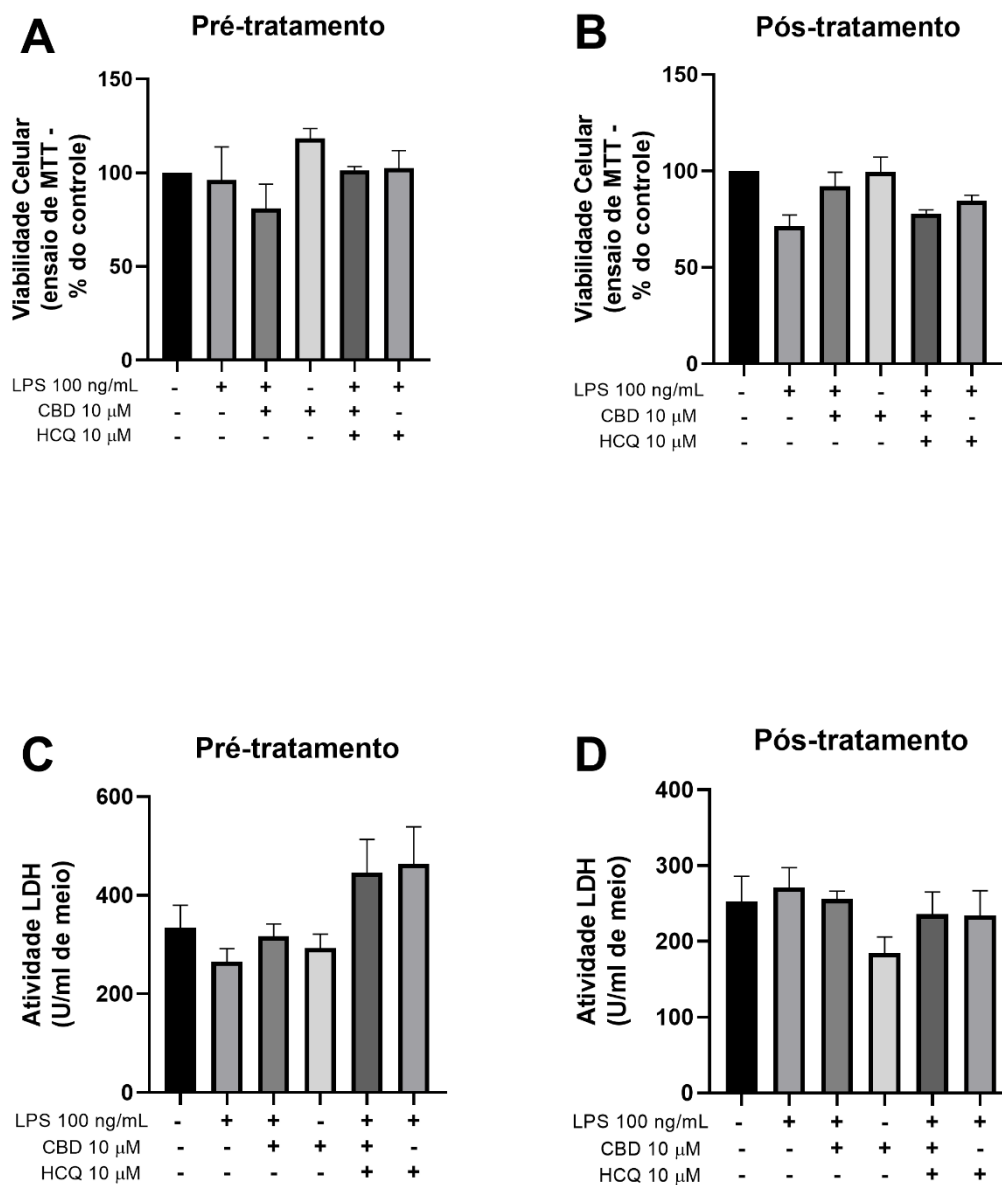


Figura 6. Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) nos protocolos de pré- e pós-tratamento com LPS em células microgliais HMC3. (A-B) Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) no ensaio de citotoxicidade por MTT (representado como % do controle) no protocolo de pré-tratamento e pós-tratamento respectivamente; (C-D) Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) no ensaio de citotoxicidade por atividade da enzima lactato desidrogenase no protocolo de pré-tratamento e pós-tratamento respectivamente. Os dados são expressos como média \pm EPM. N composto por três replicatas experimentais independentes com pelo menos 3 replicatas técnicas cada. Os dados foram analisados com o teste ANOVA de uma via com teste de Tukey como teste de comparações múltiplas. *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$). Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; MTT: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio); LDH: lactato desidrogenase - *Lactate dehydrogenase*.

5.3. Efeito do CBD e combinação com HCQ no ensaio de vesículas ácidas (*acidic vesicular organelles*, AVOS)

O ensaio de vesículas ácidas (AVOS) por meio da quantificação da relação entre a fluorescência vermelha e verde (red/green ou R/G) emitida pelo corante intra-vital laranja de acridina (*acridine orange*, AO) é um marcador estabelecido do estágio tardio de autofagia e da fusão de autofagossomos maduros e lisossomos. No protocolo de pré-tratamento, nesse ensaio, os grupos tratados com HCQ, como inibidor não específico da acidificação dos lisossomos, apresentaram redução significativa da relação vermelho/verde em relação à população positiva para essas vesículas (% gate) comparado ao grupo LPS [vs LPS+CBD+HCQ, (Kruskal-Wallis: 96,76; P=0.0196); e vs LPS+HCQ, (Kruskal-Wallis: 96,76; P=0.002)] e ao grupo CTL [vs LPS+HCQ, Kruskal-Wallis: 96,76; P=0.0301]. O grupo STV, como esperado, apresentou aumento significativo em ambos os parâmetros avaliados: relação vermelho/verde MFI (Kruskal-Wallis: 35,47; P=0.0025) e relação vermelho/verde % gate (Kruskal-Wallis: 96,76; P= 0.0301), quando comparado ao grupo CTL (Fig.7A-B, para representativos, ver Fig.8).

Em relação, ao protocolo de pós-tratamento, o grupo LPS+CBD apresentou um aumento significativo da relação vermelho/verde em ambos os parâmetros MFI (Kruskal-Wallis: 26,68; P=0.0257) e % gate (Kruskal-Wallis: 39,06; P=0.0122) em relação ao grupo LPS. O co-tratamento com HCQ (LPS+CBD+HCQ) significativamente reduziu essa relação em ambos os parâmetros em relação ao grupo LPS+CBD: para MFI (Kruskal-Wallis: 26,68; P=0.0150) e para % gate (Kruskal-Wallis: 39,06; P=0.0017). O grupo STV, semelhantemente, foi capaz de significativamente aumentar a relação vermelho/verde tanto para o MFI (Kruskal-Wallis: 26,68; P=0.0027) quanto para o % gate (Kruskal-Wallis: 26,68; P=0.0016) em relação ao grupo LPS. Por outro lado, o tratamento sozinho com HCQ nesse protocolo não causou alterações significativas na relação vermelho/verde (Fig.7C-D, para representativos, ver Fig.9).

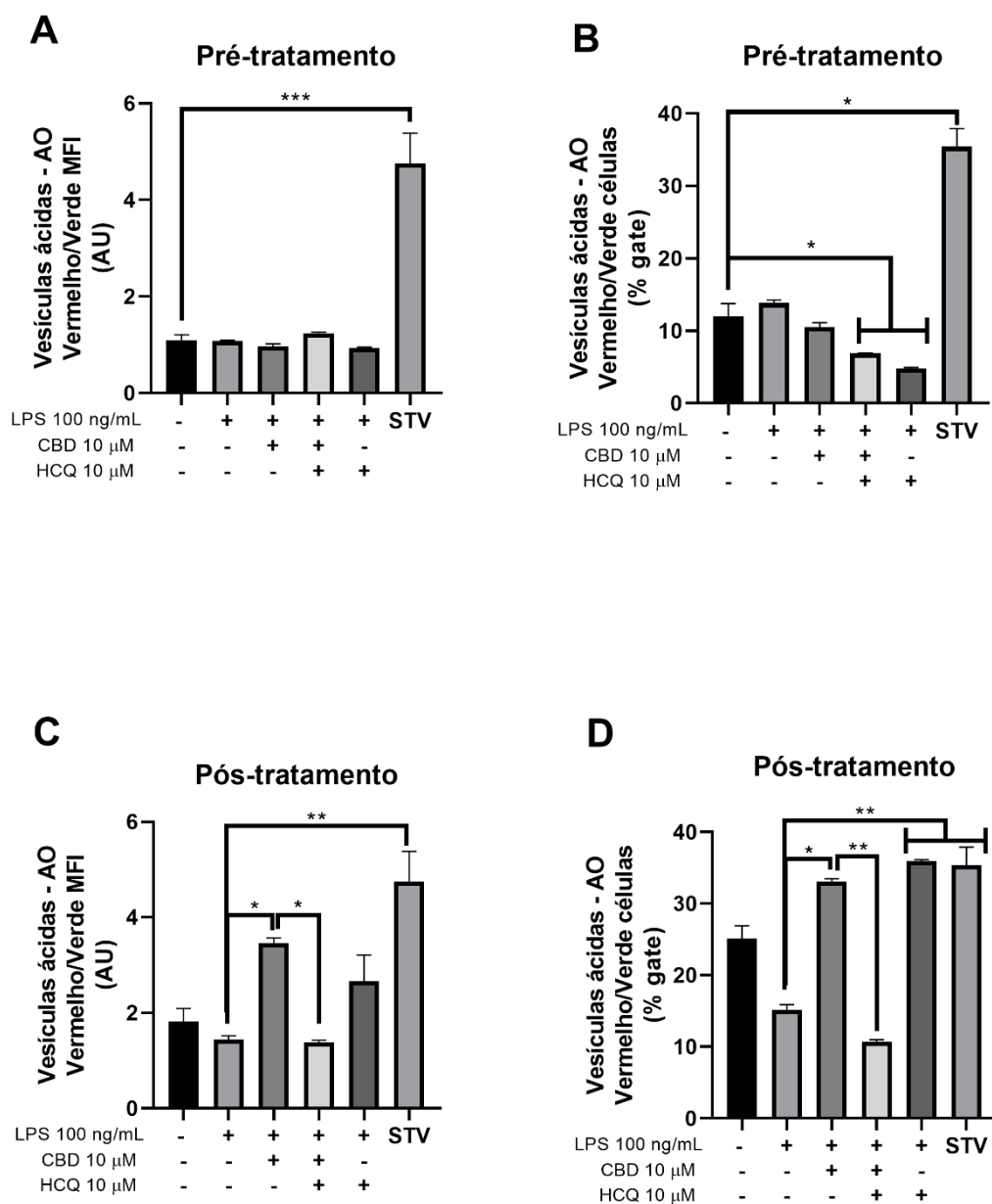


Figura 7. Avaliação quantitativa do ensaio de formação de vesículas ácidas (AVOS). (A-B) Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) no protocolo de pré-tratamento nos parâmetros intensidade media de fluorescência R/G (A) e % células na seleção (*gate*) de células AVOS+ (B); (C-D) Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) no protocolo de pós-tratamento nos parâmetros intensidade media de fluorescência R/G (C) e % células na seleção (*gate*) de células AVOS+ (D). Os dados são expressos como média \pm EPM. N composto por três replicatas experimentais independentes com pelo menos 3 replicatas técnicas cada. Os dados foram analisados com o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn como teste de comparações múltiplas. *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$). Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; HCQ: hidroxicloroquina; AO: acridina orange; AU: *arbitrary unity*; STV: *starvation*.

PRÉ-TRATAMENTO

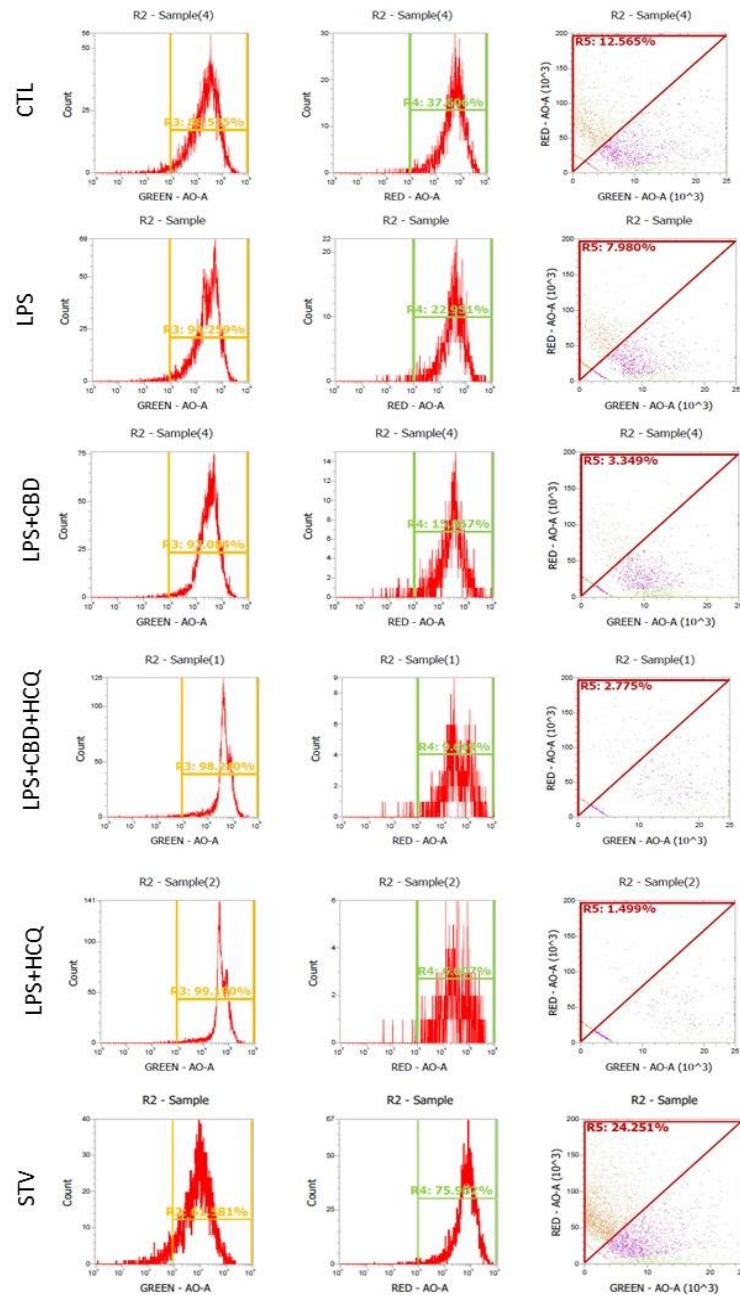


Figura 8. Representativos do ensaio de AVOS por citometria de fluxo do protocolo de pré-tratamento. Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) em células microgliais desafiadas com LPS. STV usada como condição experimental positiva para indução de autofagia. Gráficos de histograma para intensidade média de fluorescência (MFI) dos canais verde e vermelho representados em escala log com seleção em feiche de células positivas (MFI > 10^3). À direita, gráfico de *dot plot* representado em escala linear da relação vermelho (red, eixo y) e verde (green, eixo x) e seleção do *gate* de células AVOS+. Ref: THOME. et al. Ratiometric analysis of acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *Journal of Cell Science*, v. 129, n. 24, p. 4622, 2016. Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; HCQ: hidroxicloroquina; AO: acridina orange; STV: *starvation*.

PÓS-TRATAMENTO

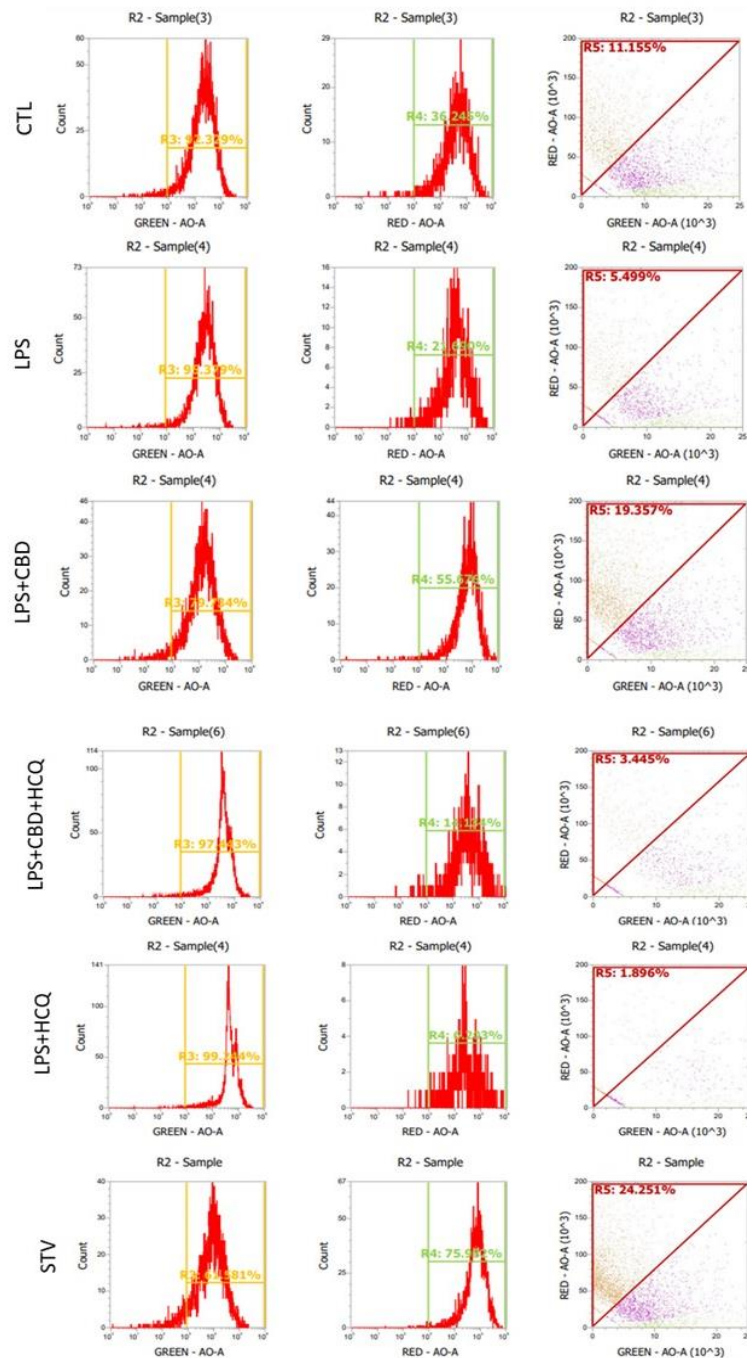


Figura 9. Representativos do ensaio de AVOS por citometria de fluxo do protocolo de pós-tratamento. Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) em células microgliais desafiadas com LPS. STV usada como condição experimental positiva para indução de autofagia. Gráficos de histograma para intensidade média de fluorescência (MFI) dos canais verde e vermelho representados em escala log com seleção em feixe de células positivas (MFI > 10³). À direita, gráfico de dot plot representado em escala linear da relação vermelho (red, eixo y) e verde (green, eixo x) e seleção do *gate* de células AVOS+. Ref: THOME. et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *Journal of Cell Science*, v. 129, n. 24, p. 4622, 2016. Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; HCQ: hidroxicloroquina; AO: acridina orange; STV: *starvation*.

5.4. Efeito do CBD na expressão protéica das isoformas de LC3B (I e II), taxa de conversão LC3B-II/LC3B-I e expressão da proteína p62/SQSTM1

Apenas a proteína microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), um ortólogo da proteína ATG8 em leveduras, se localiza em todos os tipos de vesículas envolvidas no fluxo autofágico, incluído fagoforo, autofagossomo e autolisossomo. Durante a formação do autofagossomo, a isoforma LC3B-I é conjugada a um grupamento fosfatidiletanolamina sendo convertida a isoforma LC3B-II pelos fatores ATG3 e ATG7. Portanto, a conversão de LC3-I para LC3-II e a degradação lisossomal de LC3-II refletem a progressão da autofagia, respectivamente os estágios iniciais (formação do autofagossomo) e finais (degradação do cargo autofágico) (JIANG et al, 2015). Em relação à expressão das isoformas LC3B-I e LC3B-II e taxa de conversão LC3B-II/LC3B-I na análise de comparações múltiplas, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos experimentais e controle. Nesse experimento, afim de avaliar a taxa de degradação da isoforma LC3B-II e os estágios finais do fluxo autofágico, nós replicamos os mesmos grupos expostos ao LPS e CBD, com e sem o inibidor seletivo da acidificação de lisossomos, cloreto de amônio (NH₄Cl), como previamente descrito (VRECHI et al., 2021).

Apesar disso, foi possível observar algumas tendências dignas de nota em relação à expressão dessas proteínas. Em relação à LC3B-II, em ambos os grupos expostos e não-expostos ao NH₄Cl, foi observado uma tendência à redução dessa isoforma no grupo LPS em comparação ao grupo CTL [sem NH₄Cl, DM: 1.647 (correspondendo à redução de 70.08%), P=0.9540; com NH₄Cl, DM: 1.538 (correspondendo à redução de 37,47 %), P=0.9680, ANOVA de uma via]. Também, uma tendência notável ao aumento da expressão de LC3B-II foi observado no grupo LPS+CBD em relação ao grupo LPS em ambas as condições sem e com NH₄Cl [sem NH₄Cl, DM: 2.684 (correspondendo ao aumento de 79.24%), P=0.0587; com NH₄C, DM: 2.715 (correspondendo ao aumento de 51,41 %), P=0.0689, ANOVA de uma-via] (Fig.10A-B).

Em relação a taxa de conversão LC3B-II/LC3B-I, uma tendência de aumento dessa relação foi observada na condição exposta ao NH₄Cl no grupo LPS+CBD em relação ao grupo CTL [DM:2,619 (correspondente ao aumento de 56,45%), P=0.8960, ANOVA de uma via] e ao grupo LPS [DM:1.801 (correspondente ao aumento de 38,82%), P=0.9582, ANOVA de uma-via] (Fig.10C).

Por fim, em relação a expressão da proteína p62/SQSTM1, foi possível observar nas condições não expostas ao NH₄Cl, uma redução da expressão de p62/SQSTM1 no grupo LPS+CBD em comparação ao grupo LPS (Kruskal-Wallis statistic: 15,70; P= 0.0079) e ao grupo CTL (Kruskal-Wallis statistic: 15,70; P= 0.0317). Ademais, tendência não-significativa de aumento da expressão dessa proteína foi evidenciado quando se comparando o grupo LPS+CBD e o grupo LPS expostos ao NH₄Cl [DM: 0.3193 (correspondente ao aumento de 25.64%), P=0.556, Kruskal-Wallis] (Fig.10D).

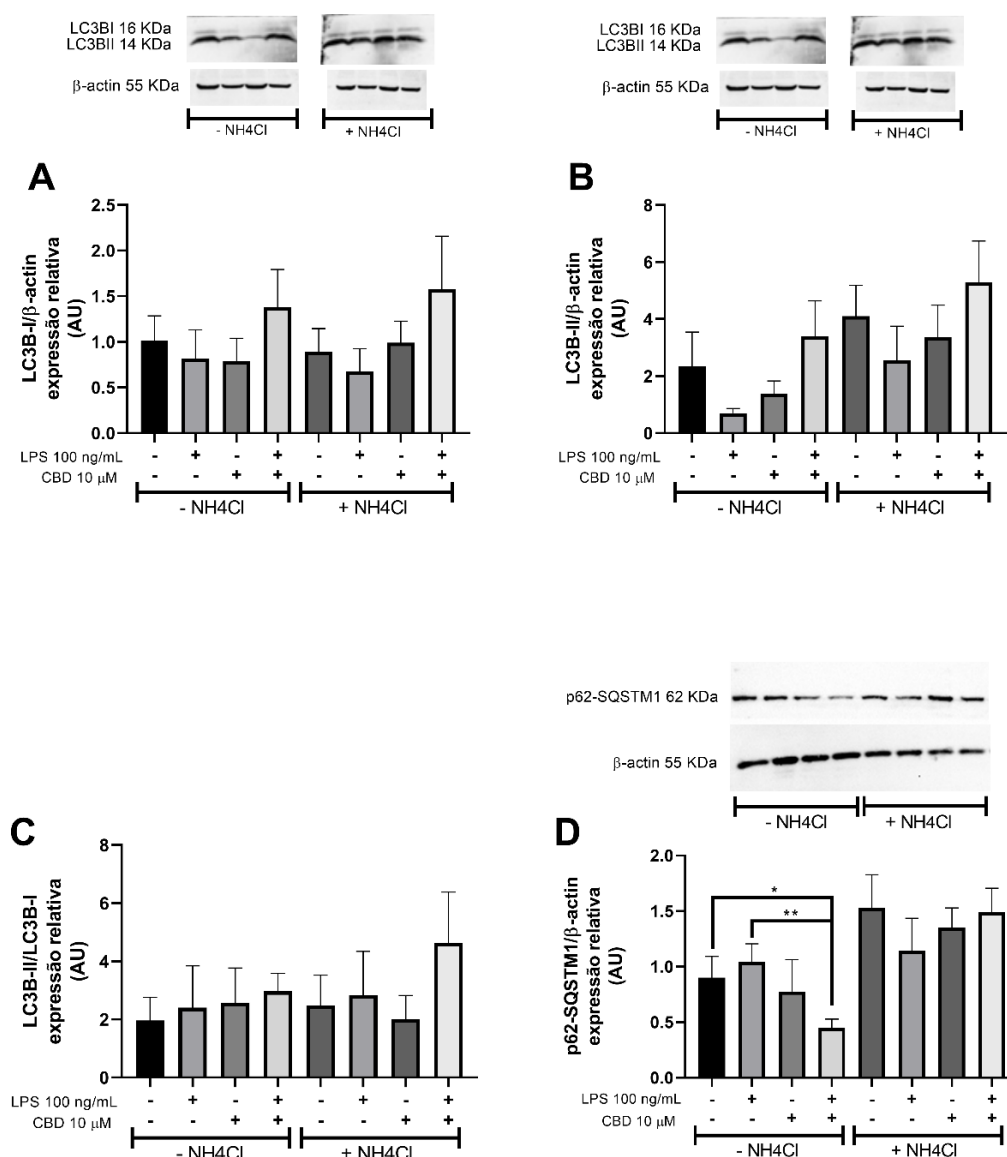


Figura 10. Expressão das proteínas LC3B isoformas I e II, relação LC3BII/LC3BI e p62/SQSTM1. Efeito do CBD (10 μM) no protocolo de pós-tratamento em condições sem e com NH₄Cl (inibidor da acidificação lisossomal). (A) expressão relativa da proteína LC3B isoforma I (normalizada pela β-actin); (B) expressão relativa da proteína LC3B isoforma II (normalizada pela β-actina); (C) relação LC3B isoforma II/ LC3B isoforma I

em unidades arbitrárias; (D) expressão relativa da proteína p62/SQSTM1(normalizada pela β -actin). Os dados são expressos como média \pm EPM. N composto por três replicatas experimentais independentes com pelo menos 2 replicatas técnicas cada. Os dados dos painéis A, B e C foram analisados com o teste de ANOVA uma via seguido pelo teste de Tukey. Os dados o painel D foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn como teste de comparações múltiplas. *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$. Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; NH_4Cl : cloreto de amônio; AU: *arbitrary unity*.

5.5. Efeito do CBD na expressão (RNAm) de genes relacionados à autofagia (ATGs)

No protocolo de pré-tratamento, foi possível observar um efeito mais pronunciado do CBD na expressão dos genes ATG5 e p62. Em relação ao primeiro gene (ATG5), a análise de comparações múltiplas demonstrou um aumento significativo nos grupos tratados com CBD, CTL+CBD [F (4, 20) = 8,404, $P=0.0031$] e LPS+CBD [F (4, 20) = 8,404, $P=0.0053$], em relação ao grupo LPS. Também, o grupo LPS apresentou uma redução significativa em relação ao grupo CTL [F (4, 20) = 8,404, $P=0.0383$]. O grupo STV, como esperado, demonstrou um aumento significativo em relação ao grupo LPS [F (4, 20) = 8,404, $P=0.002$], e uma tendência de aumento em relação ao grupo CTL. Em relação à expressão do gene ATG12, uma redução significativa foi observada no grupo LPS em relação ao grupo CTL [F (4, 25) = 5,943; $P=0.0121$]. Semelhantemente, um aumento significativo foi evidenciado no grupo STV em relação ao grupo LPS [F (4, 25) = 5,943; $P=0.0038$]. Em relação à expressão de BECLIN1, foi possível observar um aumento significativo no grupo STV em relação ao grupo CTL [F (4, 25) = 5,021; $P=0,0030$]. Também uma tendência notável, porém não-significativa de aumento foi evidente no grupo CBD+LPS em relação ao grupo CTL. Por fim, na expressão do gene p62, um aumento significativo foi evidenciado nos grupos LPS+CBD [F (4, 43) = 3,627; $P=0,0202$] e STV [F (4, 43) = 3,627; $P=0,0312$] em relação ao grupo CTL (Fig.11. A,C,E,G).

No protocolo de pós-tratamento, entre os genes avaliados, efeito mais significativo do tratamento com CBD foi evidenciado na expressão de ATG12 e p62. Primeiramente, em relação à expressão de ATG5, foi evidenciado um aumento significativo na expressão desse gene no grupo STV em relação ao grupo LPS [F (4, 17) = 4,510; $P=0,0390$]. Uma tendência de aumento da expressão desse gene foi observada no grupo LPS+CBD em

relação ao grupo LPS, porém não atingiu significância estatística. Em relação à expressão do gene ATG12, uma redução significativa foi evidenciada no grupo LPS em relação ao grupo CTL [F (4, 15) = 5,434; P=0,0258]. Ademais, um aumento significativo foi notável nos grupos LPS+CBD [F (4, 15) = 5,434; P=0,0097] e STV [F (4, 15) = 5,434; P=0,012] em relação ao grupo LPS. Em relação ao gene BECLIN1, uma notável tendência de aumento foi evidenciada nos grupos CTL-CBD, LPS+CBD e STV em relação ao grupo LPS, porém nenhum atingiu diferença estatisticamente significativa. Por fim, em relação à expressão do gene p62, uma redução significativa foi evidenciada nos grupos LPS [F (4, 39) = 12,59; P=0,0156] e CTL-CBD [F (4, 39) = 12,59; P=0,0165] em relação ao grupo CTL. Ademais, um aumento significativo foi evidente nos grupos LPS+CBD [F (4, 39) = 12,59; P=0,0183] e STV [F (4, 39) = 12,59; P<0.0001] em relação grupo LPS (Fig.11. B,D,F,H).

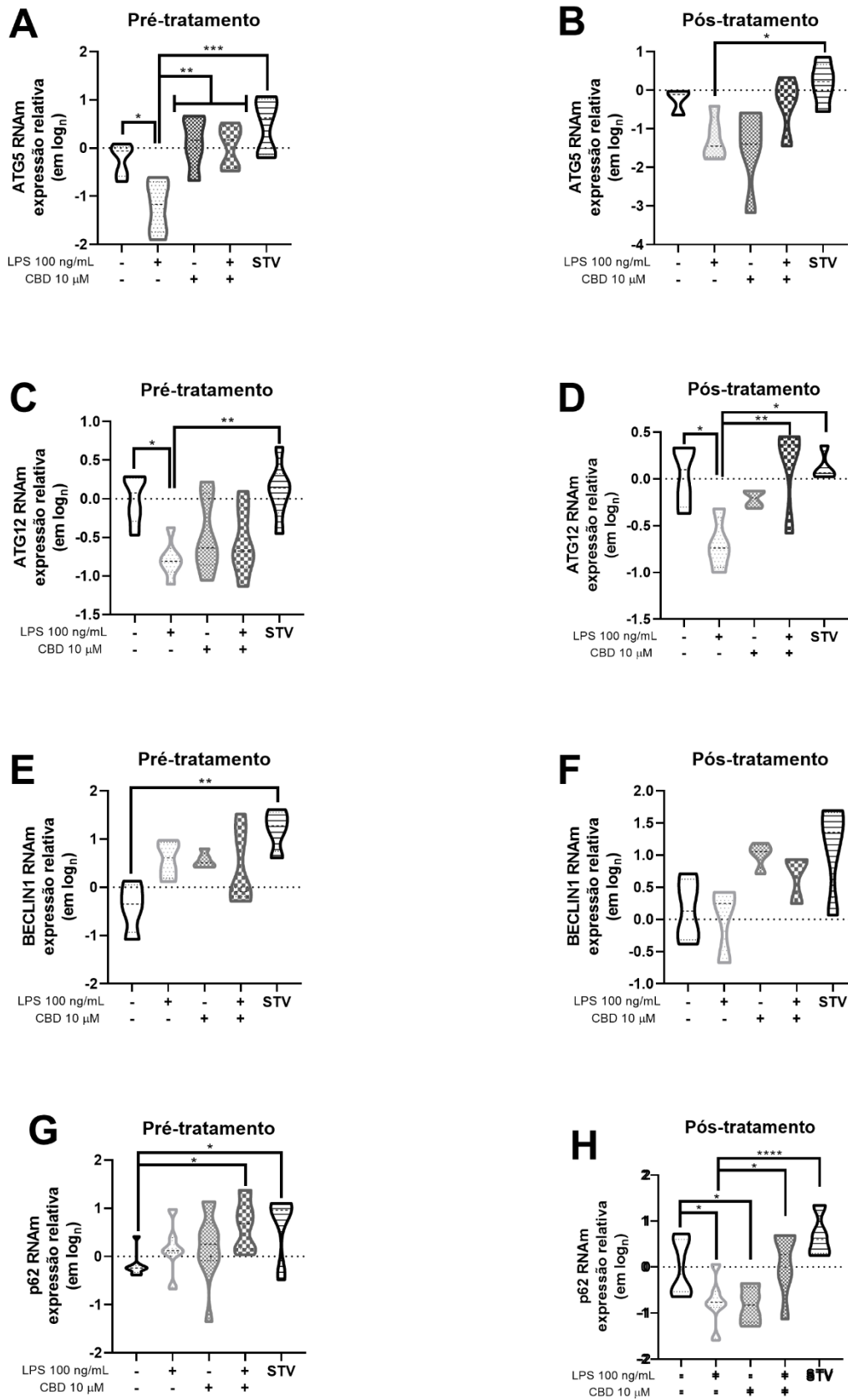


Figura 11. Efeito do CBD (10 μ M) nos protocolos de pré- (gráficos A,C,E,G) e pós-tratamento (B,D,F,H) na expressão relativa dos genes relacionados à autofagia (ATGs) RNAm. Os dados são expressos como média \pm EPM. N composto por três replicatas experimentais independentes com pelo menos 2 replicatas técnicas cada. Os dados na íntegra foram transformados para forma de \log_n e foram analisados com o teste ANOVA de uma-avia com teste de Tukey como teste de comparações múltiplas. ***P < 0,001 ****P < 0,0001). Abreviações: Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; STV: *starvation*; RNAm: RNA mensageiro; ATG: *autophagy-related genes*.

5.6. Efeito do CBD e combinação com HCQ nos marcadores de polarização pró-inflamatória

Protocolo de Pré-tratamento

Primeiramente, no protocolo de pré-tratamento, em relação aos níveis de nitrito, foi possível observar um aumento significativo dos níveis de nitrito no sobrenadante das micróglia ativadas com LPS (grupo LPS) em relação ao grupo CTL (Kruskal-Wallis: 82,64; P<0.0001). Redução significativa foi observada nos níveis de nitrito em todos os grupos tratados com CBD nesse protocolo, grupos: LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 82,64; P=0.002), CTL+CBD (Kruskal-Wallis: 82,64; P<0.0001), LPS+CBD+HCQ (Kruskal-Wallis: 82,64; P=0.001), em relação ao grupo LPS. O grupo STV também apresentou redução significativa dos níveis de nitrito em relação ao grupo LPS (Kruskal-Wallis: 82,64; P<0.0001) (Fig.12A).

Em relação aos níveis de TNF α , aumento significativo foi observado no grupo LPS em relação ao grupo CTL [F (6, 35) = 10,49; P<0,0001]. Redução significativa foi induzida nos grupos LPS+CBD [F (6, 35) = 10,49; P=0,0009] e LPS+CBD+HCQ [F (6, 35) = 10,49; P<0,0001] em relação ao grupo LPS. Ademais, aumento significativo dos níveis de TNF α foi identificado no grupo LPS+HCQ em relação ao grupo LPS [F (6, 35) = 10,49; P<0,0001]. O grupo STV não alterou significativamente os níveis dessa citocina em relação ao grupo CTL ou LPS (Fig.12C).

Em relação aos níveis de IL-1 β , foi evidente um aumento marcante dos níveis dessa citocina nos grupos LPS (Kruskal-Wallis: 50,66; P= 0.001) e LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 50,66; P= 0.0034) em relação ao grupo CTL. Por outro lado, os grupos tratados com HCQ, LPS+CBD+HCQ (Kruskal-Wallis: 50,66; P= 0.0119) e LPS+HCQ (Kruskal-Wallis:

50,66; $P < 0.0001$), apresentaram redução significativa dos níveis desse marcador em relação ao grupo LPS (Fig.12E).

Em relação aos níveis de $IFN\gamma$, nenhuma diferença significativa foi observada nesse protocolo (Fig.12G).

Protocolo de Pós-tratamento

Em relação aos níveis de nitrito, um aumento importante foi evidenciado nos grupos LPS (Kruskal-Wallis: 168,3; $P < 0.0001$), LPS+CBD+HCQ (Kruskal-Wallis: 168,3; $P = 0.002$) e LPS+HCQ (Kruskal-Wallis: 168,3; $P < 0.0001$) em relação ao grupo CTL. Por outro lado, os grupos LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 168,3; $P < 0.0001$) e CTL-CBD (Kruskal-Wallis: 168,3; $P < 0.0001$) apresentaram redução significativa dos níveis de nitrito em relação ao grupo LPS (Fig.12B).

Em relação aos níveis de $TNF\alpha$, aumento significativo dessa citocina foi evidenciado nos grupos LPS [$F(6, 46) = 3,209$; $P = 0,0202$] e no grupo LPS+CBD+HCQ [$F(6, 46) = 3,209$; $P = 0,0102$], em relação ao grupo CTL. O grupo LPS+CBD, por outro lado, apresentou redução significativa dos níveis dessa citocina em relação ao grupo LPS [$F(6, 46) = 3,209$; $P = 0,0443$] (Fig.12D).

Em relação aos níveis de $IL-1\beta$, aumento significativo foi observado no grupo LPS (Kruskal-Wallis: 77,36; $P < 0.0001$) em relação ao grupo CTL. Apenas o tratamento com HCQ, LPS+HCQ (Kruskal-Wallis: 77,36; $P = 0.004$), foi capaz de significativamente reduzir os níveis dessa citocina em relação ao grupo LPS. Apesar disso, uma tendência notável, porém não-significativa de redução dessa citocina foi observada nos grupos tratados com CBD (LPS+CBD e LPS+CBD+HCQ) em relação ao grupo LPS (Fig.12F).

Em relação aos níveis de $IFN\gamma$, uma redução significativa foi evidenciada nos grupos CTL+CBD (Kruskal-Wallis: 21,44; $P = 0,0014$) e LPS+CBD+HCQ (Kruskal-Wallis: 21,44; $P = 0,0072$) em relação ao grupo LPS. Tendência notável, porém não-significativa de aumento dos níveis de $IFN\gamma$ foi evidenciado no grupo LPS em relação ao grupo CTL. Adicionalmente, outra tendência notável de redução foi também identificada no grupo LPS+CBD em relação ao grupo LPS ($P = 0.2566$), porém não atingiu significância estatística (Fig.12H).

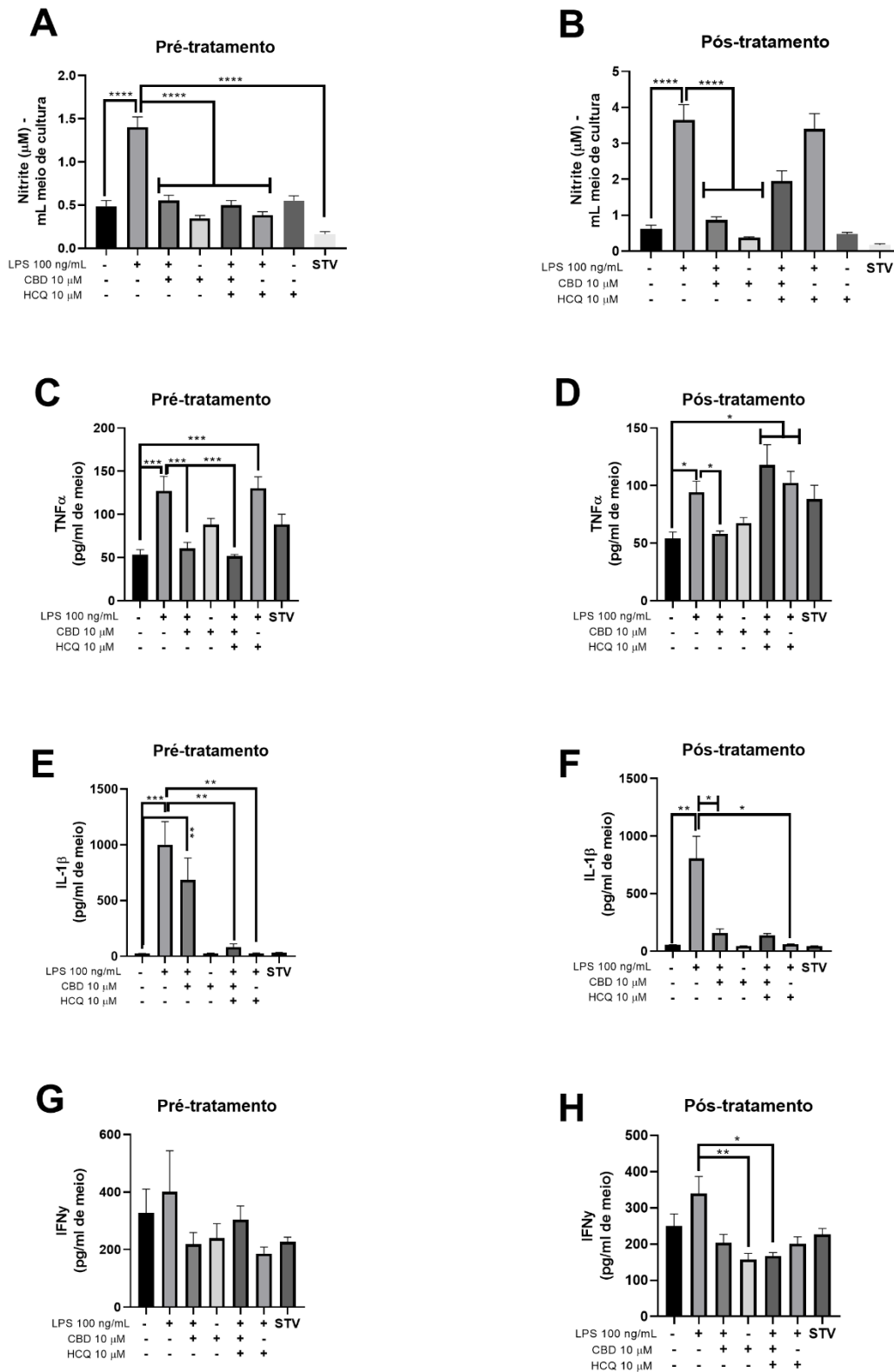


Figura 12. Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) nos protocolos de pré- (A,C,E,G) e pós-tratamento (B,D,F,H) com LPS em células microgliais HMC3 na expressão de marcadores de polarização pró-inflamatória no sobrenadante das células em cultivo. (A-B) níveis de nitrito (μ M); (C-D) níveis de TNF α (pg/ml de meio); (E-F) níveis de IL-1 β (pg/ml de meio); (G-H) níveis de IFN γ (pg/ml de

meio). Os dados são expressos como média \pm EPM. N composto por três replicatas experimentais independentes com pelo menos 3 replicatas técnicas cada. Os dados paramétricos foram analisados com o teste ANOVA de uma-via seguido do teste de Tukey como teste de comparações múltiplas, e apresentados como média \pm EPM. Os dados não-paramétricos foram analisados com o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn como teste de comparações múltiplas, e apresentados como mediana \pm EPMD. . *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$) Abreviações: Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; HCQ: hidroxicloroquina; STV: *starvation*; IL: interleucina; TNF: *tumor necrosis factor*; IFN: *interferon*.

5.7. Efeito do CBD e combinação com HCQ nos marcadores de polarização anti-inflamatórios

Protocolo de pré-tratamento

Em relação à atividade da arginase, foi possível observar apenas um aumento significativo nesse parâmetro no grupo STV em relação aos grupos LPS [$F(6,82) = 4,696$; $P=0.008$] e CTL [$F(6,82) = 4,696$; $P=0.0028$] (Fig.13A).

Em relação aos níveis de IL-4, aumento considerável foi evidenciado nos grupos LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 22,09 ; $P=0.0057$) e STV (Kruskal-Wallis: 22,09 ; $P=0.0064$) em relação ao grupo LPS (Fig.13C).

Nos níveis de BDNF, os grupos LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 25,69; $P=0.0468$) e CTL+CBD (Kruskal-Wallis: 25,69; $P=0.003$) apresentaram aumento significativo em relação ao grupo CTL. Adicionalmente, o grupo LPS+CBD também apresentou um aumento significativo desse marcador em relação ao grupo LPS (Kruskal-Wallis: 25,69; $P=0.0097$) (Fig.13E).

Em relação aos níveis de TGF- β , apenas o grupo STV apresentou um aumento significativo em relação ao grupo LPS (Kruskal-Wallis: 19,66; $P=0.0056$). Ademais, uma tendência à redução dos níveis de TGF- β foi evidente no grupo LPS em relação ao grupo CTL (Kruskal-Wallis: 19,66; MD: 14,01; $P > 0.099$) (Fig.13G).

Protocolo de Pós-tratamento

Em relação à atividade da enzima arginase, um aumento significativo foi evidenciado no grupo LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 22,22; $P = 0.0063$) e STV (Kruskal-Wallis: 22,22; P

= 0.0116) em relação ao grupo LPS. O grupo LPS+CBD também apresentou aumento significativo desse parâmetro em relação ao CTL (Kruskal-Wallis: 22,22; P = 0.0389). Nenhuma diferença significativa ou tendência digna de nota foi observada entre os demais grupos (Fig.13B).

Em relação aos níveis de IL-4, aumento significativo foi observado no grupo LPS+CBD [F(6,48) = 10,61; P=0.0080] e STV [F(6,48) = 10,61; P<0.0001] em relação ao grupo LPS. Por outro lado, redução significativa foi identificada no grupo LPS+CBD+HCQ em relação ao grupo LPS+CBD [F(6,48) = 10,61; P=0.011] (Fig.13D).

Em relação aos níveis de BDNF, aumento considerável foi evidenciado no grupo LPS+CBD em relação aos grupos CTL [F(6,48) = 7,855; P=0.0016] e LPS [F(6,48) = 7,855; P=0.0038]. Nenhuma diferença significativa ou tendência digna de nota foi observada entre os demais grupos (Fig.13F).

Em relação aos níveis de TGF- β , o grupo LPS+CBD apresentou aumento considerável em relação ao grupo CTL (Kruskal-Wallis: 23,12; P = 0.0315). O grupo STV, por sua vez, também apresentou aumento significativo em relação aos grupos CTL (Kruskal-Wallis: 23,12; P=0.0076) e LPS (Kruskal-Wallis: 23,12; P=0.0137) (Fig.13H).

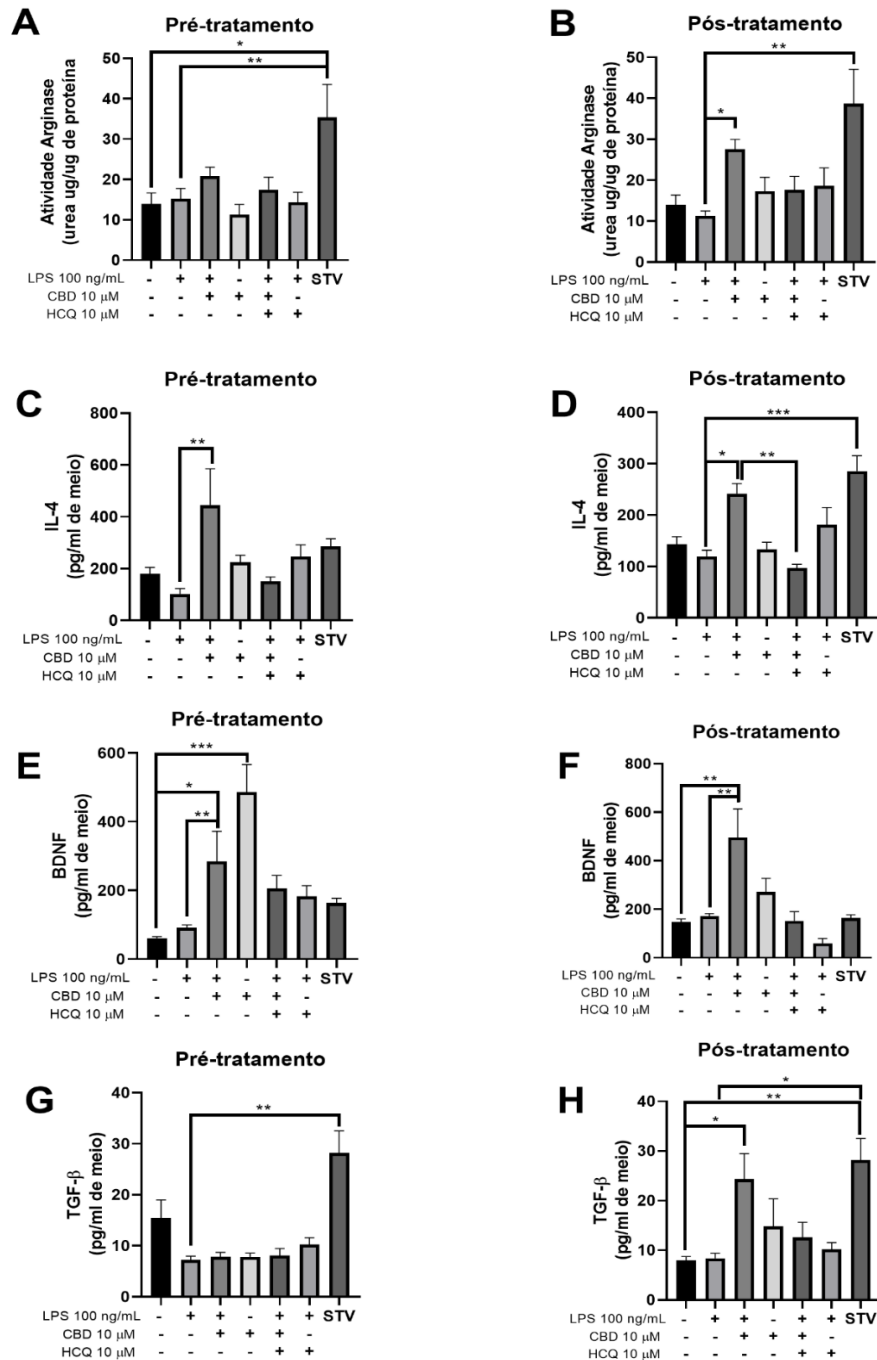


Figura 13. Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) nos protocolos de pré- (A,C,E,G) e pós-tratamento (B,D,F,H) com LPS em células microgliciais HMC3 na expressão de marcadores de polarização anti-inflamatória. (A-B) atividade da enzima Arginase (μ g de uréia/ug de proteína); (C-D) níveis de IL-4 (pg/ml de meio); (E-F) níveis de BDNF (pg/ml de meio); (G-H) níveis de TGF- β (pg/ml de meio). Os dados são expressos como média \pm EPM. N composto por três replicatas experimentais independentes com pelo menos 3 replicatas técnicas cada. Os dados paramétricos foram analisados com o teste ANOVA de uma-via seguido do teste de

Tukey como teste de comparações múltiplas, e apresentados como média \pm EPM. Os dados não-paramétricos foram analisados com o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn como teste de comparações múltiplas, e apresentados como como mediana \pm EPMD. . ***P< 0,001 ****P< 0,0001) Abreviações: Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; HCQ: hidroxicloroquina; STV: *starvation*; IL: interleucina; BDNF: brain-derived neurotrophic factor; TGF- β : fator de transformação do crescimento beta.

5.8. Efeito do CBD na expressão e co-localização de Arginase1 (Arg1) e iNOS

Protocolo de Pré-tratamento

Em relação à expressão de iNOS, representada pela relação MFI/área marcada, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais e controle envolvidos (Fig.14A).

Em relação à expressão de Arg1, representada pela relação MFI/área marcada relativa, foi observado um aumento significativo nessa relação nos grupo LPS+CBD em relação aos grupos CTL [F(3,38) = 5,580; P=0.0028] e LPS [F(3,38) = 5,580; P=0.0155] (Fig.14C).

Por fim em relação à comarcação desses marcadores, representado pelo coeficiente de sobreposição Arg1 sobre iNOS, foi identificado um aumento significativo desse coeficiente nos grupos LPS+CBD [F(3,38) = 6,977; P=0.050] e CTL+CBD [F(3,38) = 6,977; P<0.0001] em relação ao grupo CTL (Fig.14E, para representativos, Quadro 6).

Protocolo de Pós-tratamento

Em relação à expressão de iNOS, representada pela relação MFI/área marcada, semelhantemente, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais e controle envolvidos (Fig.14B).

Em relação à expressão de Arg1, representada pela relação MFI/área marcada relativa, foi observado um aumento significativo apenas no grupo LPS+CBD em relação ao grupo CTL (Kruskal-Wallis statistic: 7,138; P=0.0496) (Fig.14D).

Por fim em relação à colocação desses marcadores, representado pelo coeficiente de sobreposição Arg1 sobre iNOS, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos comparados (Fig.14F, para representativos ver Quadro 7).

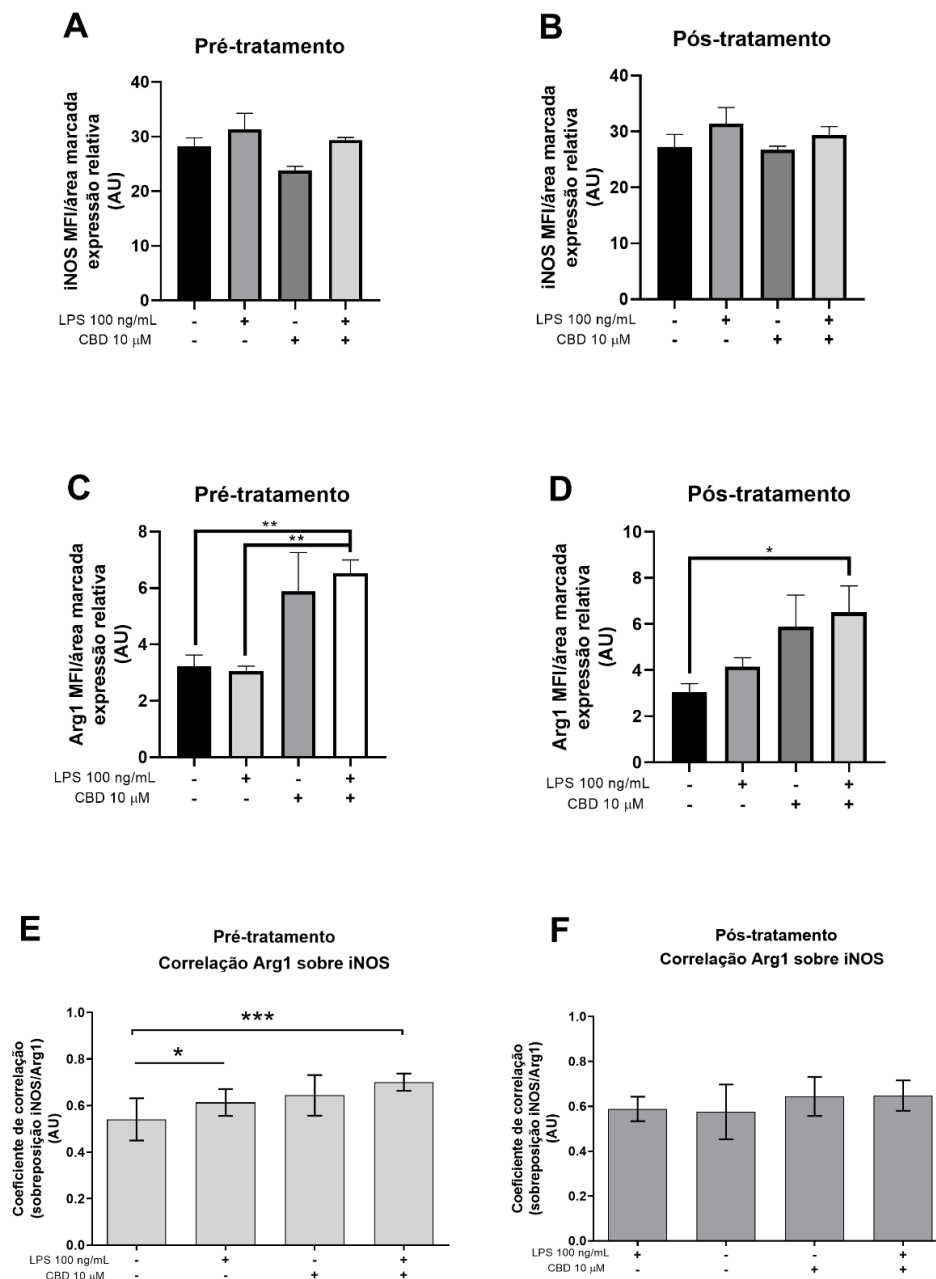
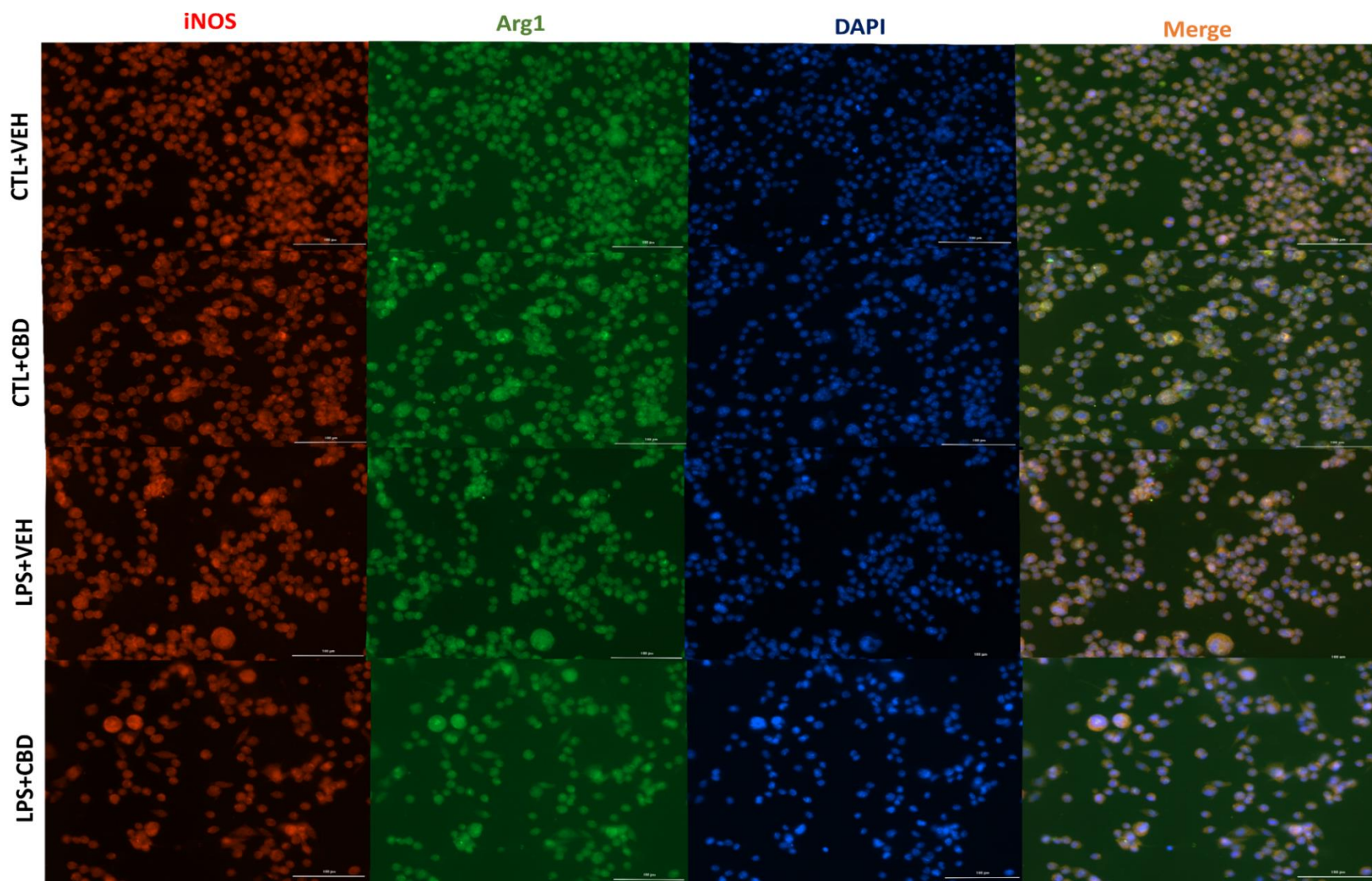


Figura 14. Efeito do CBD (10 μM) nos protocolos de pré- (A,C,E) e pós-tratamento (B,D,F) com LPS em células microgliais HMC3 na expressão de iNOS (A-B), Arg1 (C-D), bem como coeficiente de correlação (E-F). N composto por três replicatas independentes com pelo menos 2 replicatas técnicas cada. Coeficiente de correlação expresso como coeficiente Pearson da sobreposição da imunomarcagem de Arg1 (verde) sobre iNOS (vermelho). Os dados paramétricos foram analisados com o teste ANOVA de uma-vida seguido do teste de Tukey como teste de comparações múltiplas, e apresentados como média ± EPM. Os dados não-paramétricos foram analisados com o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn como teste de comparações múltiplas, e

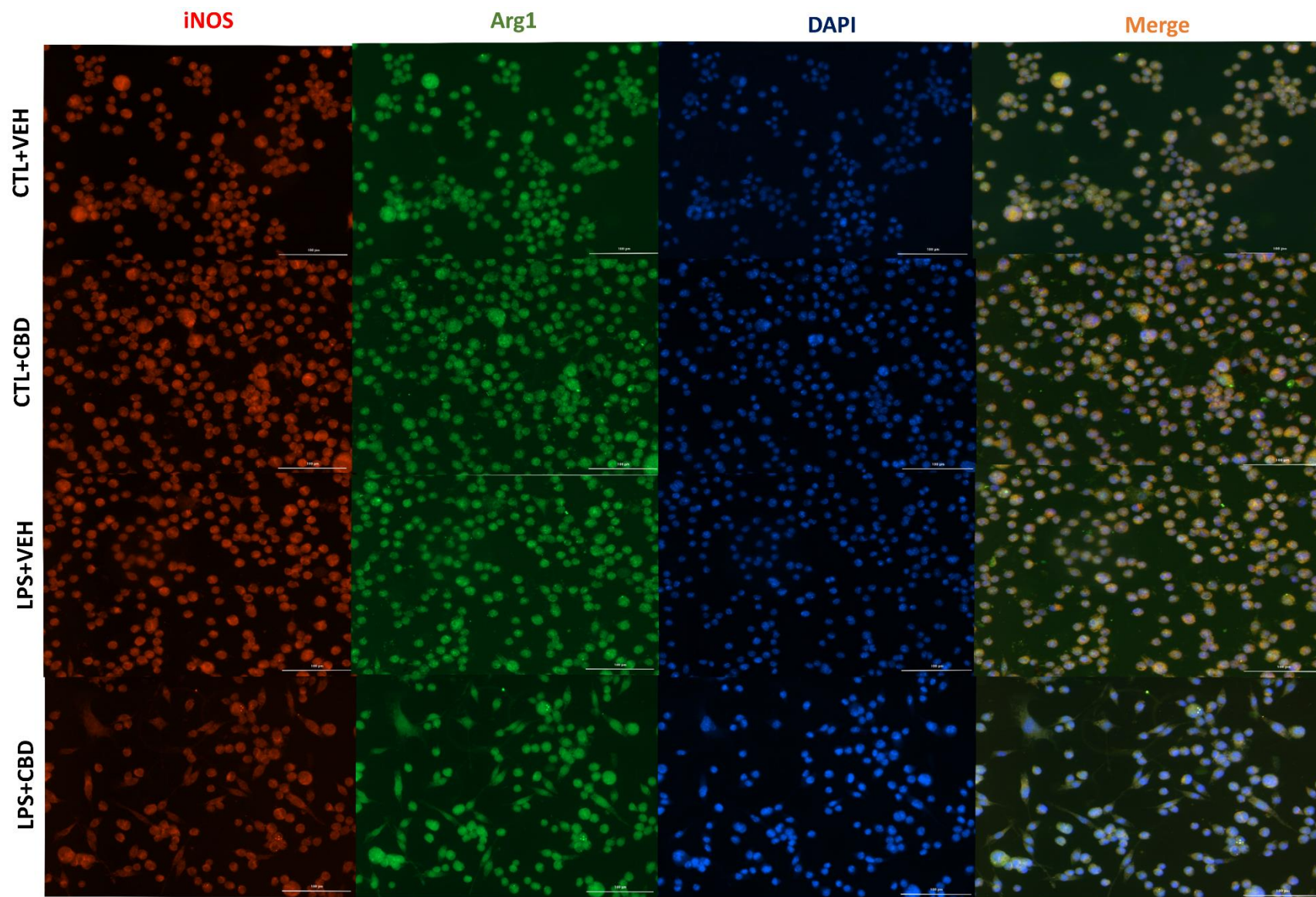
apresentados como como mediana \pm EPMD. . ***P<0,001 ****P<0,0001) Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; EPMD: erro padrão da mediana. iNOS: óxido nítrico sintetase induzida; Arg1: arginase 1; MFI: *mean fluorescence intensity*.

Quadro 6. Fotomicrografias de imunexpressão de iNOS (Vermelho), Arg1 (Verde), DAPI (Azul) e Merge (sobreposição de todos os canais).



Micrógliã HMC3 tratadas com CBD 10 μ M com e sem LPS no protocolo de pré-tratamento. Fotomicrografias de campos aleatórios com pelo menos 6 imagens por condição experimental. Aumento: 200 x. Escala: 50 μ m. Abreviações: CBD: canabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; iNOS: óxido nítrico sintetase induzida; Arg1: arginase 1.

Quadro 7. Fotomicrografias de imunexpressão de iNOS (Vermelho), Arg1 (Verde), DAPI (Azul) e Merge (sobreposição de todos os canais).



Micróglia HMC3 tratadas com CBD 10 μ M com e sem LPS no protocolo de pós-tratamento. Fotomicrografias de campos aleatórios com pelo menos 6 imagens por condição experimental. Aumento: 200 x. Escala: 50 μ m. Abreviações: CBD: canabidiol; LPS: LPS: lipopolissacarídeo; iNOS: óxido nítrico sintetase induzida; Arg1: arginase 1.

5.9. Efeito do CBD na expressão de marcadores de superfície de polarização pró- e anti-inflamatória

Protocolo de Pré-tratamento

Nesse protocolo, inicialmente, em relação a % de células CD11b+, foi evidenciado uma redução significativa do % dessa população no grupo LPS+CBD em relação ao grupo CTL+CBD (Kruskal-Wallis: 11,73; P=0.0083). Nenhuma alteração significativa foi evidenciada no MFI para CD11b entre os grupos comparados (Fig. 15A-B).

Em relação ao % de células CD86+, foi possível observar uma redução dessa população nos grupos desafiados com LPS: LPS (Kruskal-Wallis: 24,11; P=0.0011) e LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 24,11; P=0.0002) em relação ao grupo CTL. Adicionalmente, uma redução significativa foi também observada no grupo LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 24,11; P=0.0170) em relação ao grupo CTL+CBD. Em relação à intensidade de MFI para CD86, um aumento importante foi evidenciado no grupo LPS+CBD em relação ao grupo CTL+CBD (Kruskal-Wallis: 13,57; P=0.0016) (Fig. 15C-D).

Em relação ao % de células CD200R+, um aumento importante do % dessa população foi observado no grupo LPS+CBD em relação aos grupos CTL (Kruskal-Wallis: 20,87; P<0.0001), LPS (Kruskal-Wallis: 20,87; P=0.0459) e CTL+CBD (Kruskal-Wallis: 20,87; P=0.0103). Em relação a MFI de CD200R, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos comparados (Fig. 15E-F).

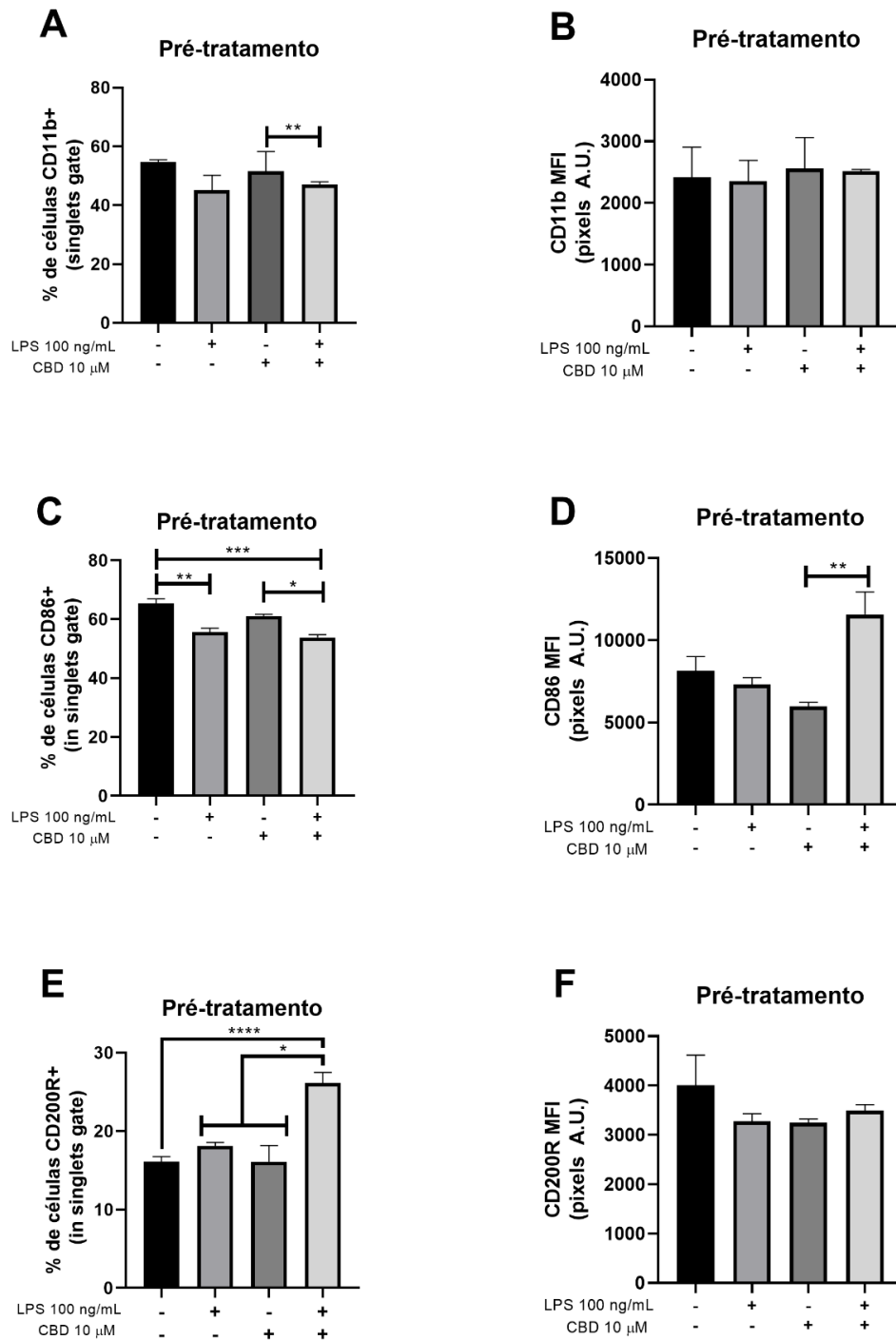


Figura 15. Efeito do CBD (10 μ M) no protocolo de pré-tratamento na expressão e detecção de células marcadas para os receptores de superfície CD11b, CD86 e CD200R. (A-B) % de células CD11b⁺ e intensidade média de fluorescência (MFI); (C-D) % de células CD86⁺ e intensidade media de fluorescência (MFI); (E-F) % de células CD200R⁺ e intensidade media de fluorescência (MFI). Os dados foram analisados com o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn como teste de comparações múltiplas. Dados não-paramétricos foram expressos como mediana \pm EPMD. *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$). Abreviações: Abreviações: A.U.: unidade arbitrária; CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; EPMD: erro padrão da mediana. MFI: *mean fluorescence intensity*.

Em relação às populações dos quadrantes de imuno-marcação para CD11b e CD86, foi possível observar, inicialmente em relação à população CD11b^{alta}CD86^{alta}, uma redução dessa população no grupo LPS+CBD em relação ao grupo CTL [F(1.571,9.951) = 29,21; P=0.002] e LPS [F(1.571,9.951) = 29,21; P=0.005]. Além disso, um aumento dessa população CD11b^{alta}CD86^{alta} foi evidente no grupo CTL+CBD em relação ao grupo CTL [F(1.571,9.951) = 29,21; P=0.0334]. Em relação à população de células CD11b^{alta}CD86^{baixa}, um aumento significativo do % dessas células foi notável no grupo LPS+CBD [F(1.571,9.951) = 29,21; P=0.0049] e CTL+CBD [F(1.571,9.951) = 29,21; P=0.0187] em relação ao grupo CTL. Por fim, em relação a população de células CD11b^{baixa}CD86^{alta}, apenas uma redução significativa foi identificada no grupo CTL+CBD em relação ao grupo CTL [F(1.571,9.951) = 29,21; P<0.0001] (Fig. 17A).

Em relação às populações dos quadrantes de imuno-marcação para CD11b e CD200R, inicialmente para a população de células de CD11b^{alta}CD200R^{alta}, os grupos LPS+CBD [F(1.571,9.951) = 21,26 ; P=0.0017] e CTL+CBD [F(1.571,9.951) = 21,26 ; P=0.0003] apresentaram um aumento significativo do % dessas células em relação ao grupo CTL. O aumento evidenciado dessa população CD11b^{alta}CD200R^{alta} no grupo LPS+CBD foi também significativo em relação aos grupos LPS [F(1.571,9.951) = 21,26 ; P=0.0135] e CTL+CBD [F(1.571,9.951) = 21,26 ; P=0.0127]. Em relação à população de células CD11b^{alta}CD200R^{baixa}, uma redução significativa foi evidenciada no grupo CBD+LPS em relação CTL [F(1.571,9.951) = 21,26 ; P=0.0001] e LPS [F(1.571,9.951) = 21,26 ; P=0.0039]. Por fim, em relação à população CD11b^{baixa}CD200R^{alta}, um aumento significativo foi notado no grupo LPS+CBD em relação ao grupo CTL+CBD [F(1.571,9.951) = 21,26 ; P=0.0097] (Fig. 17C).

Em relação às populações dos quadrantes de imuno-marcação para CD86 e CD200R, inicialmente, pode-se observar um aumento do % de células CD86^{alta}CD200R^{alta} no grupo LPS+CBD em relação ao grupo CTL [F(2.50, 17.51) = 28,41 ; P=0.0173]. Em relação à população de células CD86^{alta}CD200R^{baixa}, uma redução significativa foi evidente nos grupos LPS+CBD [F(2.50, 17.51) = 28,41 ; P=0.0030] em relação ao grupo CTL. Em relação à população de células CD86^{baixa}CD200R^{alta}, um aumento significativo foi identificado no grupo LPS+CBD em relação a todos os demais grupos: CTL [F(2.50, 17.51) = 28,41 ; P=0.0052], LPS [F(2.50, 17.51) = 28,41 ; P=0.0131] e CTL+CBD [F(2.50, 17.51) = 28,41 ; P=0.0134]. Finalmente, em relação à população de células CD86^{baixa}CD200R^{baixa}, aumento no % dessas células foi observado no grupo LPS [F(2.50,

17.51) = 28,41 ; P=0.0195] em relação ao grupo CTL, bem como um aumento dessa população foi evidente no grupo LPS+CBD [F(2.50, 17.51) = 28,41 ; P=0.0243] em relação ao grupo LPS (Fig. 17E).

Protocolo de Pós-tratamento

Em relação à população de células CD11b+, redução significativa foi evidente nos grupos desafiados com LPS: LPS (Kruskal-Wallis: 20,65; P=0.0400) e LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 20,65; P=0.001) em relação ao grupo CTL. O grupo LPS+CBD também apresentou redução significativa em relação ao grupo CTL+CBD (Kruskal-Wallis: 20,65; P=0.0133). Semelhantemente, em relação a MFI para CD11b, redução significativa foi observada nos grupos LPS (Kruskal-Wallis: 24,38; P=0.0117) e LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 24,38; P<0.0001) em relação ao grupo CTL. Adicionalmente, uma redução significativa foi também notável comparando o grupo LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 24,38; P=0.0128) com CTL+CBD (Fig.16A-B).

Nesse protocolo, em relação à população de células CD86+, uma redução significativa do % dessas células foi observada no grupo LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 11,21 ; P=0.0089) em relação ao grupo CTL. Em relação a MFI para CD86, um aumento marcante foi evidente no grupo LPS (Kruskal-Wallis: 10,38; P=0.0478) e LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 10,38; P=0.0172) em relação ao grupo CTL. Nenhuma diferença significativa adicional foi observada em relação ao % ou MFI das células CD86+ entre os grupos testados (Fig.16C-D).

Em relação à população de células CD200R+, foi observado um aumento do % dessa população no grupo LPS+CBD em relação ao grupo CTL (Kruskal-Wallis: 21,75; P<0.0001) e CTL+CBD (Kruskal-Wallis: 21,75; P=0.0139). Para a MFI das células CD200R+, apenas um aumento significativo foi evidenciado no grupo CTL+CBD em relação ao grupo LPS (Kruskal-Wallis: 9,23; P=0.0202) (Fig.16E-F).

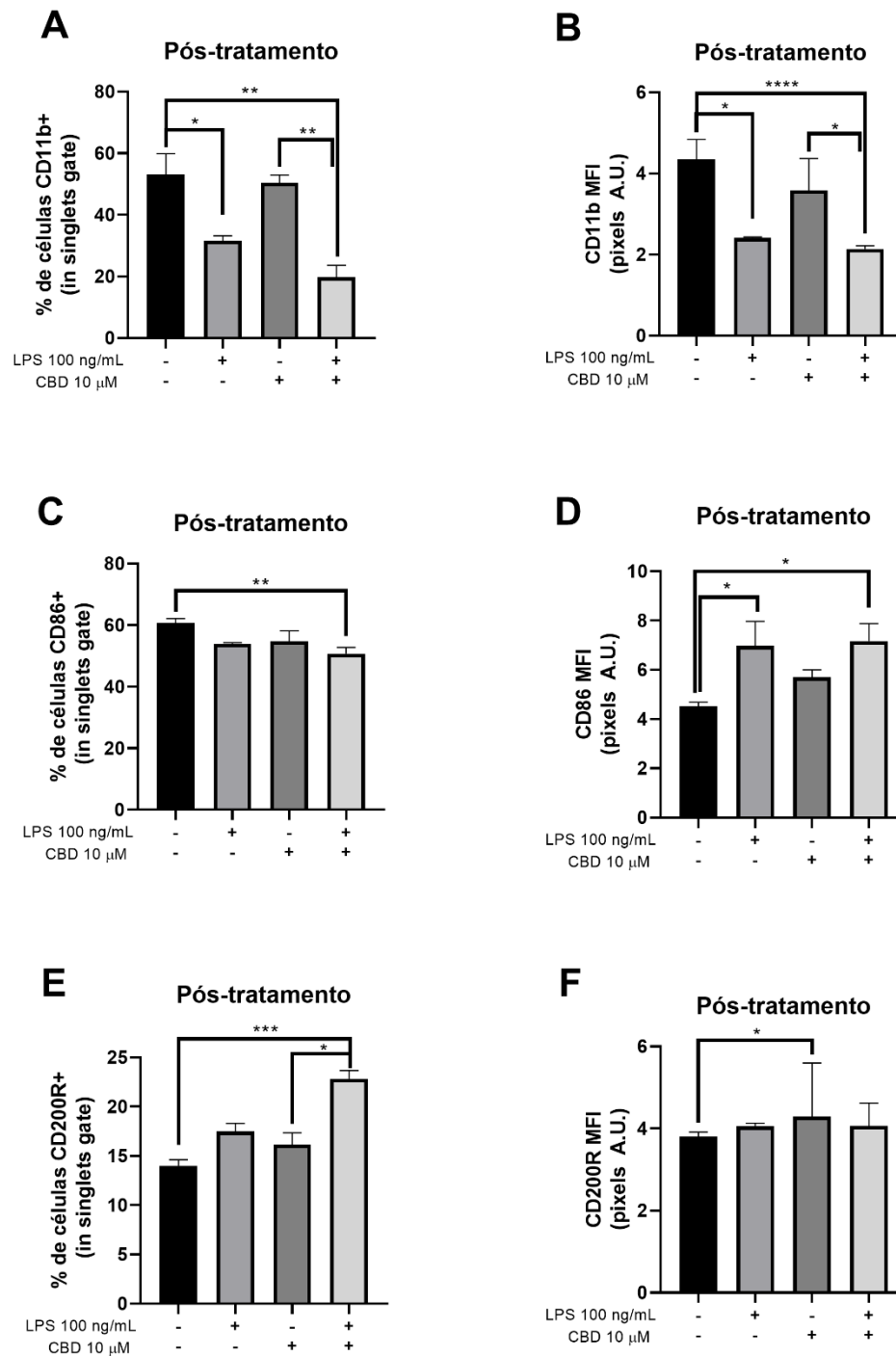


Figura 16. Efeito do CBD (10 μ M) no protocolo de pós-tratamento na expressão e detecção de células marcadas para os receptores de superfície CD11b, CD86 e CD200R. (A-B) % de células CD11b+ e intensidade média de fluorescência (MFI); (C-D) % de células CD86+ e intensidade media de fluorescência (MFI); (E-F) % de células CD200R+ e intensidade media de fluorescência (MFI). Os dados foram analisados com o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn como teste de comparações múltiplas. Dados não-paramétricos foram expressos como mediana \pm EPMD. *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$). Abreviações: Abreviações: A.U.: unidade arbitrária; CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; STV: *starvation*; EPMD: erro padrão da mediana; MFI: *mean fluorescence intensity*.

Em relação às populações dos quadrantes de imuno-marcação para CD11b e CD86, inicialmente foi possível observar uma redução do % de células CD11b^{alta}CD86^{alta} nos grupos CBD+LPS [F(2.41, 14.90) = 69,45 ; P <0.0001] e LPS [F(2.41, 14.90) = 69,45 ; P=0.0001] em relação ao grupo CTL. Em relação à população de células CD11b^{alta}CD86^{baixa}, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos testados. Por fim, em relação à população de células CD11b^{baixa}CD86^{alta}, um aumento significativo foi observado nos grupos LPS [F(2.41, 14.90) = 69,45 ; P = 0.003] e LPS+CBD [F(2.41, 14.90) = 69,45 ; P = 0.0272] em relação ao grupo CTL (Fig.17B).

Em relação às populações dos quadrantes de imuno-marcação para CD11b e CD200R, inicialmente nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos comparados na população de células CD11b^{alta}CD200R^{alta}. Em relação às células CD11b^{alta}CD200R^{baixa}, uma redução significativa do % dessas células foi evidenciado nos grupos LPS [F(2.41, 14.90) = 69,45 ; P <0.0001] e LPS+CBD [F(2.41, 14.90) = 69,45 ; P <0.0001] em relação ao grupo CTL. Adicionalmente, redução significativa foi evidente no grupo LPS+CBD [F(2.41, 14.90) = 69,45 ; P <0.0001] quando comparado ao grupo LPS. Por fim, em relação à população de células CD11b^{baixa}CD200R^{alta}, um aumento significativo foi observado nos grupos LPS [F(2.41, 14.90) = 69,45 ; P=0.0010] e LPS+CBD [F(2.41, 14.90) = 69,45 ; P=0.0006] em relação ao grupo CTL. Adicionalmente, quando comparado ao grupo LPS, um aumento significativo no % dessas células foi também evidenciado no grupo LPS+CBD [F(2.41, 14.90) = 69,45 ; P=0.0046] (Fig.17D).

Em relação às populações dos quadrantes de imuno-marcação para CD86 e CD200R, inicialmente um aumento significativo foi observado no grupo LPS+CBD para o % de células CD86^{alta}CD200R^{alta} em relação aos grupos CTL [F(2.90, 18.41) = 69,45 ; P=0.0008] e LPS [F(2.90, 18.41) = 69,45 ; P=0.0004]. Em relação ao % de células CD86^{alta}CD200R^{baixa}, apenas uma redução significativa foi evidenciada no grupo LPS+CBD [F(2.90, 18.41) = 69,45; P=0.0008] em relação ao grupo CTL. Em relação ao % de células CD86^{baixa}CD200R^{alta}, aumento importante foi identificado no grupo LPS+CBD em relação aos grupos CTL [F(2.90, 18.41) = 69,45; P=0.0005] e LPS [F(2.90, 18.41) = 69,45; P=0.0102]. Por fim, em relação ao % de células CD86^{baixa}CD200R^{baixa}, aumento significativo dessa população foi notado no grupo LPS [F(2.90, 18.41) = 69,45; P=0.0020] em relação ao grupo CTL, enquanto redução significativa foi observada no grupo LPS+CBD [F(2.90, 18.41) = 69,45; P<0.0001] em relação ao grupo LPS (Fig.17F).

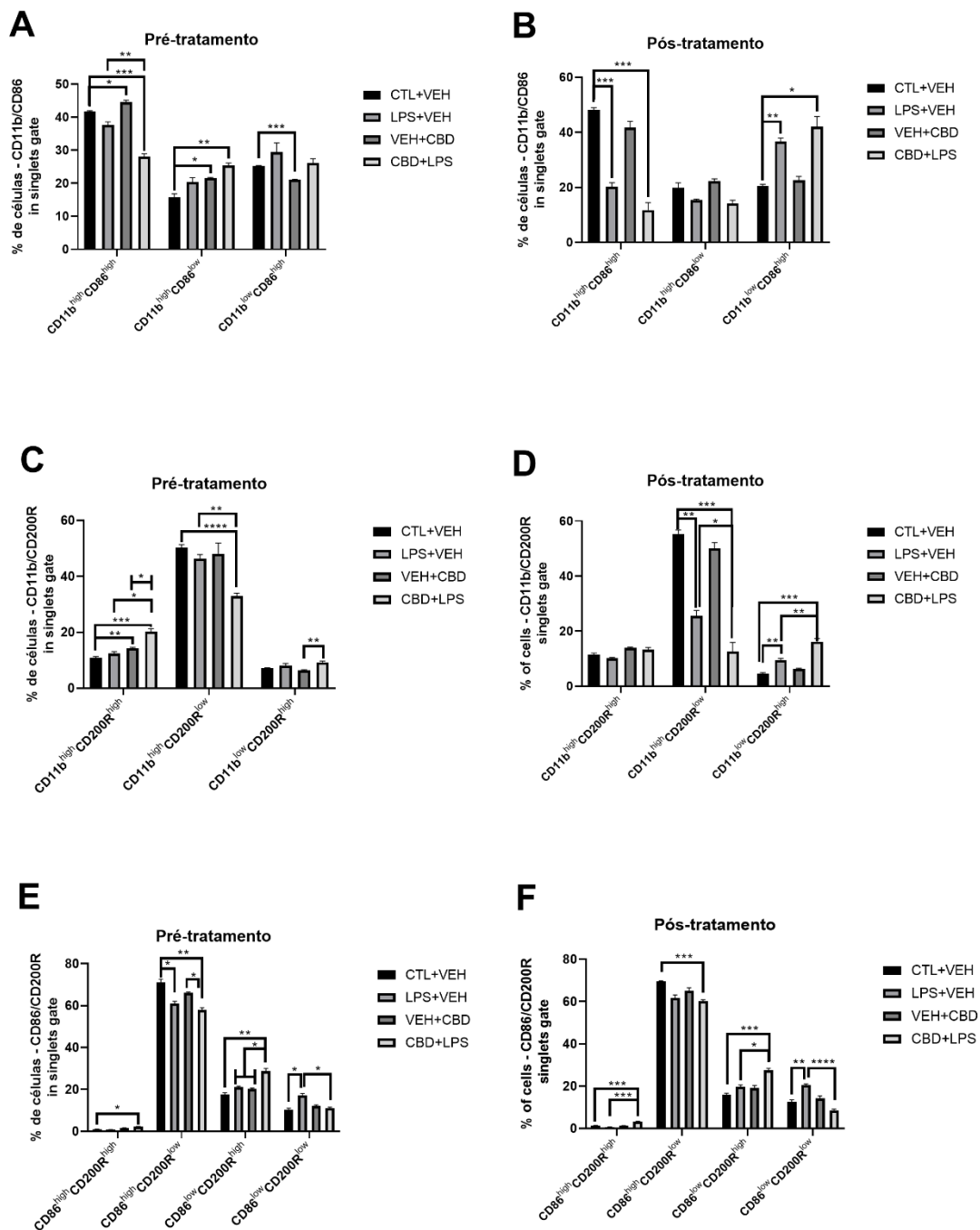


Figura 17. Efeito do CBD (10 μ M) nos protocolos de pré- (A,C,E) e pós-tratamento (B,D,F) nos quadrantes de células duplamente marcadas com receptores de superfície CD11b, CD86 e CD200R. (A-B) % de células no duplamente marcadas para CD11b/CD86 divididas em quadrantes conforme nível de expressão: CD11b^{alta}CD86^{alta}, CD11b^{alta}CD86^{baixa}, CD11b^{baixa}CD86^{alta}, (C-D) % de células no duplamente marcadas para CD11b/CD200R divididas em quadrantes conforme nível de expressão: CD11b^{alta}CD200R^{alta}, CD11b^{alta}CD200R^{baixa}, CD11b^{baixa}CD200R^{alta}; (E-F) % de células no duplamente marcadas para CD86/CD200R divididas em quadrantes conforme nível

de expressão: CD86^{alta}CD200R^{alta}, CD86^{alta}CD200R^{baixa}, CD86^{baixa}CD200R^{alta}, CD86^{baixa}CD200R^{baixa}. Os dados são expressos como média \pm EPM. N composto por três replicatas experimentais independentes com pelo menos 3 replicatas técnicas cada. Os dados na íntegra foram transformados para forma de \log_n e foram analisados com o teste ANOVA de uma-via seguido do teste de Tukey como teste de comparações múltiplas. ***P < 0,001 ****P < 0,0001). Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; VEH: veículo.

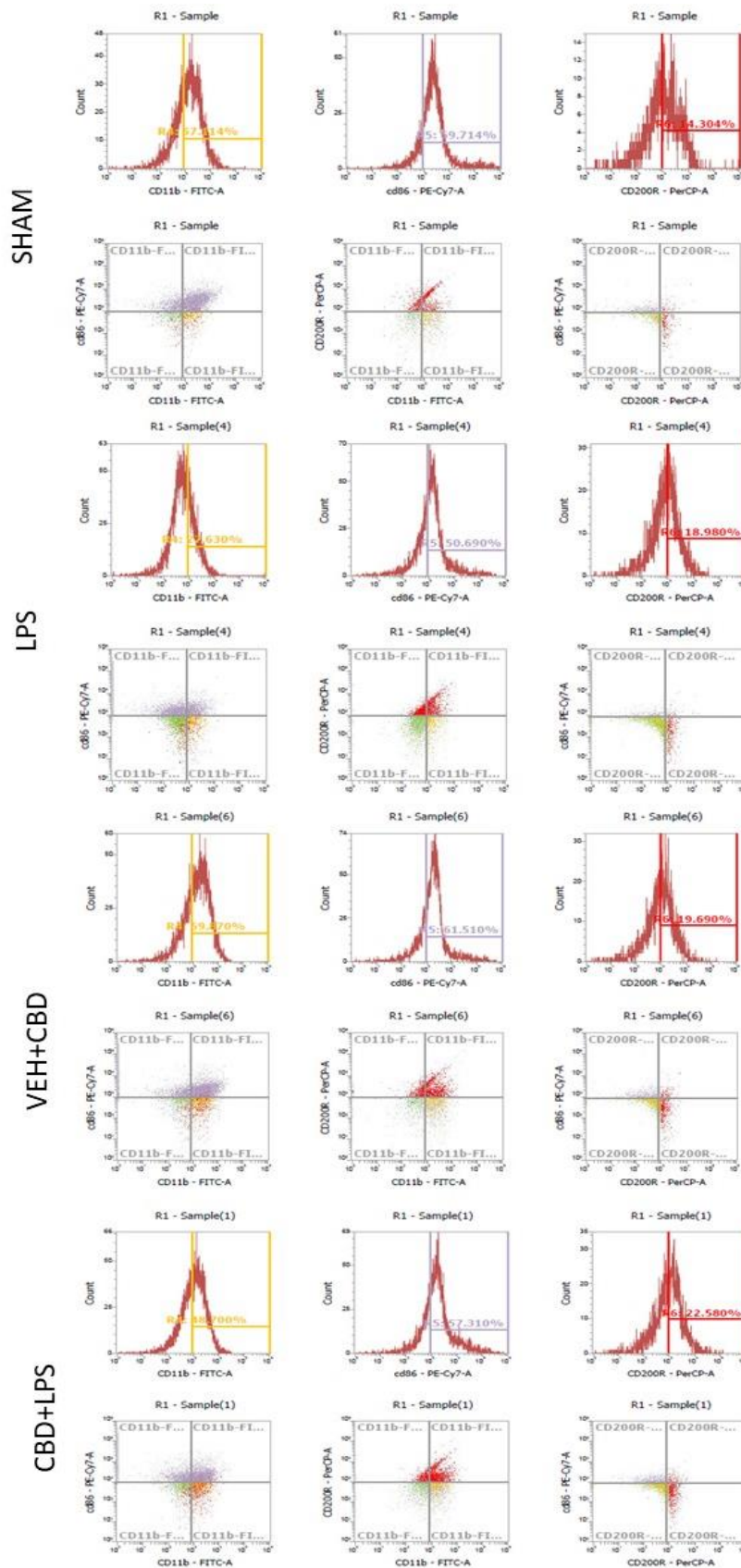


Figura 18. Representativos do ensaio de imunofenotipagem por citometria de fluxo do protocolo de pré-tratamento. Efeito do CBD (10 μ M) em células microgliciais desafiadas com LPS. Gráficos de histograma para intensidade média de fluorescência (MFI) dos

canais verde (FITC) e vermelho claro (PE-Cy7) e vermelho escuro (PerCP) representados em escala log com seleção em feixe de células positivas ($MFI > 10^3$). Abaixo, gráficos de dot plot representado em escala log para diferentes combinações dos marcadores (CD11b, CD86 e CD200R) e seleção de *gates* em quadrantes para as células com alta e baixa expressão de cada marcador. Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; VEH: veículo.

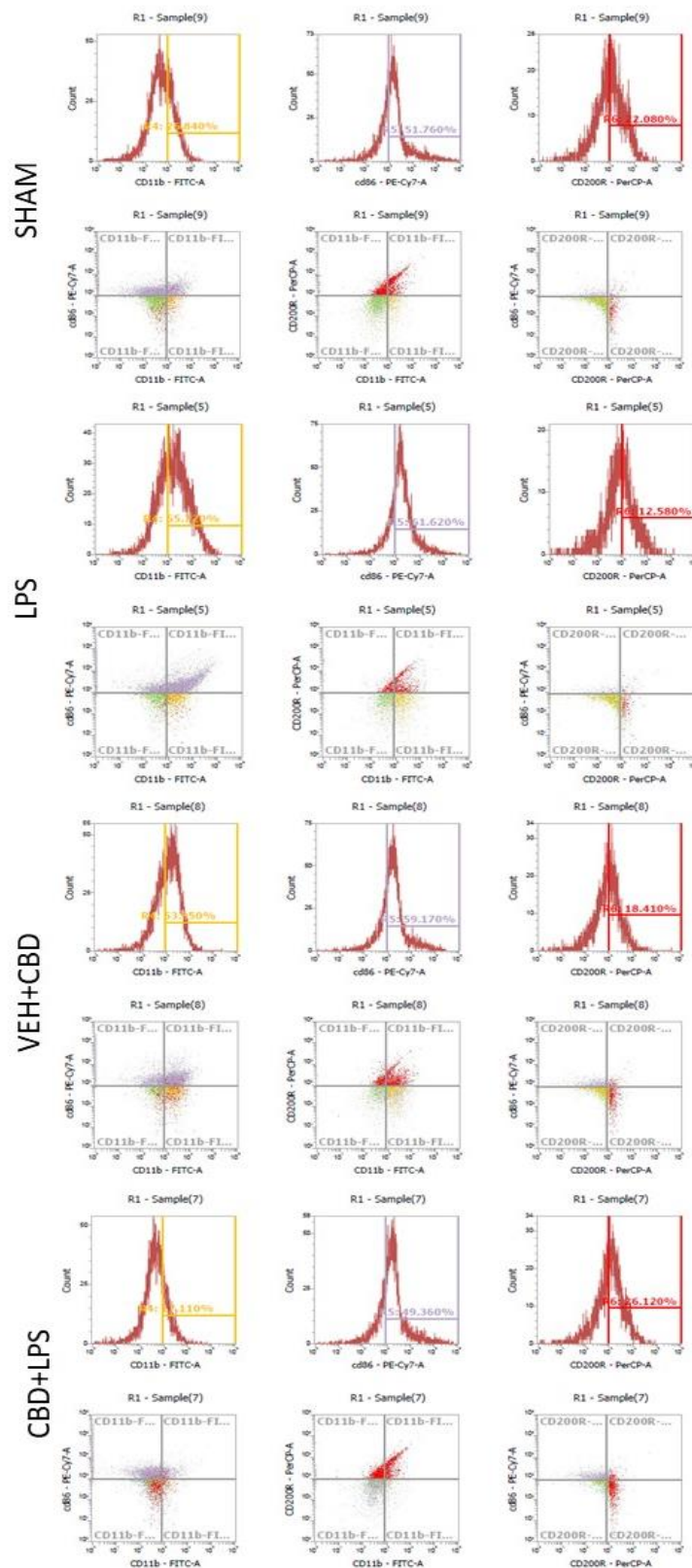


Figura 19. Representativos do ensaio de imunofenotipagem por citometria de fluxo do protocolo de pós-tratamento. Efeito do CBD (10 μ M) em células microgliciais desafiadas com LPS. Gráficos de histograma para intensidade média de fluorescência (MFI) dos canais verde (FITC) e vermelho claro (PE-Cy7) e vermelho escuro (PerCP) representados em escala log com seleção em feixe de células positivas (MFI > 10³). Abaixo, gráficos de

dot plot representado em escala log para diferentes combinações dos marcadores (CD11b, CD86 e CD200R) e seleção de *gates* em quadrantes para as células com alta e baixa expressão de cada marcador. Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; VEH: veículo.

5.10. Efeito do CBD e combinação com HCQ nos níveis de EROS intracelulares

Protocolo de Pré-tratamento

Inicialmente no ensaio de colorimétrico de NBT, como esperado o tratamento com PMA, como controle pro-oxidativo positivo para células mieloides, induziu aumento importante da presença de EROS, indicado pela % em relação ao CTL (Kruskal-Wallis: 80,15; P=0.0164). Adicionalmente, apenas uma redução significativa do % de EROS intracelulares foi observado no grupo LPS+HCQ (Kruskal-Wallis: 9,23; P=0.0001) em relação ao grupo LPS. No ensaio de fluorescência por DCFDA, semelhantemente, o tratamento com H₂O₂, como controle positivo pro-oxidativo nesse ensaio induziu aumento significativo da presença de EROS intracelulares (expressão relativa) em relação ao grupo CTL (Kruskal-Wallis: 16,86; P=0.0348) (Fig.20 A-C).

Protocolo de Pós-tratamento

No ensaio de colorimétrico de NBT, como esperado o tratamento com PMA, induziu um aumento significativo na presença de EROS intracelulares em relação ao grupo CTL (Kruskal-Wallis: 47,87; P=0.0241). Entretanto, nenhuma diferença significativa adicional foi observada entre os grupos comparados. Por outro lado, no ensaio de fluorescência por DCFDA, não apenas aumento significativo da presença de EROS intracelulares foi evidente com tratamento com H₂O₂, como controle positivo pro-oxidativo, em relação ao grupo CTL (Kruskal-Wallis: 28,05; P=0.030). Também, tendência de redução não-significativa da presença de EROS intracelulares foi observada nos grupos LPS+CBD e CTL+CBD em relação ao grupo LPS (Fig.20 B-D).

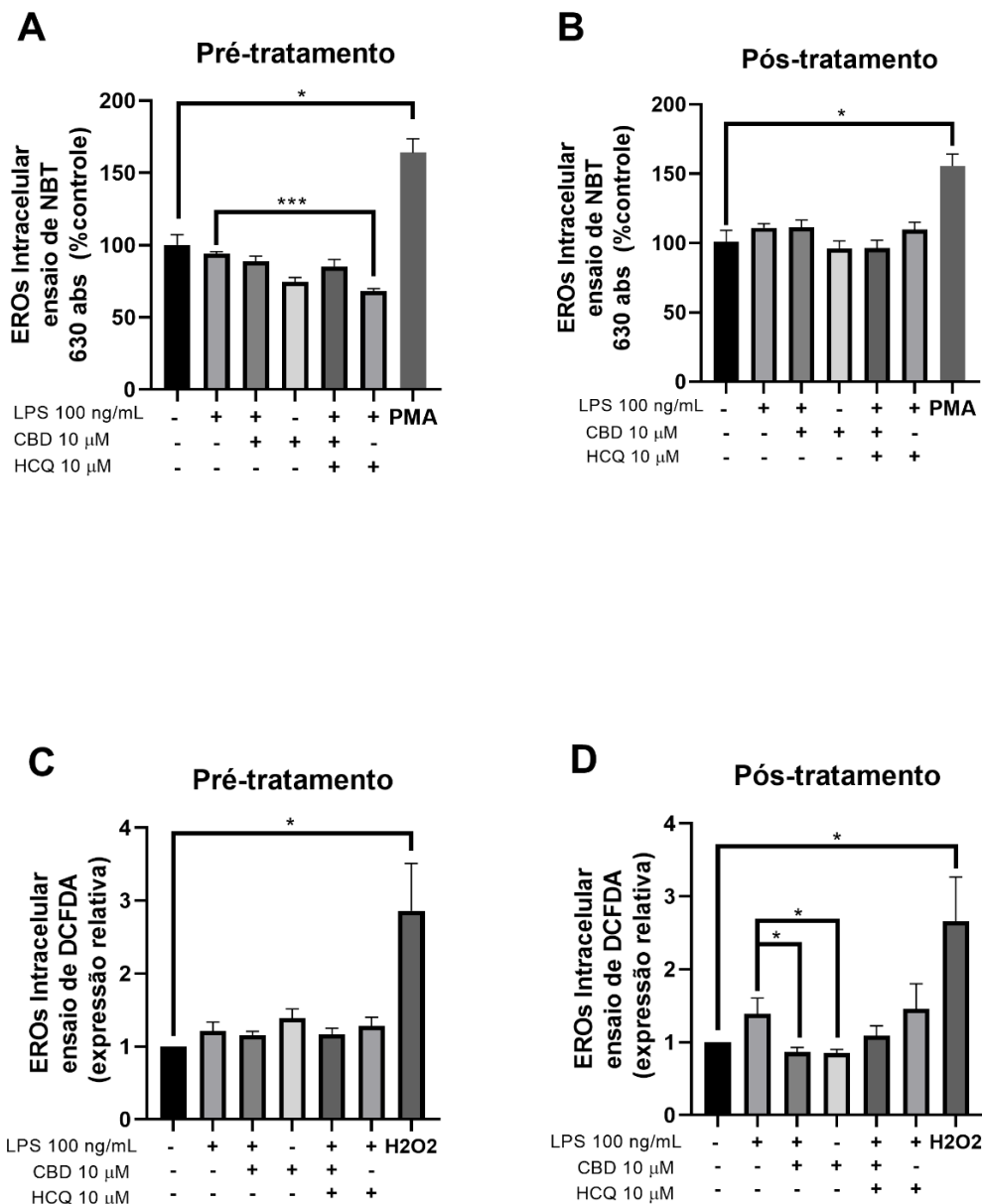


Figura 20. Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) nos protocolos de pré- (A,C) e pós-tratamento (B,D) em células microgлияis HMC3 nos ensaios de formação de EROS intracelulares por NBT e por DCFDA. (A-B) % de absorvância em relação ao controle (100%) no ensaio de formação de EROS colorimétrico de NBT. PMA usado como controle positivo pró-oxidante; (C-D) fluorescência relativa em relação ao controle (normalizado = 1) no ensaio de formação de EROS fluorescente de DCFDA. H₂O₂ usado como controle positivo pró-oxidante. Os dados são expressos como média \pm EPM. N composto por três replicatas experimentais independentes com pelo menos 3 replicatas técnicas cada. Os dados foram analisados com o teste ANOVA de uma-via seguido do teste de Tukey como teste de comparações múltiplas, e apresentados como média \pm EPM. ***P < 0,001 ****P < 0,0001) Abreviações: Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; HCQ: hidroxicloroquina; STV: *starvation*; PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; NBT: nitro-blue tetrazolium; DCFDA: 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate.

5.11. Efeito do CBD e combinação com HCQ na atividade fagocítica no ensaio de beads fluorescentes

Nesse ensaio, no protocolo de pré-tratamento, redução significativa da atividade fagocítica, indicada pela intensidade relativa de fluorescência em relação ao controle, foi evidente nos grupos CTL+CBD [F (uma via) = 5,801; P=0.0005], LPS+CBD [F (uma via) = 5,801; P=0.0002] e LPS+HCQ [F (uma via) = 5,801; P=0.0167]. Adicionalmente, tendência notável porém não-significativa de redução da atividade fagocítica foi observada no grupo LPS+CBD em relação ao grupo LPS, que apresentou tendência de aumento desse parâmetro em relação ao CTL (Fig.21A).

Em relação ao protocolo de pós-tratamento, apenas uma redução significativa da atividade fagocítica foi notável no grupo LPS+CBD+HCQ em relação ao grupo LPS+CBD (Fig.21B).

Em ambos os protocolos, o grupo STV apresentou tendência não-significativa de aumento da atividade fagocítica em relação ao grupo CTL.

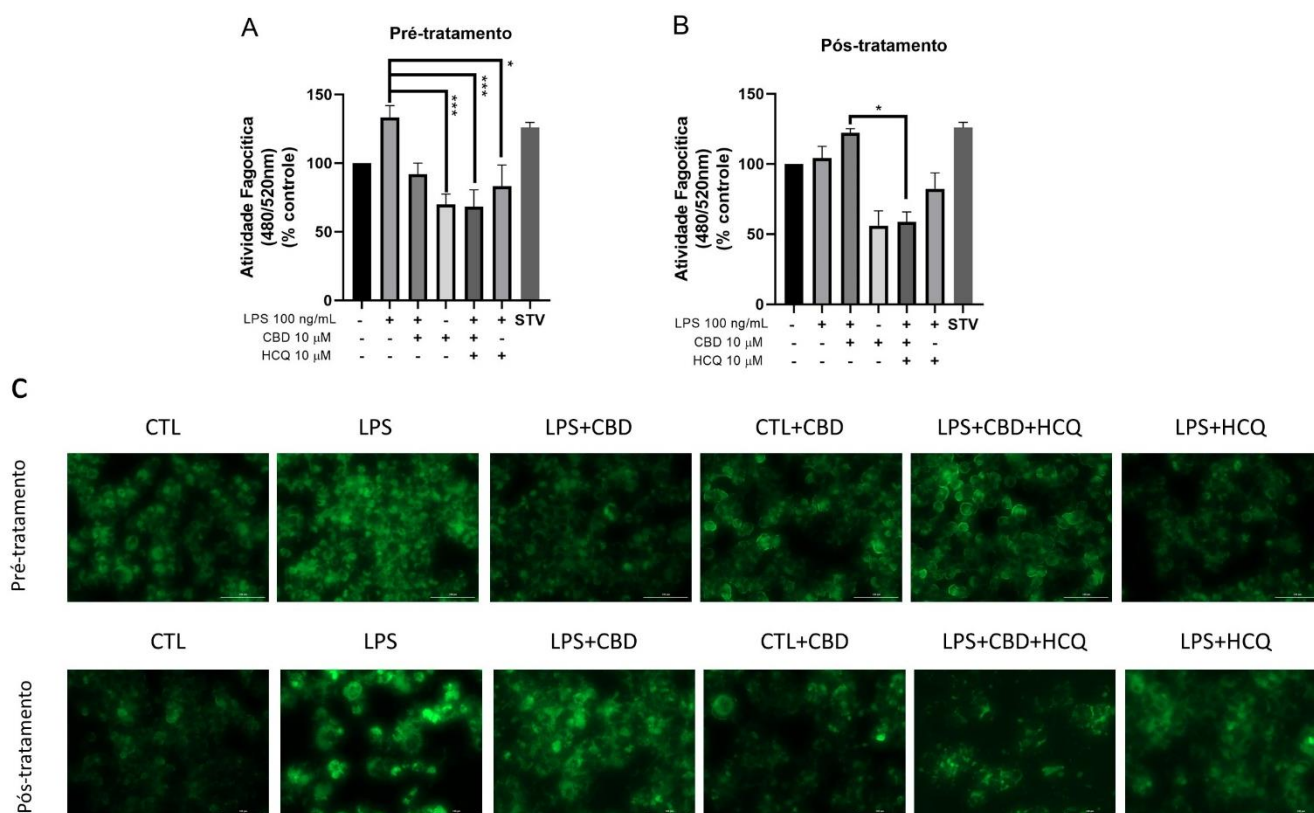


Figura 21. Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) nos protocolos de pré- (A) e pós-tratamento (B) em células microgliais HMC3 no ensaio de atividade fagocítica. (A-B) Atividade fagocítica representada pela intensidade media de

fluorescência (verde 480/520 nm) de beads-FITC conjugadas (Vybrant™ Phagocytosis Assay Kit, ThermoFisher, USA) normalizadas em relação ao controle (100%). (C) Fotomicrografias representativas do ensaio capturadas de campos randômicos, com pelo menos 6 imagens por condição experimental. Os dados são expressos como média \pm EPM. N composto por três replicatas experimentais independentes com pelo menos 3 replicatas técnicas cada. Os dados foram analisados com o teste ANOVA de uma-avia seguido do teste de Tukey como teste de comparações múltiplas, e apresentados como média \pm EPM. *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$) Abreviações: Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; HCQ: hidroxicloroquina; STV: *starvation*.

5.12. Efeito do CBD e combinação com HCQ na motilidade celular no ensaio de *Scratch*

Protocolo de Pré-tratamento

Nesse ensaio, em relação à contagem de células ocupando o espaço referente ao arranhão, redução significativa foi observada no grupo LPS (Kruskal-Wallis: 29,17; $P=0.0011$) e LPS+HCQ (Kruskal-Wallis: 29,17; $P=0.0010$) em relação ao grupo CTL. Por outro lado, aumento significativo desse parâmetro foi observado nos grupos CTL+CBD (Kruskal-Wallis: 29,17; $P=0.0339$) e LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 29,17; $P=0.0316$) em relação ao grupo LPS. Em relação ao % de área ocupada do arranhão por células migrantes, apenas uma tendência de aumento não-significativo foi observada no grupo LPS+CBD em relação ao grupo LPS (Fig.22).

Protocolo de Pós-tratamento

Em relação à contagem de células ocupando o espaço referente ao arranhão, redução significativa foi evidente no grupo LPS [$F(\text{one-way}) = 5,801$; $P=0.0013$] e LPS+CBD+HCQ [$F(\text{one-way}) = 5,801$; $P=0.0013$] em relação ao grupo CTL. Por outro lado, aumento significativo desse parâmetro foi identificado no grupo LPS+CBD [$F(\text{one-way}) = 5,801$; $P=0.0097$] em relação ao grupo LPS. Em relação ao % de área do arranhão ocupado por células migrantes, apenas um aumento significativo foi evidenciado no grupo LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 12,53; $P=0.0236$) em relação ao grupo LPS, enquanto redução significativa foi observada no grupo LPS+CBD+HCQ em relação ao grupo LPS+CBD (Kruskal-Wallis: 12,53; $P=0.0360$) (Fig.23).

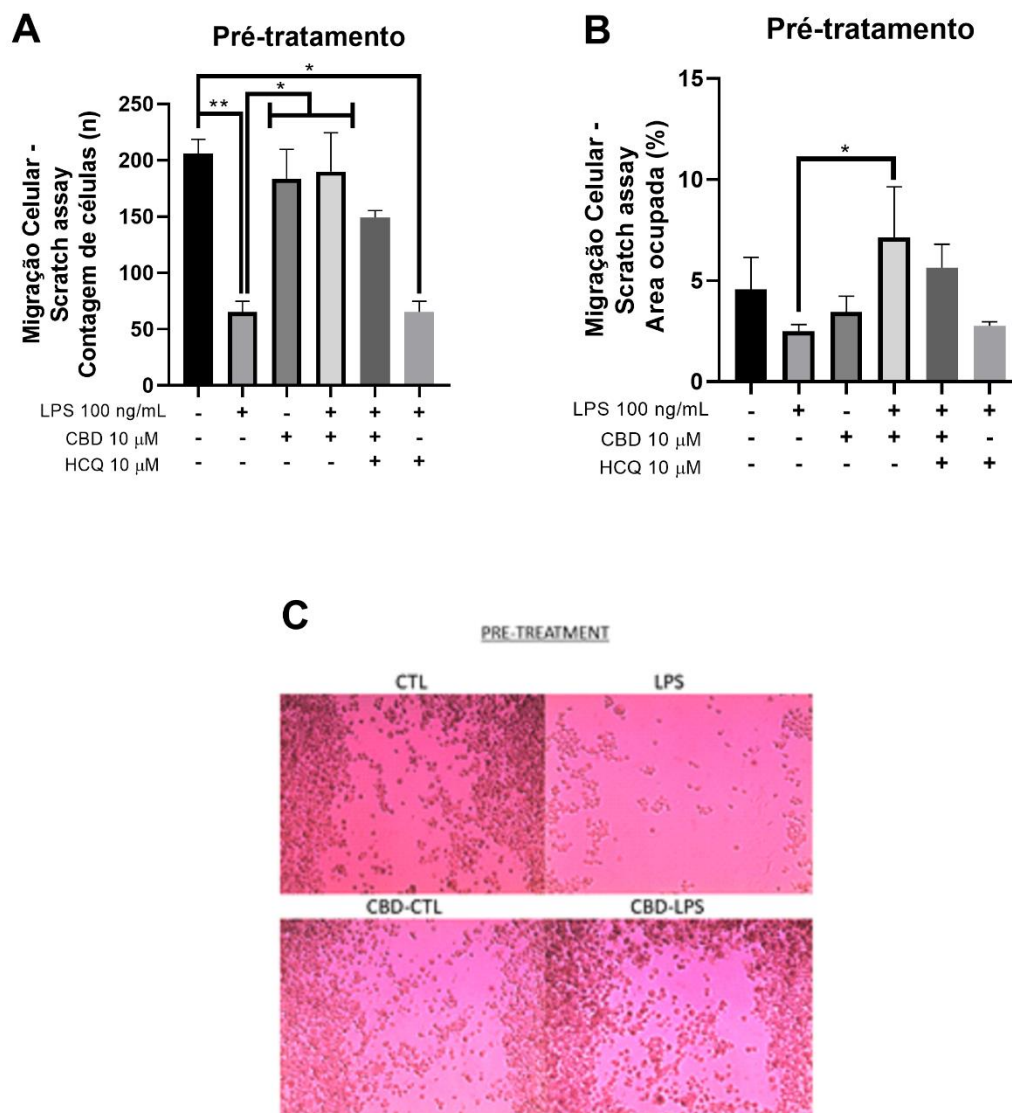


Figura 22. Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) no ensaio *scratch* de motilidade celular em células microgliciais HMC3 (protocolo de pré-tratamento). (A) Contagem de células (n) que ocuparam a área referente ao arranhão; (B) área do arranhão ocupada pelas células migrantes excluindo-se as bordas; (C) Fotomicrografias representativas do ensaio capturadas de campos randômicos, com pelo menos 6 imagens por condição experimental. Os dados são expressos como média \pm EPM. N composto por três replicatas experimentais independentes com pelo menos 3 replicatas técnicas cada. Os dados foram analisados com o teste ANOVA de uma-avia seguido do teste de Tukey como teste de comparações múltiplas, e apresentados como média \pm EPM. *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$) Abreviações: Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; HCQ: hidroxicloroquina.

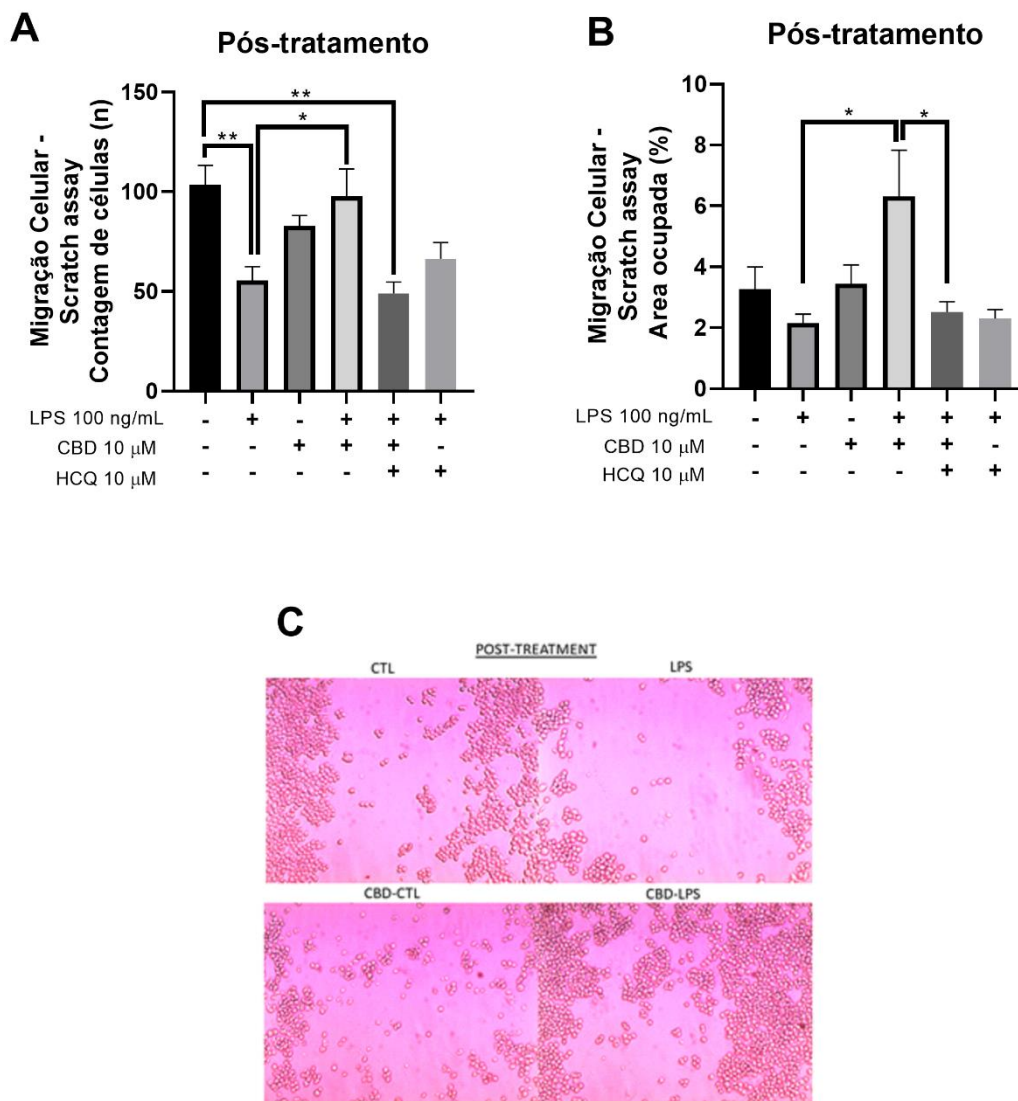


Figura 23. Efeito do CBD (10 μ M) sozinho ou combinado com HCQ (10 μ M) no ensaio *scratch* de motilidade celular em células microgliciais HMC3 (protocolo de pós-tratamento). (A) Contagem de células (n) que ocuparam a área referente ao arranhão; (B) área do arranhão ocupada pelas células migrantes excluindo-se as bordas; (C) Fotomicrografias representativas do ensaio capturadas de campos randômicos, com pelo menos 6 imagens por condição experimental. Os dados são expressos como média \pm EPM. N composto por três replicatas experimentais independentes com pelo menos 3 replicatas técnicas cada. Os dados foram analisados com o teste ANOVA de uma- via seguido do teste de Tukey como teste de comparações múltiplas, e apresentados como média \pm EPM. *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$) Abreviações: Abreviações: CBD: cannabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; HCQ: hidroxicloroquina.

5.13. Efeito do CBD na reversão do comportamento tipo-depressivo induzido por LPS e impacto do co-tratamento com HCQ

5.13.1. Teste do Campo Aberto

Nesse ensaio, no número de cruzamentos, os grupos LPS+CBD ($P = 0.0269$), LPS+CBD+HCQ ($P = 0.0022$) e LPS+HCQ ($P < 0.0001$) apresentou uma redução desse parâmetro em relação ao grupo CTL. Também, os grupos LPS+CBD+HCQ ($P = 0.0199$) e LPS+HCQ ($P = 0.0007$) apresentaram redução nesse parâmetro em relação ao grupo LPS. Em relação ao número de entradas no centro (n), os grupos tratados com HCQ, grupos LPS+CBD+HCQ ($P = 0.009$) e LPS+HCQ ($P = 0.004$), em comparação com o grupo CTL. Em relação ao tempo no centro (em segundos), nenhuma diferença foi observada entre os grupos experimentais (Fig. 24, A-C).

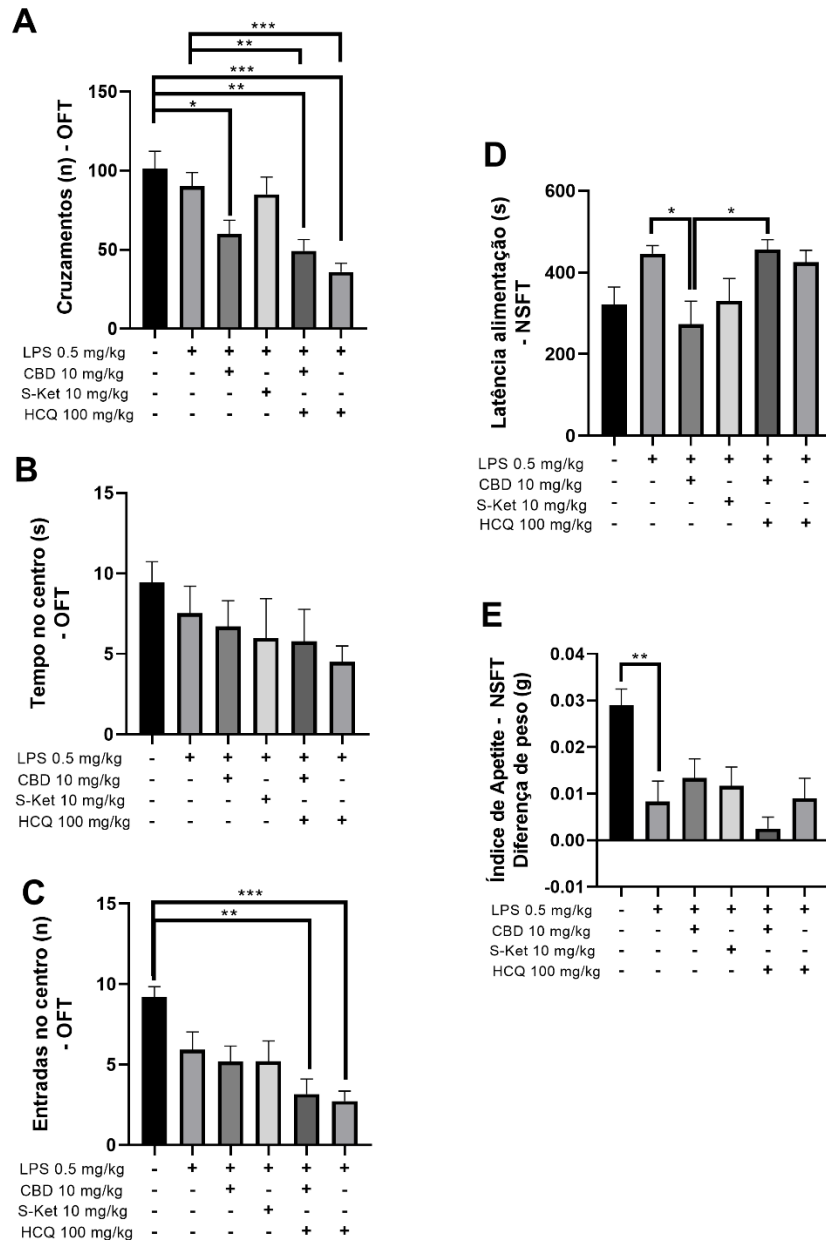


Figura 24. Efeito do CBD nos animais expostos ao modelo induzido por LPS e co-tratados com HCQ no teste do campo aberto e NSFT. No teste do campo aberto (ou *open-field test*, OFT), os parâmetros avaliados foram (A) número de cruzamentos (n), (B) tempo no centro (em s), (C) entradas no centro (n). No teste da alimentação suprimida pela novidade (ou *novel suppressed feeding test*, NSFT), os parâmetros avaliados foram: (D) latência para alimentação (em s), e (E) índice de apetite (em mg). Os dados são expressos como média \pm EPM. N = 8-12 animais/grupo. Os dados foram analisados com o teste ANOVA de uma-*via* seguido do teste de Tukey como teste de comparações múltiplas, e apresentados como média \pm EPM. ***P < 0,001 ****P < 0,0001). Abreviações: CBD: Canabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; S-KET: S-cetamina; HCQ: hidroxicloiquina.

5.13.2. Teste da Alimentação Suprimida pela Novidade

Em relação ao tempo de latência, o grupo LPS+CBD apresentou uma redução significativa em relação ao grupo LPS ($P = 0.0338$). Ademais, o grupo LPS+CBD+HCQ apresentou um aumento significativo desse parâmetro em relação ao grupo LPS+CBD ($P = 0.0429$). Em relação a diferença de peso do pellet de comida (índice de apetite), todos os grupos tratados com LPS: LPS ($P = 0.0060$), LPS+CBD+HCQ ($P = 0.0335$) e LPS+HCQ ($P = 0.0136$), apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo CTL (Fig.24, D-E).

5.13.3. Teste do Splash

Em relação ao tempo de latência para início do comportamento de *grooming*, uma redução significativa foi observada no grupo LPS+CBD em relação ao grupo LPS ($P = 0.0374$). Além disso, um aumento significativo desse parâmetro foi observado no grupo LPS+CBD+HCQ em relação ao grupo LPS+CBD ($P = 0.0243$). Em relação à duração do comportamento de *grooming*, redução significativa foi observada no grupo LPS em relação ao grupo CTL ($P < 0.0001$). Além disso, um aumento significativo foi observado no grupo LPS+CBD em relação ao grupo LPS ($P = 0.0430$). Os grupos tratados com HCQ, LPS+CBD+HCQ ($P < 0.001$) e LPS+HCQ ($P = 0.0048$), também apresentaram uma redução significativa desse parâmetro em relação ao grupo CTL. Por fim, redução significativa do tempo de *grooming* foi observado comparando o grupo LPS+CBD+HCQ com o grupo LPS+CBD ($P = 0.0307$). Em relação ao número de *groomings*, de forma semelhante, o grupo LPS apresentou redução significativa em relação ao grupo CTL ($P = 0.0191$). Além disso, o grupo LPS+CBD apresentou uma tendência de aumento em relação ao grupo LPS ($P = 0.0886$). Os grupos tratados com HCQ, LPS+CBD+HCQ ($P = 0.0010$) e LPS+HCQ ($P = 0.0023$), também apresentaram uma redução significativa desse parâmetro em relação ao grupo CTL. Por fim, uma redução do número de *groomings* foi observada no grupo LPS+CBD+HCQ em relação ao grupo LPS+CBD ($P = 0.0059$) (Fig.25 A-C).

5.13.4. *Teste do Nado Forçado*

Em relação ao tempo total de imobilidade (em s), o grupo LPS apresentou aumento significativo em relação ao grupo CTL ($P = 0.0017$). Os grupos tratados com HCQ LPS+CBD+HCQ ($P = 0.0267$) e LPS+HCQ ($P = 0.0011$), também apresentaram um aumento significativo desse parâmetro em relação ao grupo CTL. Em relação ao tempo de comportamento ativo (em s), o grupo tratado com LPS apresentou redução significativa desse parâmetro em relação ao grupo CTL ($P < 0.0001$). Por fim, redução significativa também foi evidenciada nos grupos tratados com LPS+CBD+HCQ ($P < 0.0001$) e LPS+HCQ ($P = 0.0056$) em relação ao grupo CTL. Tendência de aumento desse comportamento foi observada no grupo LPS+S-KET em relação ao grupo LPS ($P = 0.2861$) (Fig.25, D-E).

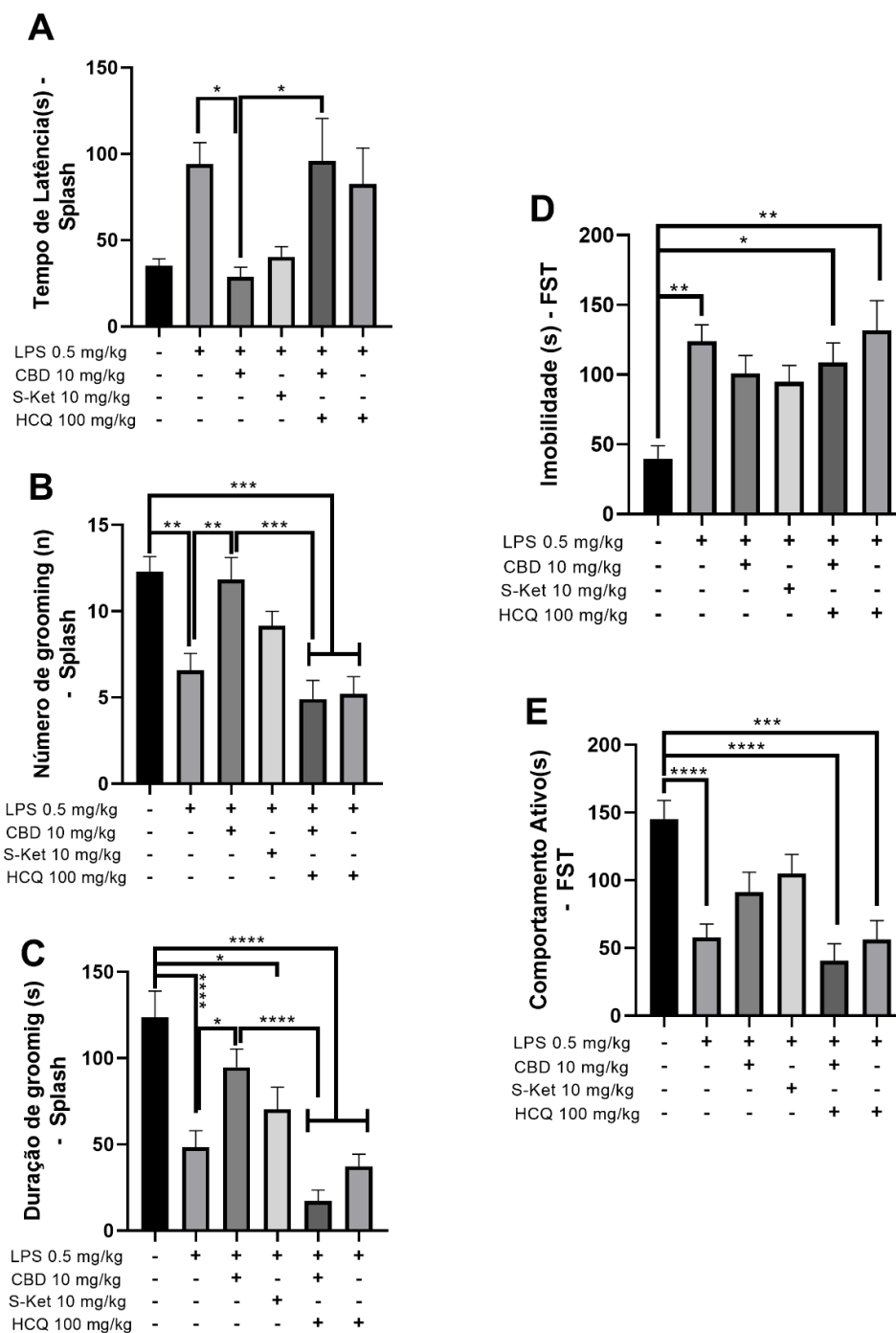


Figura 25. Efeito do CBD nos animais expostos ao modelo induzido por LPS e co-tratados com HCQ no teste do splash e no teste do FST. No teste do splash, os parâmetros avaliados foram (A) tempo de latência (em s); (B) número de *groomings* (n), (C) tempo total de *grooming* (em s). No teste do nado forçado (ou *forced swimming test*, FST), os parâmetros avaliados foram: (D) tempo total de imobilidade (em s), e (E) tempo total de comportamento ativo (em s). Os dados são expressos como média \pm EPM. N = 8-12 animais/grupo. Os dados foram analisados com o teste ANOVA de uma-via seguido do teste de Tukey como teste de comparações múltiplas, e apresentados como média \pm EPM. *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$). Abreviações: CBD: Canabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; S-KET: S-cetamina; HCQ: hidroxicloroquina.

5.14. Efeito do CBD e do co-tratamento com HCQ na expressão das isoformas LC3B-I e LC3B-II nos homogenatos cerebrais

Em relação à expressão relativa de LC3B-I, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos experimentais nas duas áreas avaliadas. Entretanto, uma tendência de aumento foi observada no grupo LPS+CBD em relação ao grupo LPS no PFC (DM: -4.00, $P > 0.0999$). No HC, de forma semelhante, tendência de aumento foi observada no grupo LPS+S-KET em relação ao grupo LPS (DM: -0.5214, $P = 0.7662$). (Fig. 26 A e D). Em relação à expressão relativa de LC3B-II, no PFC, apenas um aumento significativo no grupo LPS+CBD em relação ao grupo LPS ($P = 0.0500$), enquanto que, no HC, aumento significativo da expressão dessa isoforma foi apenas observado no grupo LPS+S-KET em relação ao grupo LPS ($P = 0.0411$) (Fig. 26, B e E). Em relação a taxa LC3B-II/LC3B-I, nenhuma diferença significativa foi evidenciada entre os grupos experimentais em quaisquer das áreas cerebrais avaliadas (Fig. 26 C e F).

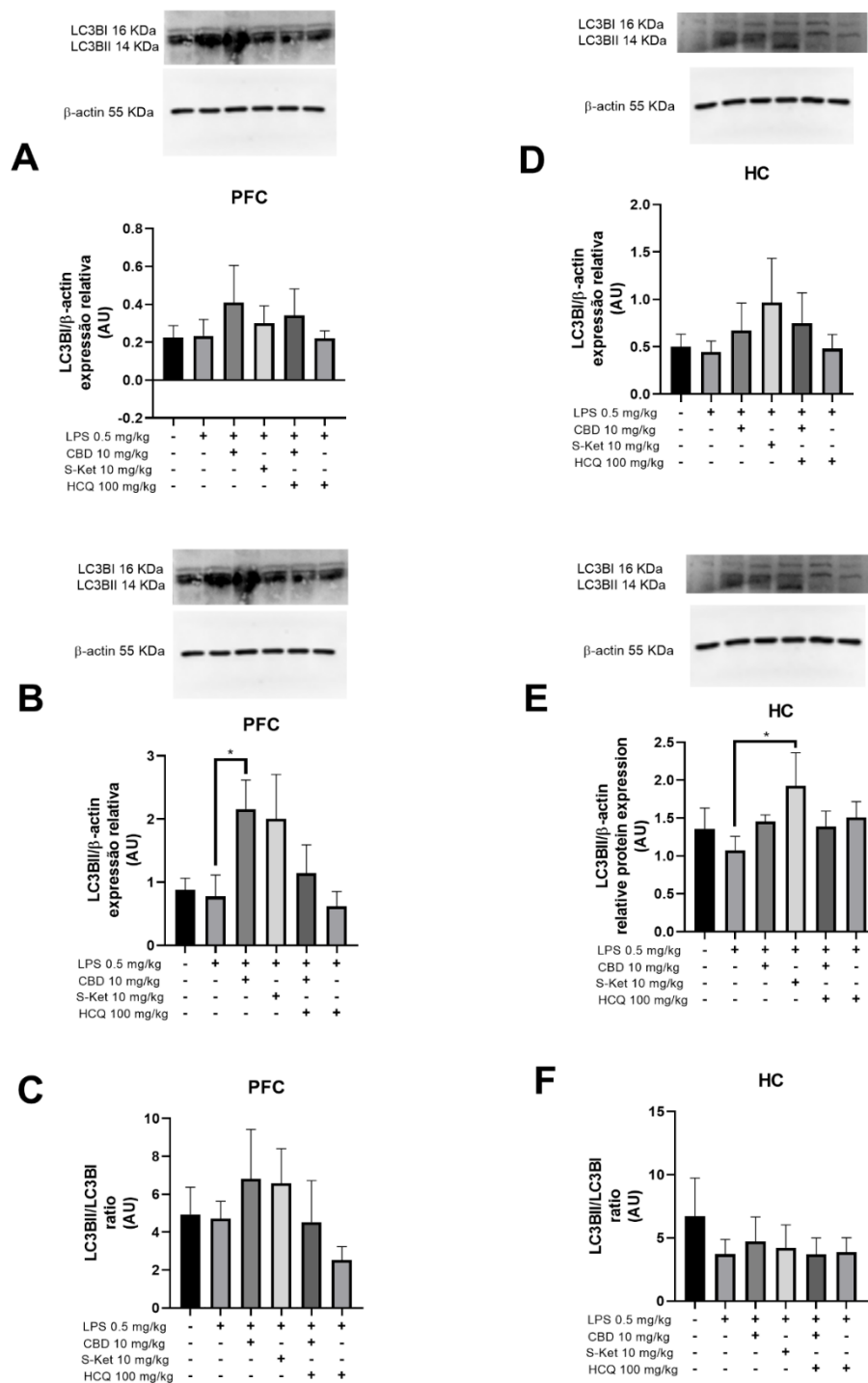


Figura 26. Efeito do CBD e co-tratamento com HCQ na expressão proteica das isoformas LC3B-I e LC3B-II e relação entre elas no cérebro de animais expostos ao LPS. (A e D) Expressão relativa de LC3B-I/ β -actina no PFC e HC respectivamente (B e E). Expressão relativa de LC3B-II/ β -actina no PFC e HC respectivamente. (C e F) taxa LC3B-II/LC3B-I no PFC e HC. Os dados são expressos como média \pm EPM. N = 5-6 animais/grupo. Os dados foram analisados com o teste ANOVA de uma-via seguido do teste de Tukey como teste de comparações múltiplas, e apresentados como média \pm EPM. ***P < 0,001 ****P < 0,0001). Abreviações: CBD: Canabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; S-KET: S-cetamina; HCQ: hidroxicloroquina; HC: hipocampo; PFC: pré-frontal córtex.

5.15. Efeito do CBD e do co-tratamento com HCQ na expressão de citocinas pró-inflamatórias nos homogenatos cerebrais.

Em relação ao PFC, nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis de TNF α entre os grupos experimentais. Em relação aos níveis de IL-1 β , de forma semelhante, nenhuma diferença significativa foi evidenciada entre os grupos experimentais nessa área cerebral (Fig.27 A-C). Em relação ao HC, aumento significativo dos níveis de TNF α foram observados nos grupos LPS (P = 0.0359), LPS+CBD+HCQ (P = 0.0145) e LPS+HCQ (P = 0.0343) em relação ao grupo CTL. Ademais, redução significativa foi observado dessa citocina foi observado no grupo LPS+S-KET em relação ao grupo LPS+HCQ (P=0.0460). Redução significativa foi também notável comparando o grupo LPS+S-KET com o grupo LPS (P = 0.0199). Em relação aos níveis de IL-1 β , redução significativa foi observada no grupo LPS+S-KET em relação ao grupo LPS (P = 0.0368). Adicionalmente, tendência de aumento não-significativo foi observada no grupo LPS em relação ao grupo CTL (DM: 14.25; P = 0.0697) (Fig.27 B-D).

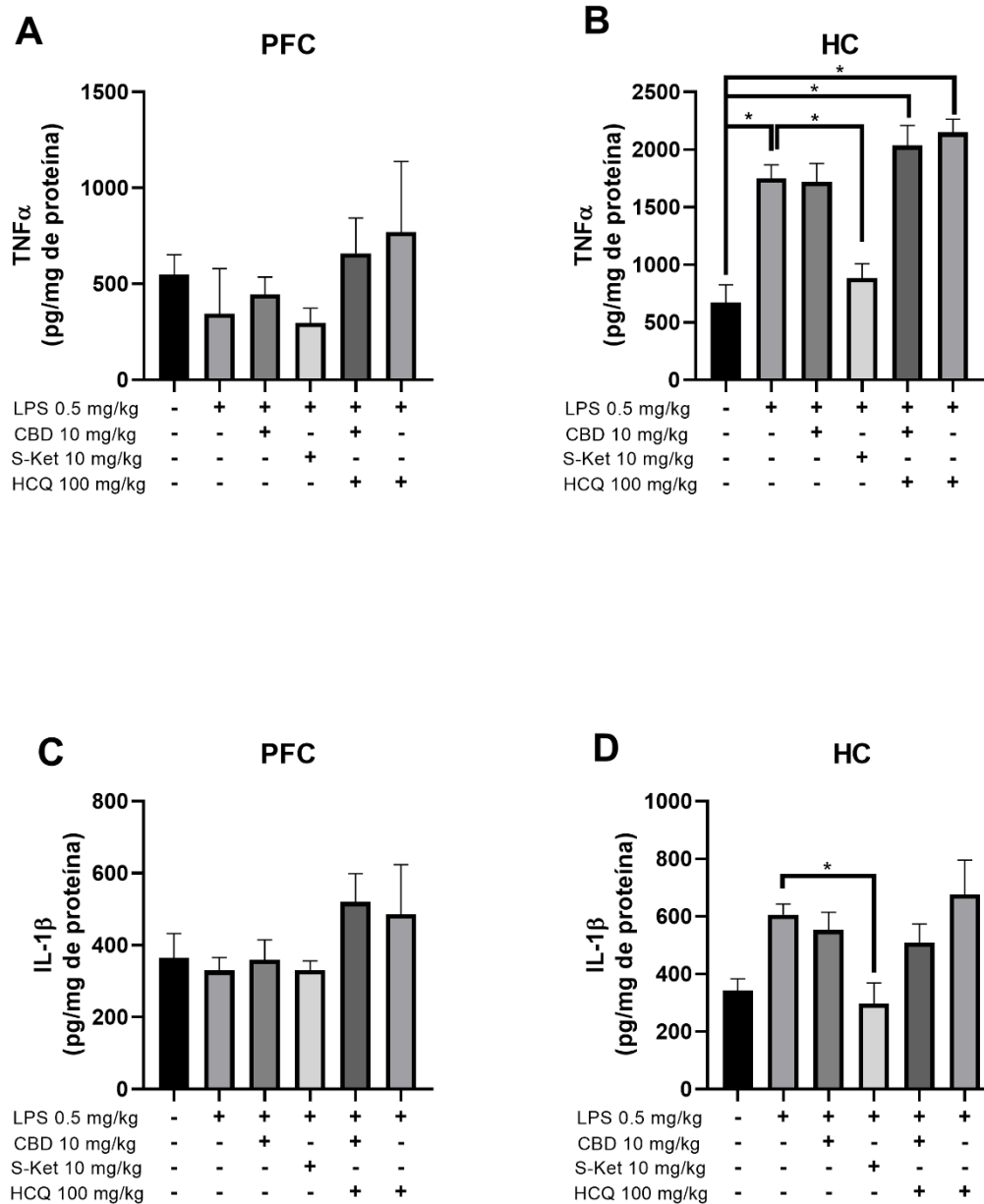


Figura 27. Efeito do CBD e co-tratamento com HCQ na expressão proteica das citocinas pró-inflamatórias TNF α e IL-1 β no PFC e HC de animais expostos ao LPS. (A-B) representam as concentrações de TNF α no PFC e HC respectivamente; (C-D) representam as concentrações de IL-1 β no PFC e HC respectivamente. Os dados são expressos como média \pm EPM. N = 5-6 animais/grupo. Os dados foram analisados com o teste ANOVA de uma-via seguido do teste de Tukey como teste de comparações múltiplas, e apresentados como média \pm EPM. ***P < 0,001 ****P < 0,0001). Abreviações: CBD: Canabidiol; LPS: lipopolissacarídeo; S-KET: S-cetamina; HCQ: hidroxiclороquina; HC: hipocampo; PFC: pré-frontal córtex.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, nós demonstramos pela primeira vez a habilidade do CBD de induzir em células microgлия humanas, aumento do fluxo autofágico sobretudo indicado pelo aumento da formação de vesículas ácidas e aumento da degradação do receptor de cargo autofágico p62/SQSTM1. Ademais, o CBD foi capaz de reverter o estado pró-inflamatório induzido em micrógлия humanas pelo estímulo com LPS, e direcionar a polarização microglial em direção a um fenótipo anti-inflamatório, marcado pela expressão aumentada de marcadores de membrana, como CD200R, e de mediadores secretados, como IL-4, TGF- β , BDNF e expressão e atividade da enzima arginase 1. Nós ainda demonstramos a dependência da autofagia para esses efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios do CBD em micrógлия, uma vez que a inibição da acidificação dos lisossomas pelo hidroxiclороquina, bloqueou sobretudo a indução da expressão de mediadores anti-inflamatórios, como IL-4, TGF- β e a atividade da arginase 1. Ademais, o CBD foi capaz de aumentar tanto a migração celular e a atividade fagocítica dessas células frente ao desafio com LPS, o que foi também bloqueado pela inibição da autofagia pela hidroxiclороquina.

Originalmente descrita como uma resposta induzida pela privação de nutrientes e restrição calórica, nos últimos anos tem sido crescentemente aceito que a autofagia é um processo ubíquo e basal fundamental para a promoção de energia e homeostasia de proteínas e organelas intracelulares (DERETIC; SAITOH; AKIRA, 2013). No SNC, classicamente, a autofagia tem sido principalmente estudada em neurônios, considerando a natureza pós-mitótica dessas células, e a importância nos mecanismos de degradação e reciclagem de proteínas e organelas defeituosas para manter a sobrevivência neuronal. Como mencionado anteriormente, a deleção específica de proteínas ATGs, como ATG-7 e ATG-5, de diferentes linhagens neuronais induz a formação de inclusões citoplasmáticas e neurodegeneração em ausência de outros estímulos patológicos (STAVOE; HOLZBAUR, 2019). Adicionalmente, comprometimento do fluxo autofágico e da degradação mediada pelos lisossomas tem sido demonstrados como elementos comuns em diversas doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington (GUO et al., 2018; LU; ZHANG; YANG, 2022; PLAZA-ZABALA; SIERRA-TORRE; SIERRA, 2017), e mais recentemente também no contexto de doenças neuropsiquiátricas, como depressão (TANG et al., 2021).

Evidências recentes têm apontado que a autofagia controla a função de diversas outras células do SNC, além de neurônios, em especial micróglia, as células imunes residentes do cérebro. De fato, estudos demonstraram que a autofagia é um importante regular de vários processos fisiológicos nessas células, como metabolismo, fagocitose, degradação de aglomerados proteicos intra- e extracelulares, poda sináptica e respostas imunes a agentes endógenos e exógenos (JÜLG; STROHM; BEHREND, 2021; SU et al., 2016). Nesse sentido, a autofagia em micróglia tem despontado como um controlador fundamental da resposta imune inata no cérebro e tem sido diretamente envolvido no desenvolvimento e progressão de diversas doenças do SNC.

Entretanto, o monitoramento experimental do fluxo autofágico é complexo e com várias dificuldades metodológicas, uma vez que sua realização depende da formação e identificação de estruturas vesiculares transitórias, como os autofagossomos e autofagolisossomos, os quais por fim são completamente degradados via maquinaria lisossomal. Com isso, apenas a avaliação do número e ou morfometria de vesículas autofágicas em um único ponto temporal não é uma medida precisa do fluxo autofágico (KLIONSKY et al., 2021). Em adição a isso, o uso de ferramentas genéticas ou farmacológicas, que podem bloquear diferentes etapas do fluxo autofágico ou degradação lisossômica, e a medição do acúmulo de proteínas ATGs envolvidas nos estágios iniciais da autofagia ou de receptores de autofagia como p62/SQSTM1 pode fornecer evidências importantes do status do fluxo autofágico. Nesse ínterim, procedimentos e orientações padronizadas para a avaliação do fluxo autofágico tem sido publicadas desde 2008 e recentemente atualizadas em 2021 (KLIONSKY et al., 2021). Estas diretrizes, preparadas pela comunidade internacional de pesquisa em autofagia, recomendam fortemente o uso de técnicas experimentais combinadas, como uso de inibidores farmacológicos, uso de proteínas fluorescentes e métodos de biologia molecular para medir proteínas, bem como a expressão gênica de ATGs e outras proteínas envolvidas no fluxo global autofágico (KLIONSKY et al., 2021).

Uma limitação frequentemente apontada do uso de ferramentas farmacológicas que afetam o fluxo autofágico, como 3-MA (inibidor de fosfatidil-inositol-3 quinase (PI3K), que previne a formação de autofagossomos), bafilomicina-A1 (inibidor vacuolar-ATPase; aumenta o pH lisossômico bloqueando a degradação do cargo autofágico) e hidroxicloroquina (que inibe a acidificação de lisossomos), é a presença de alvos moleculares inespecíficos, geralmente dependentes da dose, tempo de tratamento e tipo

celular. Na tentativa de superar essas limitações, algumas abordagens genéticas, tem sido propostas, como o silenciamento genético de proteínas autofágicas essenciais, como as ATGs (KLIONSKY et al., 2021) No entanto, essas proteínas também tem papéis de destaques em outros processos celulares, além da autofagia. Por exemplo, a proteína ATG-5 transloca-se para a membrana externa mitocôndrial e participa da indução da apoptose (YOUSEFI et al., 2006). Da mesma forma, diversas ATGs, em células fagocíticas, como micróglia, incluindo ATG-5, BECLIN-1 (ATG-6) e ATG-7 estão envolvidos na lipidação de LC3 (ATG-8) em fagossomos e outras vesículas macroendocíticas (FLOREY; OVERHOLTZER, 2012). Finalmente, o uso de modelos animais *in vivo* para estudo da autofagia também tem encontrado limitações, uma vez que diversos *knockout* constitutivos para ATGs apresentam grandes distorções do desenvolvimento embrionário e alta letalidade pós-natal (KLIONSKY et al., 2021). No entanto, o desenvolvimento de *knockout* condicionais específicos de tecidos ou células em roedores podem significativamente avançar nossa compreensão do papel da autofagia em processos fisiológicos e patológicos no SNC(WEN et al., 2022) . Portanto, a recomendação atual é o uso de diferentes abordagens combinadas e o esclarecimento das limitações inerentes de cada método.

Nesse estudo, pela primeira vez, nós determinamos o efeito do CBD no fluxo autofágico e expressão gênica de diversas ATGs em células microgliais humanas desafiadas com o estímulo pró-inflamatório LPS. De fato, o tratamento com CBD, sobretudo em células já desafiadas e com fenótipo pró-inflamatório desenvolvido, no protocolo de reversão, o tratamento com CBD foi capaz de significativamente aumentar a formação de vesículas ácidas, bem como a degradação do receptor de autofagia p62/SQSTM1, indicando claramente um aumento da eficiência lisossomal de degradação do cargo autofágico. Em relação aos estágios iniciais da autofagia, mesmo utilizando inibidores da acidificação lisossomal, como o cloreto de amônio, para induzir acúmulo de LC3B e suas isoformas, o tratamento com CBD apenas demonstrou uma tendência de aumento da taxa de conversão de LC3B-I em LC3B-II, indicativo da formação de autofagossomos maduros (TANIDA; UENO; KOMINAMI, 2008). Além disso, é interessante destacar que o tratamento com CBD em ambos os protocolos de prevenção e reversão apresentou efeito aumentando a expressão gênica de ATGs, de forma similar ao estímulo pró-autofágico da privação de soro. Notavelmente, os níveis de mRNA para ATG5, BECLIN-1 e p62 foram aumentados no protocolo de prevenção, e de ATG12 e

p62 no protocolo de reversão após tratamento com CBD. Considerando conjuntamente, é notório que o CBD atuou sobretudo nas últimas etapas do fluxo autofágico aumentando a eficiência de degradação lisossomal e do cargo autofágico, em comparação com as etapas iniciais da autofagia. Ademais, o CBD parece ter um efeito intrínseco de aumentar a expressão gênica de ATGs, em especial os níveis de mRNA p62, o que pode estar relacionado a mecanismos transcricionais que acontecem de forma independente nos dois protocolos de tratamento dos efeitos rápidos e não-genômicos no fluxo autofágico. Porém, não é possível descartar uma interação entre esses mecanismos para mediar os efeitos pró-autofágicos do CBD. Por exemplo, aumento da expressão gênica de p62 como uma resposta adaptativa à degradação aumentada do cargo autofágico marcado por essa proteína.

Esses resultados dialogam com importantes evidências prévias na literatura. De fato, VRECHI et al. (2021) demonstrou o efeito pró-autofágico do CBD em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e em astrócitos murinos. Esses pesquisadores reportaram a habilidade do CBD sozinho de aumentar a taxa de conversão de LC3B-I para LC3B-II em condições de fluxo autofágico não-interrompido, e na presença do inibidor da acidificação de lisossomos cloreto de amônio, o efeito de CBD de induzir o acúmulo de LC3B-II nessas células. Além disso, o efeito do CBD foi dependente da ativação dos receptores CB1r, CB2r e TRPV1 e sinalização dependente da fosforilação de ERK1/2, porém independente de mTOR1 (VRECHI et al., 2021). Esses pesquisadores no entanto não avaliaram o efeito do CBD diretamente nos estágios finais do fluxo autofágico e degradação do cargo autofágico pelos lisossomas. Portanto, é possível hipotetizar que o CBD tenha efeitos diferentes no fluxo autofágico a depender do tipo celular, predominando o efeito estimulatório das etapas finais de degradação do cargo autofágico em micróglia em comparação com outros tipos celulares no SNC, mas isso precisa ser melhor demonstrado.

Nesse contexto, também foi recentemente publicado o efeito do CBD de promover aumento do fluxo autofágico em neurônios do nematódeo *C. elegans*, neurônios primários hipocámpais de camundongos e células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (WANG et al., 2022b). Esses pesquisadores demonstraram que o tratamento com CBD por 1 ou 5 dias em *C. elegans* aumentou o número de punctas vermelhos (fluorescência mCherry indicativo de autofagossomas maduros) em neurônios de animais transgênicos expressando a proteína duplamente fluorescente mCherry-GFP-LGG-1 (LGG-1 é um

ortólogo da proteína LC3B em mamíferos) (HENIS-KORENBLIT; MELÉNDEZ, 2019). Interessantemente, o CBD aumentou a longevidade desses animais e reverteu as alterações morfológicas e de sobrevivência neuronal associadas ao envelhecimento de forma dependente da autofagia, uma vez que o *knockdown* de p62/SQSTM1 e BECLIN-1 bloquearam esses efeitos do CBD. De forma semelhante, em neurônios hipocâmpais e células de neuroblastoma, o tratamento com CBD (10 μ M) aumentou a taxa de conversão para LC3B-II, a expressão de ATG5 e reduziu a expressão de p62/SQSTM1 após 24 e 48 horas de tratamento. Em ambas as condições, os efeitos do CBD no fluxo autofágico foram bloqueados pelos inibidores da fusão/formação dos autofagolisossomos ou acidificação de lisossomos, cloroquina e bafilomicina A1 (WANG et al., 2022b). Esses achados se relacionam fortemente com os resultados encontrados nesse estudo, uma vez que os efeitos observados de indução de autofagia no presente estudo foram evidenciados com o mesmo tempo de tratamento (24-48h) e mesma faixa de concentrações, bem como bloqueados por inibidores do fluxo autofágico semelhantes, porém em modelos celulares diferentes (microglia versus células neuronais).

Além disso, o CBD é um droga cujos efeitos citoprotetores ou citotóxicos parecem depender fortemente da curva de concentrações testadas (CASTILLO-ARELLANO et al., 2023). De fato, apesar de múltiplos efeitos terapêuticos, sobretudo para doenças neurológicas e neuropsiquiátricas, terem sido associados ao CBD, existem preocupações em relação a sua segurança clínica e faixa de doses especialmente com o uso indiscriminado dessa droga. Por outro lado, a habilidade do CBD de inibir a proliferação celular, angiogênese e formação de metástases tem sido demonstrado em vários modelos *in vivo* e *in vitro* de neoplasias, e levantando hipóteses sobre o potencial anticâncer desse composto (HEIDER et al., 2022; SELTZER et al., 2020).

Nesse contexto, um trabalho recente, testou diferentes concentrações de CBD (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15 μ M) em diferentes linhagens de células de carcinoma epiteliais (FaDu, SNU899, SCC15, Hep2) e comparou com células epiteliais normais (linhagem HOK) (GO et al., 2020). Interessantemente, o CBD induziu um efeito citotóxico reduzindo a viabilidade celular das linhagens neoplásicas em concentrações muito inferiores às capazes de causar efeito citotóxico nas células normais (50% de redução de viabilidade foi observado nas células neoplásicas na concentração de 5 μ M, enquanto aproximadamente 20% de redução da viabilidade foi observada a 10 μ M na linhagem normal após 24 h de tratamento). Ademais, esses pesquisadores demonstraram que o

efeito citotóxico do CBD nas células neoplásicas dependeu da indução de autofagia, uma vez que pareado ao aumento de células apoptóticas foi observado um aumento de expressão gênica e proteica de BECLIN-1 e LC3B, e o tratamento com cloroquina bloqueou o efeito citotóxico do CBD, e aumentou consideravelmente a viabilidade celular das linhagens neoplásicas (GO et al., 2020). Outros estudos tem confirmado a habilidade do CBD e de outros canabinóides, como THC, de induzirem morte celular por autofagia em células neoplásicas de glioma e melanoma, por um mecanismo relacionado a inibição de AKT e complexo mTOR1 (ARMSTRONG et al., 2015; SALAZAR et al., 2009). Portanto, no contexto de linhagens neoplásicas a indução de autofagia relacionado ao CBD não é um mecanismo de proteção celular, mas sim de citotoxicidade.

Nesse contexto, nós testamos diferentes concentrações de CBD (1, 10, 50 e 100 μ M) na linhagem microglial humana HMC3 e os efeitos na viabilidade celular foram avaliados em dois ensaios distintos. No ensaio de MTT, foi possível observar redução significativa da viabilidade celular no corte temporal de 24 h a partir da concentração de 50 μ M, entretanto apenas a concentração de 100 μ M manteve efeito citotóxico robusto no corte de 48h. Em relação ao ensaio de atividade de LDH, impacto na sobrevivência celular foi observado na concentração de 100 μ M de CBD no corte de 24h, entretanto, após 48h, esse efeito foi normalizado. Baseado nisso, a dose de 10 μ M de CBD foi selecionado como a maior dose testada não-citotóxica e eleita para os ensaios subsequentes nesse estudo. Ademais, nossos resultados estão de acordo com evidências prévias que mostram a sensibilidade aumentada de linhagens neoplásicas aos efeitos citotóxicos do CBD, enquanto linhagens não-neoplásicas apresentam efeitos de redução de viabilidade celular mais aparente sobretudo em concentrações maiores que 10 μ M (GO et al., 2020).

Considerando o fenômeno de morte celular induzido por autofagia e a demonstração de sua importância para os efeitos citotóxicos do CBD, sobretudo em células neoplásicas, nós testamos o tratamento com CBD com ou sem inibidor de autofagia HCQ nos mesmos ensaios de viabilidade celular anteriores e na concentração de 10 μ M, a mesma capaz de induzir aumento do fluxo autofágico (sobretudo dos estágios finais de autofagia e formação de vesículas ácidas). Interessantemente, em nenhum dos cortes temporais avaliados de exposição ao CBD, 24h (reversão) e 48h (prevenção), o co-tratamento com CBD e HCQ afetou de forma significativa a viabilidade celular dessa linhagem microglial. Ao contrário, no ensaio de LDH, no coorte de 48h, os grupos tratados com HCQ (com ou sem CBD) apresentaram tendência a aumento da atividade dessa enzima.

Portanto, conjuntamente, nas nossas condições experimentais e na linhagem estudada de micróglia, a indução de autofagia pelo CBD na concentração de 10 μ M não parece contribuir para os mecanismos de morte celular, e sim, se tratar de um mecanismo de proteção celular e manutenção da homeostasia. Entretanto, se a autofagia contribui para os efeitos citotóxicos observados para concentrações maiores de CBD (> ou = 50 μ M) nessa linhagem, isso precisa ser demonstrado em estudos futuros, por não se tratar do objetivo central desse trabalho.

Nos últimos anos, têm se acumulado diversas evidências acerca dos efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios do CBD. Em diferentes modelos de inflamação crônica, como asma alérgica, esteato-hepatite não-alcóolica e esclerose múltipla, o CBD tem mostrado eficácia em suprimir a atividade pró-inflamatória de células T patogênicas e de macrófagos ativados. Em relação às evidências com micróglia, estudos prévios também demonstram o efeito anti-inflamatório promissor do CBD nessas células. Primeiramente, Martín-Moreno et al. (2011) demonstrou o efeito do CBD e outros canabinóides, como o agonista CB1r /CB2r WIN 55,212-2 e o agonista seletivo CB2r JWH-133, de inibirem o aumento intracelular de cálcio induzido por ATP, e o aumento dos níveis de nitrito da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α na linhagem de micróglia murinas N13 e micróglia primárias de ratos. Interessantemente, para o CBD esses efeitos foram dependentes dos receptores CB1r, CB2r e adenosina A2A (MARTÍN-MORENO et al., 2011). Posteriormente, Dos-Santos-Pereira et al., (2020) reportou que o CBD foi capaz de atenuar a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e glutamato de micróglia BV2 e micróglia primárias de camundongos após estímulo com LPS na faixa de 1-10 μ M, e esse efeito foi parcialmente dependente do receptor CB2r. Esses pesquisadores também demonstraram que a inibição de EROS mediada pela enzima NADPH oxidase e subsequente ativação do fator de transcrição NFkB seria um dos mecanismos subjacentes a esse efeito anti-inflamatório do CBD (DOS-SANTOS-PEREIRA et al., 2020).

De acordo com os nossos resultados, o CBD demonstrou um importante efeito imunomodulador e anti-inflamatório em micróglia humanas desafiadas com LPS. De fato, nós observamos que o CBD em ambos os protocolos de prevenção e reversão, foi capaz de atenuar o aumento dos níveis de nitrito, bem como das citocinas pró-inflamatórias secretadas no meio de cultura (TNF α e IL-1 β) induzidos pelo LPS. Interessantemente, sobretudo no protocolo de reversão, ou seja em micróglia primeiramente expostas ao LPS

e com fenótipo pró-inflamatório já estabelecido, o CBD foi capaz de aumentar significativamente a secreção de mediadores anti-inflamatórios solúveis, como IL-4 e TGF- β , e atividade e expressão da enzima arginase. Ademais, nós imunofenotipamos as células microgliais tratadas com CBD nos dois protocolos de exposição ao LPS e achados interessantes foram observados. De fato, nós identificamos que em ambos os protocolos de tratamento o CBD reduziu a população de células com alta expressão dos receptores de superfície CD11b e CD86, enquanto aumentou na população com alta expressão de CD200R foi observado. Adicionalmente, o tratamento com CBD aumentou a expressão relativa de CD86 e reduziu a de CD11b, sobretudo no protocolo de reversão, sem grandes alterações na expressão relativa de CD200R. Em relação às populações com colocalização desses marcadores, em geral, o tratamento com CBD aumentou a abundância de populações com alta expressão de CD200R (incluindo CD11b^{alta}CD200R^{alta}, CD11b^{baixa}CD200R^{alta}, CD86^{alta}CD200R^{alta}, CD86^{baixa}CD200R^{alta}). Também, ambos os protocolos de tratamento, reduziram a população de células CD11b^{alta}CD86^{alta} e CD11b^{alta}CD200R^{baixa}.

É bem conhecido que as micróglia são células altamente plásticas e que adotam estados diversos de acordo com as condições do microambiente e interação com outras células (TREMBLAY, 2021). No cérebro adulto, a micróglia homeostática ou quiescente, são células ramificada e altamente dinâmicas, que patrulham as sinapses de forma contínua garantindo a eliminação de sinapses excitotóxicas e a manutenção e maturação de sinapses em desenvolvimento. Entretanto, diferentes sinais e mediadores imunes, como DAMPs e PAMPs, relacionados à infecção ou injúria, podem ser detectados por essas células e induzir estados de reatividade, normalmente, pró-inflamatórios (TAY et al., 2018). No cérebro adulto, esses estados são acompanhados por transformações morfológicas da micróglia que assume um formato amebóide com poucas e curtas ramificações. Esses estados reativos normalmente cursam com uma maior síntese e expressão de mediadores pró-inflamatórios solúveis, como IL-6, IL1- β e TNF- α , além da maior produção de EROS, o que pode ter consequências neurodegenerativas (HICKMAN et al., 2018).

Entre os estímulos que classicamente induzem esses estados de polarização pró-inflamatória, se destacam o LPS e a exposição a citocinas exógenas, como IFN γ e TNF- α . Esses estados pró-inflamatórios, no passado, foram denominados de fenótipos M1. Por outro lado, os estados de polarização anti-inflamatória microglial, normalmente induzidos

por citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, e tratamento agudo com glicocorticóides, foram denominados de fenótipos M2 (GUO; WANG; YIN, 2022). Esses estados M1/M2 se originam por analogia com os estados de polarização assumidos por células T auxiliaadoras quando expostas a determinados estímulos, assumindo uma polarização clássica Th1 ou alternativa Th2. Fenômeno semelhante foi observado com linhagens de macrófagos periféricos, que assumem um estado de polarização pró-inflamatória ou M1, caracterizado pela produção de mediadores, como IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- α , após exposição a agonistas de TLRs ou IFNs, enquanto um estado anti-inflamatório M2, é induzido pela exposição a citocinas como IL-4 e IL-13, sendo caracterizado pela expressão aumentada de IL-10 e de algumas enzimas, como Arg1 e chitinase-símile 3 (Ym1) (YUNNA et al., 2020).

Essa classificação embora didática, é muito simplificada não sendo capaz de abranger a multiplicidade de estados que macrófagos e micróglia podem assumir, sobretudo *in vivo* (RANSOHOFF, 2016). Entretanto, ela pode ser útil para indicar estados de polarização opostos onde vários estados intermediários podem coexistir, especialmente para condições *in vitro*, em que os estímulos, como PAMPs e citocinas exógenas, podem ser rigidamente controlados, o que não acontece *in vivo*, ambos na homeostasia ou em resposta à situações de doença. Apesar dessa discussão, alguns marcadores têm sua expressão consistentemente associados a estados de polarização microglial específicos. Nesse contexto, estados pró-inflamatórios normalmente apresentam superexpressão de marcadores de superfície, como CD11b, CD16/32, CD86 e CD40, enquanto estados anti-inflamatórios microgliais normalmente apresentam superexpressão de CD2006, CD200R e IL4R (ZHOU et al., 2017).

Interessantemente, estados de polarização pró-inflamatórios em condições fisiológicas são usualmente seguidos por estados anti-inflamatórios que garantem a reparação e regeneração tecidual. Nesse sentido, esses últimos são associados não apenas ao aumento da secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, mas também fatores de crescimento, como TGF β , fator de crescimento insulina-símile 1 (do inglês insulin growth factor 1, IGF-1) e fator estimulante de colônias 1 (do inglês colony-stimulating factor 1 CSF-1), além de neurotrofinas, como BDNF e neurotrofina 4/5 (Nt 4/5) (HICKMAN et al., 2018; TREMBLAY, 2021). Portanto, o processo de inflamação e resposta imune inata no SNC é estritamente regulado pela micróglia homeostática, iniciando com uma resposta inflamatória robusta que tem como objetivo combater uma

ameaça e o retorno a homeostasia e reparação tecidual. Dessa maneira, grande heterogeneidade de estados microgliais e gradientes entre os dois polos de polarização são assumidos em condições homeostáticas. Quando a resposta pró-inflamatória é exacerbada ou crônica, e não seguida de uma resposta microglial reparativa e neurotrófica, estados de patologia do SNC podem emergir (TAY et al., 2018).

Nesse contexto, nos últimos anos, têm sido hipotetizado que apenas inibir estados reativos pró-inflamatórios anormais não seria suficiente para tratar efetivamente doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas associadas a inflamação crônica, mas ativamente promover estados reparativos e neuroprotetores microgliais seria um alvo a ser buscado (KUNTZEL; BAGNARD, 2022). Portanto, aqui, nós demonstramos que o CBD foi capaz não apenas de suprimir o aumento da expressão e de populações com fenótipos pró-inflamatórios demonstrados pelos marcadores de superfície CD11b e CD86, mas também induziu aumento das populações com aumento de CD200R, tipicamente associado a uma resposta anti-inflamatória e de resolução da inflamação, o que foi pareado pelo aumento da secreção de mediadores anti-inflamatórios e homeostáticos, como IL-4, TGF- β , e neurotrofinas, como o BDNF.

A intrínseca interação entre autofagia e resposta imune tem recebido grande atenção. Nesse contexto, foi demonstrado que a autofagia é um mecanismo central para as três principais funções das células monocíticas: fagocitose, apresentação de antígenos e produção de citocinas e mediadores imunes (PLAZA-ZABALA; SIERRA-TORRE; SIERRA, 2017). De fato, a apresentação de antígenos é uma função especializada de células dendríticas, enquanto macrófagos, incluindo micróglia, executam de forma basal predominantemente as duas outras funções. Primeiramente, foi demonstrado que a autofagia é um mecanismo essencial para a diferenciação de monócitos murinos e humanos a macrófagos maduros após exposição ao fator estimulador de colônia 1 (do inglês by colony-stimulating factor-1, CSF-1) e ao GM-CSF (ZHANG et al., 2012). De forma semelhante, o estímulo de CSF-1 é fundamental para manutenção da população microglial e sua capacidade de renovação e proliferação. Antagonistas do receptor de CSF-1 (CSF-1R) é uma abordagem bem conhecida de depleção da população de micróglia residentes no cérebro (GREEN; CRAPSER; HOHSFIELD, 2020). Nesse ínterim, foi demonstrado que em micróglia murinas primárias e em camundongos, o estímulo com CSF-1 é capaz de aumentar o fluxo autofágico, via ativação de AMPK1 e fosforilação inibitória do complexo mTOR (YANG et al., 2020). Entretanto, isso foi

demonstrado em modelo de dor neuropático, e não se sabe se o mesmo é válido para os efeitos homeostáticos de manutenção do *pool* micróglia no cérebro adulto.

Especificamente, em relação à resposta imune, tem sido reportado que agentes imunogênicos, como PAMPs, incluindo LPS, são capazes de recrutar adaptadores, como o fator mieloide de diferenciação primária 88 (Myd88) e adaptador contendo o domínio-Toll/IL-1 (TIR) indutor de interferon β (TRIF), os quais se ligam a BECLIN-1 induzindo autofagia em macrófagos RAW264.7. Adicionalmente, o receptor de TNF- α (TRAF6) é responsável ubiquitinação na Lys 63 na BECLIN-1, o que é essencial para indução de autofagia mediada por LPS em macrófagos (SHI; KEHRL, 2008). De forma semelhante, citocinas, como TNF- α , ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF, do inglês (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL), e interferon (IFN)- γ também aumentam o fluxo autofágico em macrófagos primários de camundongos (CADWELL, 2016), ao passo de que algumas citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e a ativação de seu receptor inibem a indução de autofagia nessas células por meio da ativação da sinalização do complexo mTOR1 e inibição do iniciador de autofagia ULK-1 (PARK et al., 2011).

Interessantemente, o mesmo não parece acontecer para micróglia, uma vez que foi demonstrado a exposição ao LPS em micróglia primárias murinas e células BV2 suprimiu o fluxo autofágico, indicado pela conversão de LC3B-I para LC3B-II, e a expressão de várias ATGs, em contraste com seu efeito pró-autofágico em macrófagos RAW264.7. Nas micróglia, esse efeito foi mediado por uma redução na síntese de fosfatidilinositol e sua forma fosforilada, o que diminui a translocação nuclear do fator FOXO3 e a expressão gênica de ATGs. Adicionalmente, a atividade fagocítica microglial também foi comprometida pela supressão da autofagia mediada por LPS, o que não aconteceu em macrófagos (LEE et al., 2018). Essas evidências também dialogam com os achados prévios de Jin et al. (2018) de que o estímulo com TNF α em micróglia BV2 suprimiu o fluxo autofágico ao mesmo passo que induziu aumento da expressão de outros mediadores pró-inflamatórios, como iNO, IL-6 e IL-1 β (JIN et al., 2018).

Apesar dessas disparidades, parece consenso de que a autofagia é um regulador negativo da resposta imune de macrófagos e micróglia (JÜLG; STROHM; BEHREND, 2021). Em macrófagos primários murino, o bloqueio de autofagia com 3-MA aumentou a produção de IL-1 β ; da mesma forma de que o *knockdown* de ATG16L1 e ATG7 promoveram um aumento da secreção de IL-1 β e IL-18 e ativação do inflamassoma

NLRP3 em macrófagos murinos desafiados com LPS e em modelos de endotoxemia, como colite induzida por sulfato de dextrano (SAITOH et al., 2008) e sepse por *Pseudomonas aeruginosa* (PU et al., 2017). A depleção de LC3B ou BECLIN-1 também causou aumento da ativação da caspase-1 e secreção de IL-1 β e IL-18 em macrófagos periféricos. Além disso, a deleção dessas proteínas aumentou o acúmulo de mitocôndrias danificadas ou disfuncionais e a translocação citosólica do DNA mitocondrial (mtDNA) em resposta ao tratamento com LPS e ATP. A liberação de mtDNA no citosol, por sua vez, contribuiu para ativação do inflamassoma e secreção de IL-1 β e IL-18 [43]. Posteriormente, foi demonstrado que a autofagia degrada os componentes do inflamassoma em macrófagos primários humanos e células THP-1 diferenciadas, por meio da ubiquitinação da caspase-1 e pro-IL-1 β com posterior degradação lisossômica desses componentes (HARRIS et al., 2011; SHI et al., 2012).

Em micróglia, foi recentemente demonstrado que compostos flavonóides naturais indutores de autofagia, como thoningianin A, foram capazes de por meio do aumento do fluxo autofágico em células BV2 induzir degradação de vários componentes do inflamassoma, como NLRP3, ASC, e caspase-1, bem como reduzir a secreção das formas maduras de IL-1 β e IL-18 (ZHOU et al., 2022). É importante mencionar que entre os efeitos pleiotrópicos da IL-1 β , como a secreção de IL-6 e TNF α pela micróglia de forma autócrina, essa citocina pode ativar a infiltração de células periféricas, como macrófagos e células T efectoras. Por outro lado, a IL-18 causa um efeito de retroalimentação positiva na micróglia, aumentando a atividade e expressão da caspase-1 e a produção de mediadores pró-inflamatórios, como metaloproteinases de matrix (MMPs), citocinas e EROS (GUO; CALLAWAY; TING, 2015). Nesse contexto, Jin et al. (2018) ainda demonstrou que a inibição da autofagia em micróglia murinas primárias e células BV2 pelo *knockdown* de ATG5 e pelo inibidor 3-MA foi capaz de acentuar a polarização pró-inflamatória induzida por TNF- α nessas células. Ademais, o bloqueio da autofagia nas micróglia por essas estratégias potencializou o efeito neurotóxico, via citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α e IL-1 β) do meio condicionado microglial em células de neuroblastoma de rato MES23.5 (JIN et al., 2018).

No presente estudo, nós observamos que o efeito imunomodulador do CBD nas micróglia humanas desafiadas com LPS, foi em geral atenuado ou bloqueado pelo co-tratamento com o inibidor de autofagia HCQ. No protocolo de reversão, o co-tratamento com HCQ atenuou a redução de nitrito e TNF α promovido pelo CBD nas micróglia

expostas ao LPS. Não só isso, o co-tratamento com HCQ bloqueou o aumento da atividade ou expressão de marcadores anti-inflamatórios, como atividade da arginase, níveis de IL-4, TGF- β e BDNF, induzido pelo CBD. Entretanto, esse efeito foi evidenciado apenas no protocolo de pós-tratamento, ou seja, foi dependente de um estado pró-inflamatório já existente nas células microgлияis e, possivelmente redução do fluxo autofágico, mediado pela inflamação. É interessante destacar que em consenso com a literatura, condições estimuladoras de autofagia, como a privação de soro, aqui utilizada foi associada a um aumento basal de marcadores anti-inflamatórios, em especial atividade da arginase, IL-4 e TGF- β , sugerindo que a indução de autofagia por si só é capaz de promover uma resposta anti-inflamatória desassociada de uma supressão de uma resposta pró-inflamatória concorrente. Em conjunto, nossos dados apontam que o efeito imunomodulador e anti-inflamatório do CBD em micrógлия humanas foi mais pronunciado nas células já expostas ao LPS e com fenótipo pró-inflamatório desenvolvido, e parcialmente dependente da indução do fluxo autofágico, uma vez que o bloqueio da fusão de autofagossomos com lisossomos pela HCQ, marcadamente atenuou os efeitos do CBD.

Aqui, nós medimos a formação de EROS intracelulares por meio de duas metodologias distintas com métodos de detecção baseados em deposição colorimétrica e fluorescência. Nesse contexto, uma comunicação importante entre a formação de EROS e o estado redox celular e autofagia tem sido defendida por diferentes estudos (FILOMENI; DE ZIO; CECCONI, 2015). Brevemente, todas as células vivas estão sujeitas aos potenciais efeitos citotóxicos de altas concentrações de moléculas oxidantes produzidas de forma exógena ou endógena. Esses radicais tem a habilidade comum de retirar elétrons de biomoléculas, como proteínas, lipídeos e DNA, gerando dano celular, chamado de estresse oxidativo. Diferentes sistemas antioxidantes endógenos existem para compensar a produção de EROS e prevenir o dano oxidativo. Esses sistemas incluem: i) enzimas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidases (GPx); ii) proteínas e peptídeos antioxidantes, como peroxiredoxinas, thioredoxinas (Trx) e glutaredoxinas (Grx); iii) antioxidantes de baixo peso molecular, como GSH, tocoferol e ascorbato. Esses sistemas de defesa antioxidante também são fundamentais para prevenir os danos relacionados a espécies reativas de nitrogênio (RNS), como o peroxinitrito (ONOO⁻), formado pela reação do óxido nítrico com EROS, sobretudo O₂- (SALIM, 2017).

Em conjunto EROS, tem sido reportados como indutores de autofagia em condições de privação de nutrientes (FILOMENI; DE ZIO; CECCONI, 2015). Entretanto, não é completamente esclarecido como esses radicais desencadeiam o fluxo autofágico. Entretanto, é sabido que os níveis de O_2^- intracelulares aumentam rapidamente após privação de nutrientes, e agentes antioxidantes podem bloquear a indução de autofagia nessas condições. Uma das hipóteses para essa interação entre EROS e autofagia parece ser mediado pela ação desses radicais em certas proteínas redox-sensíveis, como a AMPK. De fato, a AMPK pode ser ativada após exposição ao H_2O_2 , particularmente por S-glutationilação de cisteínas reativas localizadas nas subunidades α e β dessa quinase (SHE et al., 2014). Adicionalmente, a oxidação da ATG4 mediada por H_2O_2 , foi associada a uma inativação da sua atividade de hidrólise da FE ligada a LC3B e portanto favorecendo a elongação dos autofagossomos. Outras proteínas envolvidas na autofagia, como ATG7, ATG3 e p62/SQSTM1 possuem cisteínas vulneráveis a modificações pós-translacionais mediadas por EROS, mas o papel dessas interações na indução do fluxo autofágico precisa ser melhor esclarecido (CHANG et al., 2022).

Como mencionado anteriormente, a autofagia se insere entre os principais sistemas de reparo e manutenção da homeostasia intracelular, e nesse sentido evidências apontam que sua indução após exposição a condições pró-oxidantes seria um mecanismo compensatório para retornar a célula para estados homeostáticos e diminuir o dano oxidativo (CHANG et al., 2022). Nesse contexto, foi descoberto que algumas proteínas ATGs são capazes de induzir uma resposta antioxidante celular. Isso é especialmente verdade para a proteína p62/SQSTM1. De fato, em situações de aumento do fluxo autofágico, a ligação dessa proteína a vários aglomerados de macromoléculas ubiquitilinas aumenta sua afinidade pela proteína adaptadora Keap1 (do inglês Kelch-like ECH-associated protein 1), o que direciona a mesma para degradação nos lisossomos. A proteína Keap1 constitutivamente se liga ao fator de transcrição fator nuclear eritróide 2 (do inglês, *nuclear erythroid-related factor 2*, Nrf2), inibindo esse fator e mantendo-o preso no citoplasma. Após a degradação da Keap1, o fator Nrf2 pode migrar para o núcleo, se ligando nos elementos de resposta antioxidante presente na região promotora de vários genes antioxidantes e detoxificantes, portanto aumentando sua expressão e promovendo uma resposta antioxidante celular (KATSURAGI; ICHIMURA; KOMATSU, 2016).

Em contraste, nos últimos anos, evidências crescentes apontam que o NO e RNS executam um papel regulador negativo da autofagia. DE fato, o tratamento com doadores de NO ou aumento da atividade da NOS, como induzida pela inflamação, promove a S-nitrosilação e subsequente inibição das proteínas c-Jun-N-terminal quinase 1 (JNK1) e IκB quinase β (IKKβ), o que causa a inibição da AMPK e supressão da indução de autofagia via mTOR1(SARKAR et al., 2011). Além disso, o NO estimula a S-nitrosilação do fator inibidor do complexo mTOR1 TSC2, o que promove sua degradação e respectiva desinibição do mTOR1, portanto suprimindo a autofagia (FILOMENI; DE ZIO; CECCONI, 2015).

No presente estudo, nós não detectamos marcantes alterações nos níveis de EROS intracelulares após os tratamentos propostos, embora os controles indutores pró-oxidantes, como PMA e H₂O₂, tenham de forma efetiva induzido à formação desses radicais em seus respectivos ensaios. Entretanto, uma redução interessante da formação de EROS intracelulares foi detectada nos grupos tratados com CBD (expostos e não-expostos ao CBD) do protocolo de reversão. Duas hipóteses podem ser levantadas para esse efeito: i) considerando o efeito indutor da autofagia de uma resposta antioxidante celular, esse achado pode ser compatível com uma resposta compensativa mediada pelo aumento de autofagia promovido pelo CBD (CHANG et al., 2022); ii) o CBD possui propriedades antioxidantes intrínsecas relacionadas a seus grupamentos químicos doadores de hidrogênio; iii) o CBD é capaz de inibir a formação de EROS mediada pela enzima NADPH oxidase, sobretudo em situações de alta demanda glicolítica como em macrófagos e micróglia em estados pró-inflamatórios (DOS-SANTOS-PEREIRA et al., 2020). Então, considerando conjuntamente, múltiplos mecanismos podem estar atuando para esse possível efeito antioxidante do CBD em micróglia ativadas por LPS, e mais estudos precisam ser conduzidos para melhor compreender a interação mútua entre esses efeitos celulares distintos.

Em macrófagos e micróglia, a fagocitose é outra função fortemente influenciada pela autofagia e proteínas ATGs. Primeiramente, a participação da autofagia e ATGs foi demonstrada em macrófagos sobretudo para os mecanismos de defesa a patógenos intracelulares(DERETIC; SAITOH; AKIRA, 2013). De fato, em macrófagos expostos ao patógeno intracelular *M. tuberculosis*, proteínas ATGs, em especial LC3B são recrutadas para a membrana do fagossomo, posteriormente ativando outras ATGs, como ATG5, BECLIN-1, ATG7 e atividade da PI3K, as quais mediam a fusão rápida do fagossomo

com os lisossomos. De fato, macrófagos com *knockdown* de ATG7 demonstram uma captação aumentada, porém também acúmulo de *M. tuberculosis* ou *M. tuberculosis var. bovis* BCG não degradados. De fato, a estimulação de autofagia por privação de nutrientes ou farmacologicamente, com rapamicina, aumentou a colocalização de LC3B em fagossomos contendo patógenos intracelulares e posterior degradação dos mesmos (MARTINET et al., 2009; WU; LU, 2019). Achados semelhantes demonstrando a dependência de proteínas ATGs para a eficiência de fagocitose e degradação de outros patógenos intracelulares, como *Listeria monocytogenes* e *Toxoplasma gondii* em macrófagos humanos (GLUSCHKO et al., 2022; WU et al., 2020). Entretanto, evidências discrepantes também apontam que estímulos que induzem autofagia podem reduzir a capacidade fagocítica de macrófagos murinos primários, o que parece ser mediado por um desvio do *pool* de proteínas ATGs para a degradação de autofagossomos e não de fagossomos (LIMA et al., 2011). Portanto, o que parece consenso é a importante participação comum das proteínas ATGs, em especial LC3B, para a eficiência dos processos de degradação do cargo, seja ele provenientes de vesículas autofágicas ou fagocíticas, para o sistema de degradação lisossomal.

Em micróglia, associação igualmente importante entre fagocitose, autofagia e proteínas ATGs tem sido demonstrada. De fato, a capacidade fagocítica da micróglia é essencial para manter a homeostase do SNC, por meio da fagocitose de sinapses aberrantes e excitotóxicas, remoção de corpos apoptóticos, agregados proteínas e fragmentos de mielina (JÜLG; STROHM; BEHREND, 2021; SU et al., 2016). Têm sido demonstrado que em condições de patologia do SNC, a função fagocítica microglial está importantemente impactada. De fato, Berglund et al., (2020) demonstrou em modelo de esclerose múltipla por encefalite autoimune experimental que a capacidade das micróglia de fagocitar os debris de mielina é fundamental para a re-mielinização e recuperação do SNC. Nesse modelo, a deleção específica de ATG7 microglial levou a um aumento progressivo de agregados intracelulares de mielina não-degradada e progressão rápida dos sintomas-tipo esclerose múltipla. Essas micróglia ainda demonstraram um perfil transcricional, com supra-regulação de ApoE, TREM2 e CLEC7a, muito semelhante ao observado em outras doenças neurodegenerativas e ao induzido pelo envelhecimento. Interessantemente, o tratamento com o indutor de autofagia o dissacarídeo trehalose levou ao aumento da eficiência de fagocitose e degradação dos

fragmentos de mielina pela micróglia e melhora de parte dos sintomas relacionados ao modelo (BERGLUND et al., 2020).

Adicionalmente, o acúmulo de α -synucleína é capaz de induzir sintomas relacionados à doença de Parkinson em roedores, e de forma similar, a capacidade de recaptação e degradação desses aglomerados pela micróglia é essencial para prevenir a progressão do modelo (CHOI et al., 2020; PLAZA-ZABALA; SIERRA-TORRE; SIERRA, 2017). Nesse ínterim, foi demonstrado que a α -synucleína é reconhecida pela micróglia, absorvida e envolvida em vesículas autofágicas de forma dependente de várias ATGs, como LC3B, ATG7, ATG14 e p62/SQTMS1, sendo posteriormente degradada. Esses pesquisadores ainda demonstraram que a α -synucleína sinaliza via TLR4/NF κ B para uma expressão aumentada de p62/SQTMS1, que ubiquitina esses aglomerados e levam ao seu reconhecimento pela maquinaria autofágica via LC3B. Além disso, eles demonstraram que em micróglia primárias de camundongos o bloqueio de autofagia pelo inibidor de VPS34 SAR405, ou os inibidores da acidificação de lisossomas, bafilomicina A1 e cloroquina, levam ao aumento importante de agregados intracelulares de α -synucleína (CHOI et al., 2020).

A fagocitose microglial é mediada por vários receptores de superfície, como receptores Fc e receptores para fatores do sistema complemento, os quais reconhecem elementos fagocíticos diferentes, como sinaptossomas, corpos apoptóticos, elementos opsonizados e patógenos. Ademais, a capacidade microglial fagocítica muda conforme o perfil de PAMPs e subgrupo de TLRs recrutados. De fato, evidências prévias demonstraram que ambos LPS, agonista de TLR4, e a partícula viral mimética poly I:C, agonista de TLR3, aumentam a atividade fagocítica microglial contra fungos de forma dependente de MyD88 e TRIF (JANDA; BOI; CARTA, 2018; MÁRQUEZ-ROPERO et al., 2020). Entretanto, um trabalho recente testou a capacidade fagocítica de micróglia primárias de camundongos quando expostas ao LPS (100 ng/ml) e poly I:C (10 μ g/ml) em relação a diferentes substratos para fagocitose, como sinaptossomas, E. coli e esferas de látex opsonizadas (HE et al., 2021b). Interessantemente, eles observaram um perfil diferente de fagocitose conforme o PAMP testado: as micróglia expostas ao LPS demonstraram aumento da fagocitose de sinaptossomas, nenhuma mudança significativa da fagocitose de E.coli, e redução para esferas opsonizadas avaliadas 3-5 horas após estímulo imune. Poly I:C inibiu a fagocitose de todos esses elementos (HE et al., 2021b).

No presente estudo, nós avaliamos a atividade fagocítica de partículas E.coli conjugadas a fluoróforo em micróglia imortalizadas humanas HMC3 em dois pontos temporais 24h (protocolo de prevenção) e 48h (protocolo de reversão) após exposição ao LPS (100 ng/ml). Interessantemente, nós observamos um aumento da atividade fagocítica embora não-significativo em 24 h, que se normalizou após 48h de exposição ao LPS. Além disso, em relação aos tratamentos moduladores de autofagia testados, o tratamento com CBD mostrou um perfil diferente conforme o protocolo, induzindo um aumento da atividade fagocítica no protocolo de reversão, de forma concomitante à indução de autofagia e formação de vesículas ácidas, enquanto no protocolo de prevenção, o CBD demonstrou uma tendência normalizante da atividade fagocítica em relação ao LPS. Nesse mesmo ponto temporal, o CBD não induziu de forma significativa aumento da formação de vesículas ácidas. O tratamento com HCQ, inibidor da acidificação de lisossomas, inibiu a atividade fagocítica em ambos os protocolos de forma semelhante, e a indução de autofagia por privação de soro aumentou de forma marcante a atividade fagocítica em ambos os cortes temporais de forma semelhante.

Portanto, em conjunto, nossos resultados estão de acordo com a literatura prévia de que a autofagia é um mecanismo intrinsecamente relacionado à função fagocítica microglial, e que estratégias indutoras de autofagia potencializam a atividade fagocítica dessas células, enquanto inibidores da autofagia bloqueiam essa atividade (DERETIC; SAITOH; AKIRA, 2013; SIL; MUSE; MARTINEZ, 2018). Possíveis discrepâncias em relação a achados prévios da literatura em relação aos efeitos do LPS, podem estar associados ao tipo diferente de células testadas (micróglia primárias versus micróglia imortalizadas), espécie (camundongo versus humano) e tempo de exposição ao LPS (3-5 h versus 24-48 h). Adicionalmente, nossos resultados dialogam com evidências prévias que demonstram que o CBD (10 μ M) é capaz de aumentar a atividade fagocítica de micróglia BV2 de forma dependente da ativação do receptor TRPV1 e aumento das concentrações intracelulares de cálcio (HASSAN et al., 2014). Também, foi recentemente demonstrado que o CBD potencializa a fagocitose de β -amilóide em micróglia primárias de camundongos de forma dependente de TRPV2 e indução de autofagia (YANG et al., 2022), sendo um mecanismo neuroprotetor in vivo da progressão da neurodegeneração em modelo de deposição de β -amilóide.

Micróglia são células altamente móveis e dinâmicas em condições homeostáticas, entretanto sob condições de injúria ou inflamação, a mobilidade dessas células pode

mudar consideravelmente de acordo com status pró- ou- anti-inflamatório e as funções engajadas, respectivamente, eliminação da “ameaça” ou resolução e reparação tecidual respectivamente (DAVALOS et al., 2005; DIBAJ et al., 2010). O teste do arranhão (do inglês *scratch* assay) é um ensaio de baixo custo e baixa complexidade capaz de avaliar a migração de células aderentes, normalmente em monocamada. Esse ensaio tem vantagens em relação a outros ensaios de migração celular por mimetizar a migração celular em condições de injúria celular, ser compatível com o imageamento de células vivas e não requerer mudança de superfície de cultivo ou modificações genéticas para avaliar o comportamento migratório das células em estudo (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

Nesse contexto, LIVELY e SCHLICHTER, (2013) elegantemente demonstraram que micróglia primárias de ratos apresentam perfil de mobilidade diferente quando expostas ao LPS (10 ng/ml) ou a citocina anti-inflamatória IL-4 (20 ng/ml). Quando expostas ao LPS, essas células se mostraram com atividade migratória muito reduzida, em ambos os ensaios de *scratch* e de invasão de uma matrix de Matrigel, em relação às células não-tratadas ou expostas à IL-4. Adicionalmente, as células tratadas com IL-4 mostraram aumento considerável das regiões ricas em vinculin e F-actin em seus prolongamentos, bem como aumento da expressão gênica de diversas proteases de matrix, como (cisteína proteases, catepsina S e K e heparanase (LIVELY; SCHLICHTER, 2013). No presente estudo nós realizamos o teste de *scratch* conforme descrito por LIANG et al (2007) e as células foram observadas em dois cortes temporais, respectivamente 24h (prevenção) e 48h (reversão) após a exposição ao LPS. De acordo com nossos resultados, o tratamento com LPS nesses dois pontos temporais reduziu significativamente o número de células e o percentual de área ocupada na superfície do arranhão nesse ensaio. O tratamento com CBD nas duas condições foi capaz de normalizar as alterações induzidas pelo LPS na migração celular, entretanto apenas no protocolo de reversão, o co-tratamento com HCQ inibiu os efeitos do CBD. Nós hipotetizamos que o CBD foi capaz de aumentar a mobilidade microglial nas duas condições, uma vez que em ambos os protocolos induziu aumento importante de IL-4, entretanto o bloqueio da secreção de IL-4 foi induzido pela HCQ apenas no protocolo de reversão, de forma semelhante ao observado nesse ensaio. Portanto, é possível inferir que o efeito do CBD na migração celular nesse ensaio seria dependente da indução de autofagia e da consequente promoção de uma resposta anti-inflamatória relacionada a níveis aumentados de IL-4(LIVELY;

SCHLICHTER, 2013). Em relação ao efeito do CBD no protocolo de prevenção, nos quais mecanismos pró-autofágicas parecem menos predominantes, outros alvos moleculares e vias de sinalização podem estar potencialmente envolvidos, como receptores purinérgicos e canais TRPV1 e 2.

Nas últimas décadas, tem sido crescentemente aceita a contribuição de anormalidades neuroimunes para a neurobiologia da depressão (TROUBAT et al., 2021). Múltiplas evidências têm apontado para a associação entre um estado pró-inflamatório e a emergência de sintomas depressivos. Entre as evidências mais contundentes tem sido os achados de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios no soro desses pacientes. De fato, níveis aumentados das citocinas IL-6, TNF α , IL-10, IL-13, IL-18, IL-12, IL-1 β e receptor solúvel 2 de TNF foram identificados aumentados no soro de pacientes com depressão em estudos de meta-análise (DOWLATI *et al.*, 2010a; KÖHLER, C. A. *et al.*, 2017). Ademais, níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF α , guardam relação significativa com variáveis clínicas, como resposta terapêutica, severidade de sintomas e prognóstico (KÖHLER, *et al.*, 2018). Também fortalecem essa associação entre depressão e inflamação, estudos que demonstram que a exposição aguda ou crônica a citocinas ou a agentes imunogênicos, como LPS, é capaz de induzir alterações comportamentais que mimetizam sintomas depressivos tanto em humanos como em roedores, chamado de comportamento tipo-doença (MILLER, A. H.; MALETIC; RAISON, 2009; WRIGHT et al., 2005).

No campo pré-clínico, a exposição sistêmica ao LPS é capaz de eficientemente induzir alterações comportamentais em roedores com validade translacional para depressão (anedonia, comportamento tipo-desespero e alterações neurovegetativas) (DANTZER *et al.*, 2008). Em relação a esse modelo, estudos prévios apontam que o espectro de alterações comportamentais induzidas após administração única de LPS é tempo-dependente: agudamente, cerca de 1-2 horas após a injeção de LPS, predominam nos animais alterações que caracterizam o estado de comportamento tipo-doença; mais tardiamente, cerca de 24 horas após a inoculação de LPS, os animais apresentam de forma marcante a emergência do comportamento tipo-depressivo (CUSTÓDIO *et al.*, 2013; MELLO *et al.*, 2018). Nesse contexto, importante evidência foi atribuída ao nosso grupo de pesquisa que demonstrou que agudamente (1.5 horas pós-LPS), aumento nos níveis de IL-1 β e TNF- α foram encontradas no soro e no cérebro de camundongos, enquanto que

24 horas pós-LPS apenas alterações cerebrais dessas citocinas eram evidentes (CUSTÓDIO *et al.*, 2013).

De acordo com nossos resultados, o desafio com LPS foi capaz de forma consistente de induzir fenótipo tipo-depressivo, marcado pelo aumento do comportamento tipo-desespero, redução do comportamento de autocuidado, e comportamento tipo-ansioso. Esses achados são compatíveis com evidências prévias na literatura proveniente do nosso grupo e de outros a respeito da indução de comportamento tipo-depressivo 24 horas após a injeção de LPS (O'CONNOR *et al.*, 2009; TOMAZ *et al.*, 2020). Entretanto, nós observamos que o LPS foi capaz de reduzir de forma importante o índice de apetite dos animais, o que pode ser um viés potencial para a interpretação da performance no teste da alimentação suprimida pela novidade, e representar um resquício do comportamento tipo-doença, característico das primeiras horas após desafio com esse PAMP(OGIMOTO; HARRIS; WISSE, 2006).

Em relação ao tratamento com CBD, interessante, nesse modelo o CBD foi capaz de eficientemente reverter as alterações de comportamento de auto-cuidado no teste do *splash*, e de reduzir a latência para alimentação no teste da alimentação suprimida pela novidade. O efeito do CBD neste ensaio é compatível com efeito antidepressivo-rápido, uma vez que antidepressivos monoaminérgicos clássicos normalmente demandam de tratamento repetido (por 2 semanas) para apresentarem efeito de redução de latência nesse teste, enquanto drogas antidepressivas rápidas, como a cetamina, são efetivas após uma única administração (BLASCO-SERRA *et al.*, 2017; CAMARGO *et al.*, 2019). Entretanto, no teste do nado forçado, nós não evidenciamos efeito significativo do CBD na reversão do comportamento tipo-desespero induzido pelo LPS. A S-cetamina se mostrou mais eficaz do que o CBD na reversão desse comportamento. Nesse contexto, ambas as drogas apresentaram efeito compatível com ação antidepressiva rápida no teste da alimentação suprimida pela novidade, porém o CBD se mostrou mais eficaz na reversão das alterações tipo-motivacionais, enquanto a S-cetamina no comportamento tipo-desespero.

Esses achados vão de encontro com a literatura prévia que mostra a capacidade do CBD de reduzir a imobilidade no teste do nado forçado em diferentes modelos de depressão, como desamparo aprendido e modelo genético de depressão *Flinders-sensitive rats* (SALES *et al.*, 2019; SILOTE *et al.*, 2019, 2021). Inclusive em camundongos desafiados com LPS (injeção sistêmica intraperitoneal, 0.83 mg/kg), o CBD foi capaz de

reduzir o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (TITO et al., 2021) e no teste da suspensão da cauda (FLORENSA-ZANUY et al., 2021). No trabalho de FLORENSA-ZANUY e colaboradores, o CBD ainda reduziu o comportamento tipo-anedônico e tipo-ansioso em camundongos desafiados com LPS (FLORENSA-ZANUY et al., 2021). Entretanto, algumas diferenças importantes entre esses estudo e o presente trabalho podem justificar a disparidade de resultados: protocolo de prevenção *versus* protocolo de reversão aplicado aqui; dose do CBD (30 mg/kg *versus* 10 mg/kg, aqui) e do LPS (0.83 mg/kg *versus* 0.5 mg/kg, aqui), tempo de avaliação do comportamento tipo-depressivo (6 horas após LPS *versus* 24 horas após LPS). Essas diferenças conjuntamente podem explicar parcialmente os resultados aqui obtidos. Apesar disso, o tratamento com CBD mostrou potencial como agente antidepressivo rápido capaz de reverter sobretudo comportamentos apáticos, o que precisa ser melhor explorado em estudos futuros utilizando outros modelos animais de depressão.

Aqui, nós também utilizamos o co-tratamento com inibidor da acidificação de lisossomas HCQ como ferramenta farmacológica para inibição do fluxo autofágico. Estudos prévios demonstraram que o tratamento sistêmico com HCQ por 03 - 05 dias é capaz de inibir a autofagia em células saudáveis, incluindo macrófagos periféricos, e células neoplásicas (COOK et al., 2014; RUIZ et al., 2016). Aqui, o tratamento com HCQ foi capaz de atenuar o efeito do CBD em ambos os testes do *splash*, para comportamento motivacional, e alimentação suprimida pela novidade para efeito antidepressivo rápido, sugerindo também a participação de mecanismos de indução de autofagia para esse efeito. Nesse contexto, nós identificamos níveis de expressão aumentados da isoforma LC3B-II no PFC dos animais tratados com CBD, indicando um possível aumento da formação de autofagossomas maduros e do fluxo autofágico nessa área cerebral. De forma semelhante, a S-cetamina induziu expressão aumentada de LC3B-II no HC.

Interessantemente, evidências recentes tem apontado para a capacidade do CBD de induzir autofagia no cérebro de roedores (FU et al., 2023; HAO; FENG, 2021). De fato, HAO et al. (2021) demonstrou a habilidade do tratamento crônico com CBD (30 dias) de induzir autofagia no HC de animais idosos em um modelo de DA. Esse efeito foi acompanhado por um suprarregulação da expressão gênica de vias associadas à resposta imune, sobre fagocitose, e redução dos depósitos de β -amilóide (HAO; FENG, 2021). De forma semelhante, WANG et al., 2022 relataram a capacidade do CBD de aumentar o fluxo autofágico, indicado pela conversão de LC3B-I em LC3B-II, em neurônios

primários hipocampais e em neurônios de *C. elegans* (indicado pela proteína LGG-1 homóloga a LC3B), o que foi associado a efeito pró-longevidade dessa droga *in vitro* e *in vivo* (WANG et al., 2022). Portanto, em conjunto, nossos resultados estão de acordo com a literatura prévia que apontam a capacidade do CBD de induzir autofagia em organismos multicelulares, como nematódeos e roedores. Adicionalmente, nós demonstramos a habilidade do CBD de induzir seletivamente esse efeito no PFC nesse modelo pró-inflamatório de comportamento tipo-depressivo.

No presente estudo, nós medimos as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF α no PFC e HC de animais expostos ao modelo do LPS e tratados com CBD com e sem HCQ. Inicialmente, nós detectamos que o modelo do LPS foi capaz de aumentar a expressão dessas duas citocinas apenas no HC, e não no PFC, no corte temporal selecionado nesse estudo. Ademais, o tratamento com CBD, apesar de ter demonstrado efeito tipo-antidepressivo não alterou significativamente a expressão dessas citocinas, sobretudo no PFC, onde potencialmente induziu aumento do fluxo autofágico. Por outro lado, a S-cetamina foi capaz de reverter o aumento tanto de TNF α como de IL-1 β no HC dos animais expostos ao LPS. Interessantemente, nessa mesma área cerebral, a S-cetamina potencialmente induziu efeitos pró-autofágicos. Esses resultados se alinham com um robusto corpo de evidências prévias que demonstram a capacidade da autofagia de atuar como um regulador negativo da resposta pró-inflamatória sistêmica e no cérebro (DERETIC; SAITOH; AKIRA, 2013; PLAZA-ZABALA; SIERRA-TORRE; SIERRA, 2017). Isso pode envolver potencialmente mecanismos, como ubiquitinação de proteínas do NLRP3, como caspase 1 e pro-IL-1 β , com sua posterior degradação e redução da forma secretada dessa citocina (SHI et al., 2012; WU; LU, 2019). Ademais, nós hipotetizamos que ausência de efeito do CBD na expressão dessas citocinas sobretudo no PFC esteja relacionado a uma necessidade de uma suprarregulação transcricional das mesmas, como induzido pelo LPS no HC. Ademais, aqui, apesar de nós demonstrarmos a expressão de marcadores pró-inflamatórios, relacionados a resposta microglial, não é possível especificar que sua produção esteja seletivamente associada a essas células, e outros tipos celulares, como neurônios, astrócitos e macrófagos periféricos possam estar contribuindo para esse efeito. Da mesma forma, não é possível associar o aumento da expressão das proteínas relacionadas ao fluxo autofágico identificado aqui a um tipo celular específico, como a microglia, o que necessita de mais estudos para posterior esclarecimento.

O presente estudo apresenta algumas limitações importantes. Primeiramente, embora nós tenhamos utilizado estratégias complementares para avaliar diferentes estágios do fluxo autofágico, a participação de ATGs e outras proteínas específicas relacionadas à via canônica ou não-canônica da autofagia não foi explorada. Adicionalmente, um dos inibidores de acidificação lisossomal utilizados nesse estudo, a HCQ, apesar de forma bem-estabelecida exercer efeito inibitório sobre autofagia, possui alguns alvos inespecíficos que podem acrescentar confundidores aos efeitos observados. Entretanto é digno de nota que mesmo outros inibidores da acidificação lisossomal, como a bafilomicina A1, possuem *off-targets* que também trazem vieses para a interpretação de seus efeitos (KLIONSKY et al., 2021). Esse estudo foi desenvolvido em uma linhagem imortalizada que apesar de ser uma linhagem humana e com comportamento semelhante (transcrição gênica, reatividade a estímulos imunes e metabolismo) a micróglia primária (DELLO RUSSO et al., 2018) possui limitações em relação a esse último modelo celular. Também, o cultivo em monocamada de células única, em detrimento a estratégias de co-cultivo ou cultivo 3D ou de organóides, trazem uma limitação metodológica ao presente estudo (CARROLL; FOLIAKI; HAIGH, 2021). Por fim, embora a farmacologia do CBD seja extremamente complexa e mais de 60 alvos potencialmente interajam com esse composto para mediação de seus efeitos farmacológicos, o presente estudo não se debruçou sobre alvos moleculares específicos que poderiam estar mediando os efeitos pró-autofágicos do CBD aqui pioneiramente demonstrados em células microgliais.

Como perspectivas futuras, investigar a interação do efeito do CBD no fluxo autofágico e alvos da sinalização do inflammasoma NLRP3, como caspase-1 e pro-IL-1 β , bem como caracterizar da participação de alvos moleculares já propostos estarem envolvidos nos efeitos imunoreguladores do CBD, como o CB2r (DOS-SANTOS-PEREIRA et al., 2020), no fluxo autofágico despontam como questões promissoras para estudos futuros.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo de forma pioneira demonstrou a habilidade do CBD de induzir aumento do fluxo autofágico em micróglia humanas, sobretudo das etapas finais da

autofagia relacionadas à degradação do cargo autofágico e da formação de vesículas ácidas (potencialmente autofagolisossomos e lisossomos). Ademais, nós demonstramos que a indução de autofagia é um mecanismo fundamental para o efeito imunomodulador e anti-inflamatório do CBD nessa linhagem de micróglia humana, sobretudo, em células já ativadas pelo agente pró-inflamatório LPS. Nesse contexto, o bloqueio da indução de autofagia foi capaz de atenuar de forma marcante o aumento de mediadores anti-inflamatórios e supressão de mediadores pró-inflamatórios, além do aumento da atividade fagocítica e de migração celular promovidos pelo CBD. Também, o CBD demonstrou efeito antidepressivo-símile no modelo animal de depressão induzido por LPS, o que foi marcadamente atenuado pela inibição farmacológica da autofagia. Portanto, em conjunto, nossos resultados acrescentam uma importante evidência a respeito dos mecanismos celulares subjacentes aos efeitos imunomodulador e anti-inflamatório do CBD, e propõe a autofagia como alvo importante para os efeitos protetores e terapêuticos desse composto em várias doenças neuropsiquiátricas, como a depressão (para uma visão integrada dos resultados desse estudo, ver a Figura 28).

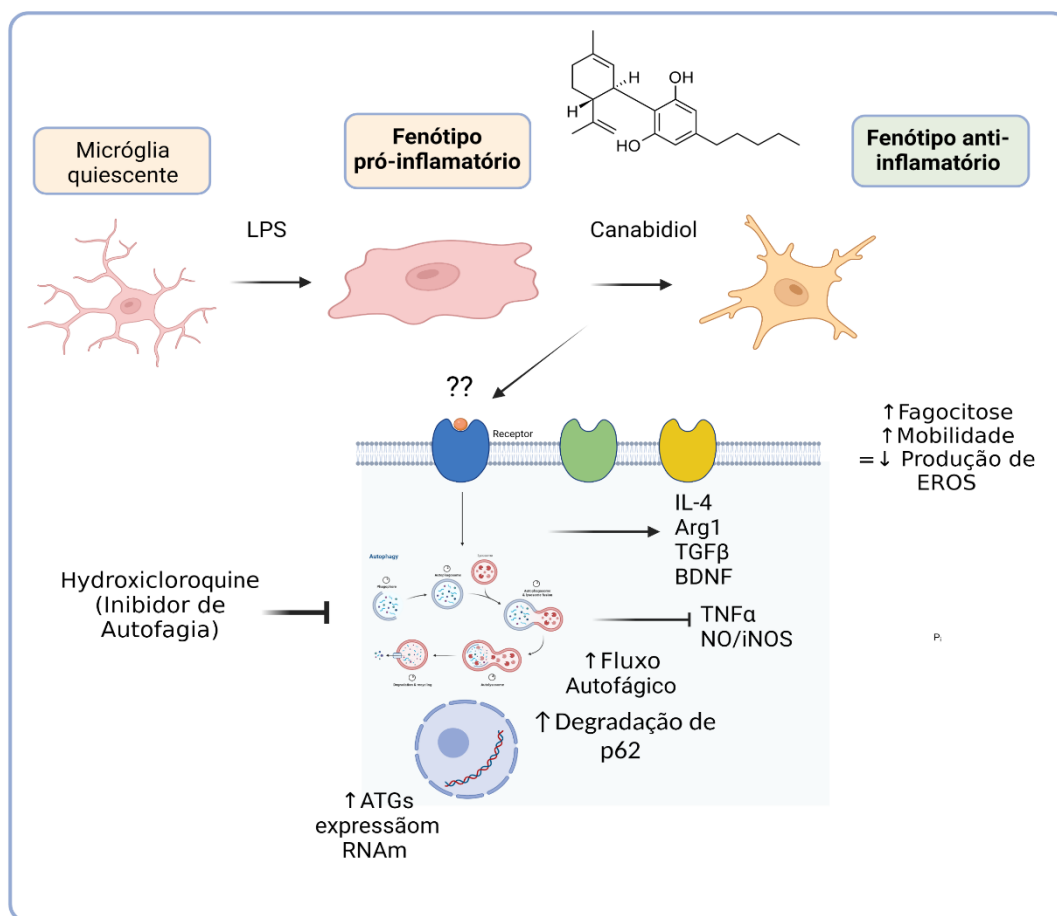


Figura 28. Esquema integrativo dos resultados desse estudo. O CBD é capaz de induzir uma transição para um fenótipo anti-inflamatório microglial por meio do aumento fluxo autofágico, degradação do cargo autofágico e aumento da expressão de algumas proteínas relacionadas à autofagia (ATGs). Isso também é seguido por aumento da capacidade fagocítica e motilidade celular. Figura criada pelo autor com Biorender.com. Abreviações: CBD: canabidiol; EROS: espécies reativas de oxigênio.

8. REFERÊNCIAS

- ALAMO, C.; LÓPEZ-MUÑOZ, F. New antidepressant drugs: beyond monoaminergic mechanisms. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 14, p. 1559–1562, 2009.
- ALCOCER-GÓMEZ, E. et al. NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 36, p. 111–117, 1 fev. 2014.
- ALCOCER-GÓMEZ, E. et al. Antidepressants induce autophagy dependent-NLRP3-inflammasome inhibition in Major depressive disorder. **Pharmacological Research**, v. 121, p. 114–121, 1 jul. 2017.
- ALESSANDRIA, G. et al. Long-term assessment of the cognitive effects of nabiximols in patients with multiple sclerosis: A pilot study. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 196, p. 105990, set. 2020.
- ALLSOP, D. J. et al. Nabiximols as an Agonist Replacement Therapy During Cannabis Withdrawal: A Randomized Clinical Trial. **JAMA Psychiatry**, v. 71, n. 3, p. 281–291, 1 mar. 2014.
- ALMAND, A. T. et al. The influence of perceived stress on the human microbiome. **BMC Research Notes**, v. 15, n. 1, p. 193, 3 jun. 2022.
- AMAN, Y. et al. Autophagy in healthy aging and disease. **Nature Aging**, v. 1, n. 8, p. 634–650, ago. 2021.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 360438, 2014.
- BAKEER, M. S. et al. On-treatment improvement of an emerging psychosomatic depressive disorder among salmonella carriers: a multicenter experience from Egypt. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 2573–2582, 22 ago. 2019.
- BAKUNINA, N.; PARIANTE, C. M.; ZUNSZAIN, P. A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, v. 144, n. 3, p. 365–373, mar. 2015.
- BEALE, C. et al. Prolonged Cannabidiol Treatment Effects on Hippocampal Subfield Volumes in Current Cannabis Users. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 3, n. 1, p. 94–107, dez. 2018.

BERGAMASCHI, M. M. et al. Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naïve social phobia patients. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 6, p. 1219–1226, maio 2011.

BERGLUND, R. et al. Microglial autophagy-associated phagocytosis is essential for recovery from neuroinflammation. **Science Immunology**, v. 5, n. 52, p. eabb5077, 16 out. 2020.

BERMAN, R. M. et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological Psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 351–354, 15 fev. 2000.

BIANCHIN, M. M.; SNOW, Z. Primary Microglia Dysfunction or Microgliopathy: A Cause of Dementias and Other Neurological or Psychiatric Disorders. **Neuroscience**, v. 497, p. 324–339, 10 ago. 2022.

BILBAO, A.; SPANAGEL, R. Medical cannabinoids: a pharmacology-based systematic review and meta-analysis for all relevant medical indications. **BMC Medicine**, v. 20, n. 1, p. 259, 19 ago. 2022.

BISOGLIO, T. et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 4, p. 845–852, 2001.

BLASCO-SERRA, A. et al. A standardization of the Novelty-Suppressed Feeding Test protocol in rats. **Neuroscience Letters**, v. 658, p. 73–78, 29 set. 2017.

BROWN, G. C.; NEHER, J. J. Microglial phagocytosis of live neurons. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 209–216, abr. 2014.

CADWELL, K. Crosstalk between autophagy and inflammatory signalling pathways: balancing defence and homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 11, p. 661–675, nov. 2016.

CAMARGO, A. et al. Augmentation effect of ketamine by guanosine in the novelty-suppressed feeding test is dependent on mTOR signaling pathway. **Journal of Psychiatric Research**, v. 115, p. 103–112, ago. 2019.

CAMPOS, A. C. et al. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 6, p. 1407–1419, jul. 2013.

CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 2, p. 223–230, 1 ago. 2008.

CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1517–1521, 13 nov. 2009.

CAÑAS-GONZÁLEZ, B. et al. Influence of Stress and Depression on the Immune System in Patients Evaluated in an Anti-aging Unit. **Frontiers in Psychology**, v. 11, p. 1844, 4 ago. 2020.

CAPURON, L. et al. Does Cytokine-Induced Depression Differ from Idiopathic Major Depression in Medically Healthy Individuals? **Journal of affective disorders**, v. 119, n. 1–3, p. 181–185, dez. 2009.

CARBONI, L. et al. Early-life stress and antidepressants modulate peripheral biomarkers in a gene-environment rat model of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 1037–1048, 16 ago. 2010.

CARROLL, J. A.; FOLIAKI, S. T.; HAIGH, C. L. A 3D cell culture approach for studying neuroinflammation. **Journal of neuroscience methods**, v. 358, p. 109201, 1 jul. 2021.

CASTILLO-ARELLANO, J. et al. The Polypharmacological Effects of Cannabidiol. **Molecules**, v. 28, n. 7, p. 3271, 6 abr. 2023.

CASTOLDI, F.; PIETROCOLA, F. Chapter 7 - Metabolic aspects of canonical versus noncanonical autophagy. Em: PETRONI, G.; GALLUZZI, L. (Eds.). **Non-Canonical Autophagy**. [s.l.] Academic Press, 2021. p. 133–165.

CHANG, K.-C. et al. The interplay of autophagy and oxidative stress in the pathogenesis and therapy of retinal degenerative diseases. **Cell & Bioscience**, v. 12, n. 1, p. 1, 3 jan. 2022.

CHANG, N. C. Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020.

CHANG, Y.-P. et al. Resveratrol inhibits NLRP3 inflammasome activation by preserving mitochondrial integrity and augmenting autophagy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 7, p. 1567–1579, jul. 2015.

CHAVES FILHO, A. J. M. et al. IDO chronic immune activation and tryptophan metabolic pathway: A potential pathophysiological link between depression and obesity. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 80, n. Pt C, p. 234–249, 3 jan. 2018.

CHAVES-FILHO, A. J. M. et al. Shared microglial mechanisms underpinning depression and chronic fatigue syndrome and their comorbidities. **Behavioural Brain Research**, v. 372, p. 111975, 17 out. 2019.

CHEIRAN PEREIRA, G. et al. Microglia and HPA axis in depression: An overview of participation and relationship. **The World Journal of Biological Psychiatry: The Official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry**, v. 23, n. 3, p. 165–182, mar. 2022.

CHEN, A. et al. Neuroprotective effect of brain-derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 4, p. 1011–1016, 1 out. 2013.

CHEN, Y.; AZAD, M. B.; GIBSON, S. B. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 7, p. 1040–1052, jul. 2009.

CHEVALIER, G. et al. Effect of gut microbiota on depressive-like behaviors in mice is mediated by the endocannabinoid system. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 6363, 11 dez. 2020.

CHIU, W.-C. et al. Recurrence of depressive disorders after interferon-induced depression. **Translational Psychiatry**, v. 7, n. 2, p. e1026–e1026, fev. 2017.

CHO, M.-H. et al. Autophagy in microglia degrades extracellular β -amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome. **Autophagy**, v. 10, n. 10, p. 1761–1775, 17 out. 2014.

CHOCKALINGAM, R.; GOTT, B. M.; CONWAY, C. R. Tricyclic Antidepressants and Monoamine Oxidase Inhibitors: Are They Too Old for a New Look? **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 250, p. 37–48, 2019.

CHOI, G. E. et al. BNIP3L/NIX-mediated mitophagy protects against glucocorticoid-induced synapse defects. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 487, 20 jan. 2021.

CHOI, I. et al. Microglia clear neuron-released α -synuclein via selective autophagy and prevent neurodegeneration. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1386, 13 mar. 2020.

CIPRIANI, A. et al. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. **The Lancet**, v. 391, n. 10128, p. 1357–1366, 7 abr. 2018.

CODOGNO, P.; MEHRPOUR, M.; PROIKAS-CEZANNE, T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 1, p. 7–12, jan. 2012.

COLASANTI, A. et al. Hippocampal Neuroinflammation, Functional Connectivity, and Depressive Symptoms in Multiple Sclerosis. **Biological Psychiatry**, v. 80, n. 1, p. 62–72, 1 jul. 2016.

COMMONS, K. G. et al. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. **ACS chemical neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 955–960, 17 maio 2017.

COMPANS, B. et al. NMDAR-dependent long-term depression is associated with increased short term plasticity through autophagy mediated loss of PSD-95. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 2849, 14 maio 2021.

COOK, K. L. et al. Hydroxychloroquine inhibits autophagy to potentiate antiestrogen responsiveness in ER+ breast cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 20, n. 12, p. 3222–3232, 15 jun. 2014.

- CORONA, A. W. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition attenuates lipopolysaccharide induced persistent microglial activation and depressive-like complications in fractalkine receptor (CX(3)CR1)-deficient mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 31, p. 134–142, jul. 2013.
- CORRALIZA, I. M. et al. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. **Journal of Immunological Methods**, v. 174, n. 1–2, p. 231–235, 14 set. 1994.
- CORROON, J.; PHILLIPS, J. A. A Cross-Sectional Study of Cannabidiol Users. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 3, n. 1, p. 152–161, 2018.
- COTTER, D. et al. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 58, n. 6, p. 545–553, jun. 2001.
- COVID-19 MENTAL DISORDERS COLLABORATORS. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. **Lancet (London, England)**, v. 398, n. 10312, p. 1700–1712, 6 nov. 2021.
- CRIPPA, J. A. et al. Translational Investigation of the Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD): Toward a New Age. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2009, 2018.
- CRIPPA, J. A. DE S. et al. Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 417–426, fev. 2004.
- CRIPPA, J. A. S. et al. Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a preliminary report. **Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 25, n. 1, p. 121–130, jan. 2011.
- CRIPPA, J. A. S. et al. Efficacy and Safety of Cannabidiol Plus Standard Care vs Standard Care Alone for the Treatment of Emotional Exhaustion and Burnout Among Frontline Health Care Workers During the COVID-19 Pandemic: A Randomized Clinical Trial. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 8, p. e2120603, 13 ago. 2021.
- DANA, H. et al. Disregulation of Autophagy in the Transgenerational Cc2d1a Mouse Model of Autism. **Neuromolecular Medicine**, v. 22, n. 2, p. 239–249, jun. 2020.
- DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 933, p. 222–234, mar. 2001.
- DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 2, p. 153–160, fev. 2007.
- DAVALOS, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 752–758, jun. 2005.

- DE ALMEIDA, D. L.; DEVI, L. A. Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 8, n. 6, p. e00682, 9 nov. 2020.
- DECRESSAC, M. et al. TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from α -synuclein toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 19, p. E1817–E1826, 7 maio 2013.
- DEL SANT, L. C. et al. Impact of Repeated Doses of Subcutaneous Esketamine on Acute Dissociative Symptoms in Treatment-Resistant Depression. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 1, p. 31, 26 dez. 2022.
- DELLO RUSSO, C. et al. The human microglial HMC3 cell line: where do we stand? A systematic literature review. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 259, 10 set. 2018.
- DELPECH, J.-C. et al. Microglia in neuronal plasticity: Influence of stress. **Neuropharmacology**, v. 96, n. Pt A, p. 19–28, set. 2015.
- DENG, Z. et al. Autophagy deficiency in neurodevelopmental disorders. **Cell & Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 214, 17 dez. 2021.
- DERETIC, V.; SAITOH, T.; AKIRA, S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 10, p. 722–737, out. 2013.
- DESBONNET, L. et al. Microbiota is essential for social development in the mouse. **Molecular Psychiatry**, v. 19, n. 2, p. 146–148, fev. 2014.
- DEUTSCH, D. G. A Personal Retrospective: Elevating Anandamide (AEA) by Targeting Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) and the Fatty Acid Binding Proteins (FABPs). **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 370, 13 out. 2016.
- DEVINSKY, O. et al. Cannabidiol: Pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. **Epilepsia**, v. 55, n. 6, p. 791–802, jun. 2014.
- DIBAJ, P. et al. NO mediates microglial response to acute spinal cord injury under ATP control in vivo. **Glia**, v. 58, n. 9, p. 1133–1144, jul. 2010.
- DIKIC, I.; ELAZAR, Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 6, p. 349–364, jun. 2018.
- DOS-SANTOS-PEREIRA, M. et al. Cannabidiol prevents LPS-induced microglial inflammation by inhibiting ROS/NF- κ B-dependent signaling and glucose consumption. **Glia**, v. 68, n. 3, p. 561–573, mar. 2020.
- DOWLATI, Y. et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 446–457, 1 mar. 2010.
- DUNLOP, B. W.; MAYBERG, H. S. Neuroimaging Advances for Depression. **Cerebrum: the Dana Forum on Brain Science**, v. 2017, p. cer-16-17, 1 nov. 2017.

EGGESBØ, J. B. et al. LPS induced release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and TNF-alpha in EDTA or heparin anticoagulated whole blood from persons with high or low levels of serum HDL. **Cytokine**, v. 8, n. 2, p. 152–160, fev. 1996.

EIDEN, L. E. Neuropeptide-catecholamine interactions in stress. **Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)**, v. 68, p. 399–404, 2013.

EL-ALFY, A. T. et al. Antidepressant-like effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 95, n. 4, p. 434–442, 1 jun. 2010.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 435–451, maio 2004.

ERNY, D. et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 965–977, jul. 2015.

ETCHEGARAY, J. I. et al. Defective Phagocytic Corpse Processing Results in Neurodegeneration and Can Be Rescued by TORC1 Activation. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 11, p. 3170–3183, 16 mar. 2016.

FAVA, M. et al. Background and rationale for the sequenced treatment alternatives to relieve depression (STAR*D) study. **The Psychiatric Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 457–494, x, jun. 2003.

FEKETE, R. et al. Microglia control the spread of neurotropic virus infection via P2Y₁₂ signalling and recruit monocytes through P2Y₁₂-independent mechanisms. **Acta Neuropathologica**, v. 136, n. 3, p. 461–482, 2018.

FELGER, J. C.; LOTRICH, F. E. Inflammatory Cytokines in Depression: Neurobiological Mechanisms and Therapeutic Implications. **Neuroscience**, v. 246, p. 199–229, 29 ago. 2013.

FENG, X. et al. Defective autophagy is associated with neuronal injury in a mouse model of multiple sclerosis. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 17, n. 2, p. 95–103, maio 2017.

FILOMENI, G.; DE ZIO, D.; CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 3, p. 377–388, mar. 2015.

FLORENSA-ZANUY, E. et al. Cannabidiol antidepressant-like effect in the lipopolysaccharide model in mice: Modulation of inflammatory pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 185, p. 114433, mar. 2021.

FLOREY, O.; OVERHOLTZER, M. Autophagy proteins in macroendocytic engulfment. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 7, p. 374–380, jul. 2012.

FOGAÇA, M. V. et al. Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: Involvement of 5HT_{1A} receptors and previous

stressful experience. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 3, p. 410–419, 1 mar. 2014.

FOSTER, R. et al. Calprotectin in microglia from frontal cortex is up-regulated in schizophrenia: evidence for an inflammatory process? **The European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 12, p. 3561–3566, dez. 2006.

FRANCESCHI, C. et al. Inflammaging and ‘Garb-aging’. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 199–212, 1 mar. 2017.

FRITZ, M. et al. Structural and biochemical imaging reveals systemic LPS-induced changes in the rat brain. **Journal of neuroimmunology**, v. 348, p. 577367, 15 nov. 2020.

FU, Z. et al. Cannabidiol regulates apoptosis and autophagy in inflammation and cancer: A review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1094020, 2023.

GÁLVEZ, V. et al. Long-lasting effects of a single subcutaneous dose of ketamine for treating melancholic depression: a case report. **Biological Psychiatry**, v. 76, n. 3, p. e1-2, 1 ago. 2014.

GASSEN, N. C. et al. Association of FKBP51 with Priming of Autophagy Pathways and Mediation of Antidepressant Treatment Response: Evidence in Cells, Mice, and Humans. **PLOS Medicine**, v. 11, n. 11, p. e1001755, 11 nov. 2014.

GELMETTI, V. et al. PINK1 and BECN1 relocate at mitochondria-associated membranes during mitophagy and promote ER-mitochondria tethering and autophagosome formation. **Autophagy**, v. 13, n. 4, p. 654–669, 17 fev. 2017.

GHODKE-PURANIK, Y. et al. Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 23, n. 4, p. 236–241, abr. 2013.

GLUSCHKO, A. et al. Macrophages target *Listeria monocytogenes* by two discrete non-canonical autophagy pathways. **Autophagy**, v. 18, n. 5, p. 1090–1107, maio 2022.

GO, Y. Y. et al. Cannabidiol enhances cytotoxicity of anti-cancer drugs in human head and neck squamous cell carcinoma. **Scientific Reports**, v. 10, p. 20622, 26 nov. 2020.

GOBBI, G. et al. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 51, p. 18620–18625, 20 dez. 2005.

GOINGS, G. E.; KOZLOWSKI, D. A.; SZELE, F. G. Differential activation of microglia in neurogenic versus non-neurogenic regions of the forebrain. **Glia**, v. 54, n. 4, p. 329–342, set. 2006.

GOLDFARB, S. et al. Electric neurostimulation regulates microglial activation via retinoic acid receptor α signaling. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 96, p. 40–53, ago. 2021.

GONÇALVES DE ANDRADE, E.; GONZÁLEZ IBÁÑEZ, F.; TREMBLAY, M.-È. Microglia as a Hub for Suicide Neuropathology: Future Investigation and Prevention Targets. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 16, p. 839396, 18 maio 2022.

GORZALKA, B. B.; HILL, M. N. Putative role of endocannabinoid signaling in the etiology of depression and actions of antidepressants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1575–1585, 15 ago. 2011.

GREEN, K. N.; CRAPSER, J. D.; HOHSFIELD, L. A. To Kill a Microglia: A Case for CSF1R Inhibitors. **Trends in Immunology**, Special Issue: Microglia and Astrocytes. v. 41, n. 9, p. 771–784, 1 set. 2020.

GREEN, L. C. et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 12, p. 7764–7768, dez. 1981.

GREENBERG, P. E. et al. The Economic Burden of Adults with Major Depressive Disorder in the United States (2010 and 2018). **Pharmacoeconomics**, v. 39, n. 6, p. 653–665, jun. 2021.

GRIGOLEIT, J.-S. et al. Dose-Dependent Effects of Endotoxin on Neurobehavioral Functions in Humans. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e28330, 2 dez. 2011.

GUILLEMIN, G. J. et al. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, n. 4, p. 842–853, ago. 2001.

GUILLEMIN, G. J. et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. **Glia**, v. 49, n. 1, p. 15–23, 1 jan. 2005.

GUO, F. et al. Autophagy in neurodegenerative diseases: pathogenesis and therapy. **Brain Pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 28, n. 1, p. 3–13, jan. 2018.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P.-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature Medicine**, v. 21, n. 7, p. 677–687, jul. 2015.

GUO, S.; WANG, H.; YIN, Y. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 14, p. 815347, 16 fev. 2022.

HAAPAKOSKI, R. et al. Innate and adaptive immunity in the development of depression: An update on current knowledge and technological advances. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 66, p. 63–72, 3 abr. 2016.

HANNESTAD, J. et al. The neuroinflammation marker translocator protein is not elevated in individuals with mild-to-moderate depression: A [11C]PBR28 PET study. **Brain, behavior, and immunity**, v. 33, p. 131–138, out. 2013.

HAO, F.; FENG, Y. Cannabidiol (CBD) enhanced the hippocampal immune response and autophagy of APP/PS1 Alzheimer's mice uncovered by RNA-seq. **Life Sciences**, v. 264, p. 118624, 1 jan. 2021.

HARRIS, J. et al. Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 11, p. 9587–9597, 18 mar. 2011.

HARRISON, N. A. et al. A Neurocomputational Account of How Inflammation Enhances Sensitivity to Punishments Versus Rewards. **Biological Psychiatry**, v. 80, n. 1, p. 73–81, 1 jul. 2016.

HARVEY, D. J.; MECHOULAM, R. Metabolites of cannabidiol identified in human urine. **Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems**, v. 20, n. 3, p. 303–320, mar. 1990.

HASSAN, S. et al. Cannabidiol enhances microglial phagocytosis via transient receptor potential (TRP) channel activation: Cannabidiol enhances microglial phagocytosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 9, p. 2426–2439, maio 2014.

HE, C.; SUMPTER, JR., Rhea; LEVINE, B. Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. **Autophagy**, v. 8, n. 10, p. 1548–1551, 16 out. 2012.

HE, M. et al. AZD8055 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis via the mTOR/ROS/NLRP3 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 573, p. 27–34, 8 out. 2021a.

HE, Y. et al. p38 MAPK inhibits autophagy and promotes microglial inflammatory responses by phosphorylating ULK1. **Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 1, p. 315–328, 1 dez. 2017.

HE, Y. et al. Mouse primary microglia respond differently to LPS and poly(I:C) in vitro. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 10447, 17 maio 2021b.

HEALY, L. M.; ZIA, S.; PLEMEL, J. R. Towards a definition of microglia heterogeneity. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 20 out. 2022.

HEIDER, C. G. et al. Mechanisms of Cannabidiol (CBD) in Cancer Treatment: A Review. **Biology**, v. 11, n. 6, p. 817, 26 maio 2022.

HENIS-KORENBLIT, S.; MELÉNDEZ, A. Methods to determine the role of autophagy proteins in *C. elegans* aging. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1880, p. 561–586, 2019.

HENRY, C. J. et al. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, p. 15, 13 maio 2008.

HICKMAN, S. et al. Microglia in neurodegeneration. **Nature Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 1359–1369, out. 2018.

HILLARD, C. J.; LIU, Q. Endocannabinoid signaling in the etiology and treatment of major depressive illness. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 23, p. 3795–3811, 2014.

HINDOCHA, C. et al. Acute effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and their combination on facial emotion recognition: A randomised, double-blind, placebo-controlled study in cannabis users. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 3, p. 325–334, 1 mar. 2015.

HOCHSCHILD, A.; GRUNEBAUM, M. F.; MANN, J. J. The rapid anti-suicidal ideation effect of ketamine: A systematic review. **Preventive Medicine**, v. 152, n. Pt 1, p. 106524, nov. 2021.

HORIKAWA, N. et al. Incidence and clinical course of major depression in patients with chronic hepatitis type C undergoing interferon-alpha therapy: a prospective study. **General Hospital Psychiatry**, v. 25, n. 1, p. 34–38, 2003.

HSU, S. P. C. et al. Rapamycin and hydroxychloroquine combination alters macrophage polarization and sensitizes glioblastoma to immune checkpoint inhibitors. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 146, n. 3, p. 417–426, 1 fev. 2020.

HUESTIS, M. A. Human Cannabinoid Pharmacokinetics. **Chemistry & biodiversity**, v. 4, n. 8, p. 1770–1804, ago. 2007.

HUNG, K.-C. et al. Baicalein attenuates α -synuclein aggregation, inflammasome activation and autophagy in the MPP⁺-treated nigrostriatal dopaminergic system in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 522–529, 24 dez. 2016.

HURD, Y. L. et al. Cannabidiol for the Reduction of Cue-Induced Craving and Anxiety in Drug-Abstinent Individuals With Heroin Use Disorder: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. **The American Journal of Psychiatry**, v. 176, n. 11, p. 911–922, 1 nov. 2019.

HWANG, H.-Y. et al. Antidepressant drug sertraline modulates AMPK-MTOR signaling-mediated autophagy via targeting mitochondrial VDAC1 protein. **Autophagy**, v. 17, n. 10, p. 2783–2799, 3 out. 2021.

IBEAS BIH, C. et al. Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 699–730, out. 2015.

JANDA, E.; BOI, L.; CARTA, A. R. Microglial Phagocytosis and Its Regulation: A Therapeutic Target in Parkinson's Disease? **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, 2018.

JAVVAJI, P. K. et al. An Efficient Nitroblue Tetrazolium Staining and Bright-Field Microscopy Based Method for Detecting and Quantifying Intracellular Reactive Oxygen Species in Oocytes, Cumulus Cells and Embryos. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 764, 4 ago. 2020.

JETTO, C. T.; NAMBIAR, A.; MANJITHAYA, R. Mitophagy and Neurodegeneration: Between the Knowns and the Unknowns. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 2022.

JIA, X. et al. Rapamycin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting IL-1 β and IL-18 production. **International Immunopharmacology**, v. 67, p. 211–219, 1 fev. 2019.

JIANG, P. et al. Salvianolic acid B protects against lipopolysaccharide-induced behavioral deficits and neuroinflammatory response: involvement of autophagy and NLRP3 inflammasome. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 239, 6 dez. 2017.

JIN, M.-M. et al. A Critical Role of Autophagy in Regulating Microglia Polarization in Neurodegeneration. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 10, p. 378, 2018.

JÜLG, J.; STROHM, L.; BEHRENDTS, C. Canonical and Noncanonical Autophagy Pathways in Microglia. **Molecular and Cellular Biology**, v. 41, n. 3, p. e00389-20, 23 fev. 2021.

JUNG, S.; JEONG, H.; YU, S.-W. Autophagy as a decisive process for cell death. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 6, p. 921–930, jun. 2020.

KANEKO, N.; NAKAMURA, S.; SAWAMOTO, K. Effects of interferon-alpha on hippocampal neurogenesis and behavior in common marmosets. **Molecular Brain**, v. 13, n. 1, p. 98, 26 jun. 2020.

KANG, J.-B. et al. Lipopolysaccharide induces neuroglia activation and NF- κ B activation in cerebral cortex of adult mice. **Laboratory Animal Research**, v. 35, n. 1, p. 19, 16 out. 2019.

KARNIOL, I. G. et al. Cannabidiol interferes with the effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in man. **European Journal of Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 172–177, 1 set. 1974.

KATSURAGI, Y.; ICHIMURA, Y.; KOMATSU, M. Regulation of the Keap1–Nrf2 pathway by p62/SQSTM1. **Current Opinion in Toxicology, Oxidative Toxicology**, v. 1, p. 54–61, 1 dez. 2016.

KAUFMAN, J. et al. The 5-HT1A receptor in Major Depressive Disorder. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 3, p. 397–410, mar. 2016.

KENNEDY, S. H. Core symptoms of major depressive disorder: relevance to diagnosis and treatment. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 271–277, 2008.

KHOURY, R. et al. Autophagy regulates the release of exercise factors and their beneficial effects on spatial memory recall. **Heliyon**, v. 9, n. 4, p. e14705, 1 abr. 2023.

KIM, H.-J. et al. Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 11, p. 1576–1584, nov. 2017.

- KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. **Autophagy**, v. 17, n. 1, p. 1–382, jan. 2021.
- KREISEL, T. et al. Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. **Molecular Psychiatry**, v. 19, n. 6, p. 699–709, jun. 2014.
- KULKARNI, A. et al. Differential regulation of autophagy during metabolic stress in astrocytes and neurons. **Autophagy**, v. 16, n. 9, p. 1651–1667, 1 set. 2020.
- KUMAR, A. V.; MILLS, J.; LAPIERRE, L. R. Selective Autophagy Receptor p62/SQSTM1, a Pivotal Player in Stress and Aging. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 2022.
- KUNTZEL, T.; BAGNARD, D. Manipulating Macrophage/Microglia Polarization to Treat Glioblastoma or Multiple Sclerosis. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 2, p. 344, fev. 2022.
- LAPRAIRIE, R. B. et al. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 20, p. 4790–4805, 2015.
- LASSELIN, J. Back to the future of psychoneuroimmunology: Studying inflammation-induced sickness behavior. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 18, p. 100379, 24 out. 2021.
- LAUCKNER, J. E. et al. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 7, p. 2699–2704, 19 fev. 2008.
- LEE, J.-W. et al. TLR4 (toll-like receptor 4) activation suppresses autophagy through inhibition of FOXO3 and impairs phagocytic capacity of microglia. **Autophagy**, v. 15, n. 5, p. 753–770, 13 dez. 2018.
- LEE, J.-Y. et al. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. **The EMBO Journal**, v. 29, n. 5, p. 969–980, 3 mar. 2010.
- LEWEKE, F. M. et al. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. **Translational Psychiatry**, v. 2, n. 3, p. e94–e94, mar. 2012.
- LI, Y. et al. Mir223 restrains autophagy and promotes CNS inflammation by targeting ATG16L1. **Autophagy**, v. 15, n. 3, p. 478–492, 22 set. 2018.
- LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, fev. 2007.
- LIANG, Y. Emerging Concepts and Functions of Autophagy as a Regulator of Synaptic Components and Plasticity. **Cells**, v. 8, n. 1, p. 34, 9 jan. 2019.

- LIM, J. et al. Proteotoxic stress induces phosphorylation of p62/SQSTM1 by ULK1 to regulate selective autophagic clearance of protein aggregates. **PLoS genetics**, v. 11, n. 2, p. e1004987, 2015.
- LIMA, J. G. B. et al. Phagocytosis is inhibited by autophagic induction in murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 405, n. 4, p. 604–609, 25 fev. 2011.
- LIN, T.-K. et al. Resveratrol partially prevents rotenone-induced neurotoxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells through induction of heme oxygenase-1 dependent autophagy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 1, p. 1625–1646, 22 jan. 2014.
- LINGE, R. et al. Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT1A receptors. **Neuropharmacology**, v. 103, p. 16–26, abr. 2016.
- LIU, J. J. et al. Peripheral cytokine levels and response to antidepressant treatment in depression: a systematic review and meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, v. 25, n. 2, p. 339–350, fev. 2020.
- LIU, Y. et al. Ketamine abuse potential and use disorder. **Brain Research Bulletin**, v. 126, n. Pt 1, p. 68–73, set. 2016.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LIVELY, S.; SCHLICHTER, L. C. The microglial activation state regulates migration and roles of matrix-dissolving enzymes for invasion. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, p. 75, 21 jun. 2013.
- LIVELY, S.; SCHLICHTER, L. C. Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, 2018.
- LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 14, p. 1563–1586, 2009.
- LOTTRICH, F. E. Major depression during interferon- α treatment: vulnerability and prevention. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 4, p. 417–425, dez. 2009.
- LOTTRICH, F. E. et al. The relationship between interleukin-1 receptor antagonist and cognitive function in older adults with bipolar disorder. **International journal of geriatric psychiatry**, v. 29, n. 6, p. 635–644, jun. 2014.
- LOTTE, E. N.; COX, D. N. Homeostatic Roles of the Proteostasis Network in Dendrites. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, 2020.
- LU, M. et al. Metformin Prevents Dopaminergic Neuron Death in MPTP/P-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease via Autophagy and Mitochondrial ROS

- Clearance. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 9, p. pyw047, 1 set. 2016.
- LU, R.; ZHANG, L.; YANG, X. Interaction between autophagy and the NLRP3 inflammasome in Alzheimer's and Parkinson's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 14, 2022.
- LUCAS, C. J.; GALETTIS, P.; SCHNEIDER, J. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 11, p. 2477–2482, nov. 2018.
- LUGO-HUITRÓN, R. et al. Quinolinic acid: an endogenous neurotoxin with multiple targets. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 104024, 2013.
- LUNING PRAK, E. T. et al. No increase in inflammation in late-life major depression screened to exclude physical illness. **Translational Psychiatry**, v. 12, n. 1, p. 118, 24 mar. 2022.
- MACHADO-VIEIRA, R. et al. The Timing of Antidepressant Effects: A Comparison of Diverse Pharmacological and Somatic Treatments. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 1, p. 19–41, 6 jan. 2010.
- MAES, M. et al. Depression-related disturbances in mitogen-induced lymphocyte responses and interleukin-1 beta and soluble interleukin-2 receptor production. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 84, n. 4, p. 379–386, out. 1991.
- MAES, M. et al. Plasma soluble interleukin-2-receptor in depression: relationships to plasma neopterin and serum IL-2 concentrations and HPA-axis activity. **European Psychiatry**, v. 10, n. 8, p. 397–403, ed 1995.
- MAES, M. Major depression and activation of the inflammatory response system. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 461, p. 25–46, 1999.
- MAES, M. Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 664–675, 29 abr. 2011.
- MÁRQUEZ-ROPERO, M. et al. Microglial Corpse Clearance: Lessons From Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.
- MARTINET, W. et al. Phagocytosis of bacteria is enhanced in macrophages undergoing nutrient deprivation. **The FEBS Journal**, v. 276, n. 8, p. 2227–2240, 2009.
- MARTINEZ, J. et al. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 42, p. 17396–17401, 18 out. 2011.
- MARTÍNEZ-PINILLA, E. et al. Binding and Signaling Studies Disclose a Potential Allosteric Site for Cannabidiol in Cannabinoid CB2 Receptors. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 2017.

- MARTÍN-MORENO, A. M. et al. Cannabidiol and Other Cannabinoids Reduce Microglial Activation In Vitro and In Vivo: Relevance to Alzheimer's Disease. **Molecular Pharmacology**, v. 79, n. 6, p. 964–973, jun. 2011.
- MATSUMOTO, G. et al. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. **Molecular Cell**, v. 44, n. 2, p. 279–289, 21 out. 2011.
- MAZZA, M. G. et al. Post-COVID-19 Depressive Symptoms: Epidemiology, Pathophysiology, and Pharmacological Treatment. **CNS Drugs**, v. 36, n. 7, p. 681–702, 2022.
- MEINHARDT, J. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. **Nature Neuroscience**, v. 24, n. 2, p. 168–175, fev. 2021.
- MORGAN, C. J. A. et al. Long-Term Heavy Ketamine Use is Associated with Spatial Memory Impairment and Altered Hippocampal Activation. **Frontiers in Psychiatry**, v. 5, 2014.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.
- MÜNZ, C. Autophagy proteins in antigen processing for presentation on MHC molecules. **Immunological Reviews**, v. 272, n. 1, p. 17–27, 2016.
- MURTHY, A. et al. A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. **Nature**, v. 506, n. 7489, p. 456–462, fev. 2014.
- NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161–1169, out. 2010.
- NG, N. S.; OOI, L. A Simple Microplate Assay for Reactive Oxygen Species Generation and Rapid Cellular Protein Normalization. **Bio-protocol**, v. 11, n. 1, p. e3877, 5 jan. 2021.
- NIKOLAKOPOULOU, A. M. et al. Activated microglia enhance neurogenesis via trypsinogen secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 21, p. 8714–8719, 21 maio 2013.
- NOLLET, M.; LE GUIQUET, A.-M.; BELZUNG, C. Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice. **Current Protocols in Pharmacology**, v. Chapter 5, p. Unit 5.65, jun. 2013.
- NORDGREEN, J. et al. The effect of lipopolysaccharide (LPS) on inflammatory markers in blood and brain and on behavior in individually-housed pigs. **Physiology & Behavior**, v. 195, p. 98–111, 15 out. 2018.
- O'CONNOR, J. C. et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 5, p. 511–522, maio 2009.

OGIMOTO, K.; HARRIS, M. K., Jr.; WISSE, B. E. MyD88 Is a Key Mediator of Anorexia, But Not Weight Loss, Induced by Lipopolysaccharide and Interleukin-1 β . **Endocrinology**, v. 147, n. 9, p. 4445–4453, 1 set. 2006.

OSIMO, E. F. et al. Inflammatory markers in depression: A meta-analysis of mean differences and variability in 5,166 patients and 5,083 controls. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 87, p. 901–909, jul. 2020.

OTABE, H. et al. Electroconvulsive seizures enhance autophagy signaling in rat hippocampus. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 50, p. 37–43, 3 abr. 2014.

PACE, T. W. W. et al. Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. **The American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 9, p. 1630–1633, set. 2006.

PACE, T. W. W.; HU, F.; MILLER, A. H. Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 1, p. 9–19, jan. 2007.

PARK, H.-J. et al. IL-10 inhibits the starvation induced autophagy in macrophages via class I phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway. **Molecular Immunology**, v. 48, n. 4, p. 720–727, jan. 2011.

PARKHURST, C. N. et al. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. **Cell**, v. 155, n. 7, p. 1596–1609, 19 dez. 2013.

PERTWEE, R. G. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ 9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ 9-tetrahydrocannabivarin. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 199–215, jan. 2008.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; WALTER, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**, v. 202, p. 8–32, dez. 2004.

PIGOTT, H. E. The STAR*D Trial: It Is Time to Reexamine the Clinical Beliefs That Guide the Treatment of Major Depression. **Canadian Journal of Psychiatry. Revue Canadienne de Psychiatrie**, v. 60, n. 1, p. 9–13, jan. 2015.

PINTO, E. F.; ANDRADE, C. Interferon-Related Depression: A Primer on Mechanisms, Treatment, and Prevention of a Common Clinical Problem. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 7, p. 743–748, out. 2016.

PLAZA-ZABALA, A.; SIERRA-TORRE, V.; SIERRA, A. Autophagy and Microglia: Novel Partners in Neurodegeneration and Aging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 598, mar. 2017.

PORTENOY, R. K. et al. Nabiximols for Opioid-Treated Cancer Patients With Poorly-Controlled Chronic Pain: A Randomized, Placebo-Controlled, Graded-Dose Trial. **The Journal of Pain**, v. 13, n. 5, p. 438–449, 1 maio 2012.

- PU, Q. et al. Atg7 Deficiency Intensifies Inflammasome Activation and Pyroptosis in Pseudomonas Sepsis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 198, n. 8, p. 3205–3213, 15 abr. 2017.
- RADULOVIC, K. et al. Injections of Lipopolysaccharide into Mice to Mimic Entrance of Microbial-derived Products After Intestinal Barrier Breach. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 135, 2018.
- RAMÍREZ, K. et al. A Protocol to Perform Systemic Lipopolysaccharide (LPS) Challenge in Rats. **Odovtos International Journal of Dental Sciences**, v. 21, n. 1, p. 53–66, abr. 2019.
- RANSOHOFF, R. M. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 987–991, ago. 2016.
- RAZANI, B. et al. Autophagy Links Inflammasomes to Atherosclerotic Progression. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 4, p. 534–544, 4 abr. 2012.
- RESSTEL, L. B. M. et al. 5-HT 1A receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, n. 1, p. 181–188, 2009.
- RÉUS, G. Z. et al. Administration of cannabidiol and imipramine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases brain-derived neurotrophic factor levels in the rat amygdala. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 23, n. 5, p. 241–248, out. 2011.
- ROBINSON, E. et al. A systematic review and meta-analysis of longitudinal cohort studies comparing mental health before versus during the COVID-19 pandemic in 2020. **Journal of Affective Disorders**, v. 296, p. 567–576, 1 jan. 2022.
- ROMAO, S. et al. Autophagy proteins stabilize pathogen-containing phagosomes for prolonged MHC II antigen processing. **Journal of Cell Biology**, v. 203, n. 5, p. 757–766, 9 dez. 2013.
- RUÉ, L. et al. Brain region- and age-dependent dysregulation of p62 and NBR1 in a mouse model of Huntington's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 52, p. 219–228, 1 abr. 2013.
- RUIZ, A. et al. Effect of hydroxychloroquine and characterization of autophagy in a mouse model of endometriosis. **Cell Death & Disease**, v. 7, n. 1, p. e2059–e2059, jan. 2016.
- RUSH, A. J. et al. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. **The American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 11, p. 1905–1917, nov. 2006.
- RUSSO, E. B. et al. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. **Neurochemical Research**, v. 30, n. 8, p. 1037–1043, ago. 2005.
- SAITOH, T. et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. **Nature**, v. 456, n. 7219, p. 264–268, 13 nov. 2008.

- SALES, A. J. et al. Antidepressant-like effect induced by Cannabidiol is dependent on brain serotonin levels. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 86, p. 255–261, ago. 2018.
- SALES, A. J. et al. Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 2, p. 1070–1081, fev. 2019.
- SALIM, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 201–205, jan. 2017.
- SAMPSON, P. B. Phytocannabinoid Pharmacology: Medicinal Properties of Cannabis sativa Constituents Aside from the “Big Two”. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 1, p. 142–160, 22 jan. 2021.
- SANJUAN, M. A. et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. **Nature**, v. 450, n. 7173, p. 1253–1257, dez. 2007.
- SANTOMAURO, D. F. et al. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, v. 398, n. 10312, p. 1700–1712, 6 nov. 2021.
- SARKAR, S. et al. Complex Inhibitory Effects of Nitric Oxide on Autophagy. **Molecular Cell**, v. 43, n. 1, p. 19–32, 8 jul. 2011.
- SARTIM, A. G. et al. Co-administration of cannabidiol and ketamine induces antidepressant-like effects devoid of hyperlocomotor side-effects. **Neuropharmacology**, v. 195, p. 108679, 1 set. 2021.
- SAYLOR, D. et al. HIV-associated neurocognitive disorder--pathogenesis and prospects for treatment. **Nature Reviews. Neurology**, v. 12, n. 4, p. 234–248, abr. 2016.
- SCHIAVON, A. P. et al. Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 64, p. 27–34, 4 jan. 2016.
- SCHMIDT, U. et al. A role for synapsin in FKBP51 modulation of stress responsiveness: Convergent evidence from animal and human studies. **Psychoneuroendocrinology**, v. 52, p. 43–58, fev. 2015.
- SCHNIEDER, T. P. et al. Microglia of prefrontal white matter in suicide. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 73, n. 9, p. 880–890, set. 2014.
- SEEMAN, P. Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D2High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 10, p. e920, out. 2016.
- SELTZER, E. S. et al. Cannabidiol (CBD) as a Promising Anti-Cancer Drug. **Cancers**, v. 12, n. 11, p. 3203, 30 out. 2020.

SETIAWAN, E. et al. Role of translocator protein density, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes. **JAMA psychiatry**, v. 72, n. 3, p. 268–275, mar. 2015.

SHAHIDEHPOUR, R. K. et al. Dystrophic microglia are associated with neurodegenerative disease and not healthy aging in the human brain. **Neurobiology of Aging**, v. 99, p. 19–27, mar. 2021.

SHANNON, S. et al. Cannabidiol in Anxiety and Sleep: A Large Case Series. **The Permanente Journal**, v. 23, n. 1, p. 18–041, mar. 2019.

SHE, C. et al. Activation of AMPK protects against hydrogen peroxide-induced osteoblast apoptosis through autophagy induction and NADPH maintenance: new implications for osteonecrosis treatment? **Cellular Signalling**, v. 26, n. 1, p. 1–8, jan. 2014.

SHI, C.-S. et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. **Nature Immunology**, v. 13, n. 3, p. 255–263, 29 jan. 2012.

SHI, C.-S.; KEHRL, J. H. MyD88 and Trif Target Beclin 1 to Trigger Autophagy in Macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 48, p. 33175–33182, 28 nov. 2008.

SIL, P.; MUSE, G.; MARTINEZ, J. A ravenous defense: canonical and non-canonical autophagy in immunity. **Current opinion in immunology**, v. 50, p. 21–31, fev. 2018.

SILOTE, G. P. et al. Emerging evidence for the antidepressant effect of cannabidiol and the underlying molecular mechanisms. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 98, p. 104–116, jul. 2019.

SILOTE, G. P. et al. Strain-, Sex-, and Time-Dependent Antidepressant-like Effects of Cannabidiol. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 12, p. 1269, 6 dez. 2021.

SMITH, R. S. The macrophage theory of depression. **Medical Hypotheses**, v. 35, n. 4, p. 298–306, ago. 1991.

SOLOWIJ, N. et al. Therapeutic Effects of Prolonged Cannabidiol Treatment on Psychological Symptoms and Cognitive Function in Regular Cannabis Users: A Pragmatic Open-Label Clinical Trial. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 3, n. 1, p. 21–34, dez. 2018.

STAVOE, A. K. H.; HOLZBAUR, E. L. F. Autophagy in Neurons. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 35, p. 477–500, 6 out. 2019.

STEINER, J. et al. Severe depression is associated with increased microglial quinolinic acid in subregions of the anterior cingulate gyrus: Evidence for an immune-modulated glutamatergic neurotransmission? **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 94, 10 ago. 2011.

STRANKS, A. J. et al. Autophagy Controls Acquisition of Aging Features in Macrophages. **Journal of Innate Immunity**, v. 7, n. 4, p. 375–391, 10 mar. 2015.

- SU, P. et al. The role of autophagy in modulation of neuroinflammation in microglia. **Neuroscience**, v. 319, p. 155–167, 5 abr. 2016.
- SU, W.-J. et al. NLRP3 gene knockout blocks NF- κ B and MAPK signaling pathway in CUMS-induced depression mouse model. **Behavioural Brain Research**, v. 322, p. 1–8, 30 mar. 2017.
- SUGAMA, S.; KAKINUMA, Y. Stress and brain immunity: Microglial homeostasis through hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis and sympathetic nervous system. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 7, p. 100111, 1 ago. 2020.
- TAKAHASHI, T. et al. Environmental enrichment enhances autophagy signaling in the rat hippocampus. **Brain Research**, v. 1592, p. 113–123, 10 dez. 2014.
- TANG, G. et al. Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. **Neuron**, v. 83, n. 5, p. 1131–1143, 3 set. 2014.
- TANG, M. et al. The interaction between autophagy and neuroinflammation in major depressive disorder: From pathophysiology to therapeutic implications. **Pharmacological Research**, v. 168, p. 105586, 1 jun. 2021.
- TANIDA, I.; UENO, T.; KOMINAMI, E. LC3 and Autophagy. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 445, p. 77–88, 2008.
- TAY, T. L. et al. Microglia Gone Rogue: Impacts on Psychiatric Disorders across the Lifespan. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, p. 421, 4 jan. 2018.
- TAYLOR, L. et al. A Phase I, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose, Multiple Dose, and Food Effect Trial of the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Highly Purified Cannabidiol in Healthy Subjects. **CNS Drugs**, v. 32, n. 11, p. 1053–1067, 1 nov. 2018.
- TEDESCO, B. et al. The chaperone-assisted selective autophagy complex dynamics and dysfunctions. **Autophagy**, p. 1–23, 3 jan. 2023.
- THOMÉ, M. P. et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 24, p. 4622–4632, 15 dez. 2016.
- TITO, P. A. L. et al. Cannabidiol prevents lipopolysaccharide-induced sickness behavior and alters cytokine and neurotrophic factor levels in the brain. **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 6, p. 1680–1693, 1 dez. 2021.
- TOMAZ, V. DE S. et al. Antidepressants of different classes cause distinct behavioral and brain pro- and anti-inflammatory changes in mice submitted to an inflammatory model of depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 268, p. 188–200, 1 maio 2020.
- TONG, L. et al. Microglia Loss Contributes to the Development of Major Depression Induced by Different Types of Chronic Stresses. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 10, p. 2698–2711, 1 out. 2017.

- TORRES-PLATAS, S. G. et al. Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 42, p. 50–59, nov. 2014.
- TREMBLAY, M.-È. Microglial functional alteration and increased diversity in the challenged brain: Insights into novel targets for intervention. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 16, p. 100301, 1 out. 2021.
- TREMBLAY, M.-È.; LOWERY, R. L.; MAJEWSKA, A. K. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. **PLoS biology**, v. 8, n. 11, p. e1000527, 2 nov. 2010.
- TRIPATHI, D. N. et al. Reactive nitrogen species regulate autophagy through ATM-AMPK-TSC2-mediated suppression of mTORC1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 32, p. E2950–E2957, 6 ago. 2013.
- TROUBAT, R. et al. Neuroinflammation and depression: A review. **The European Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 1, p. 151–171, jan. 2021.
- TUNC, O.; THOMPSON, J.; TREMELLEN, K. Development of the NBT assay as a marker of sperm oxidative stress. **International Journal of Andrology**, v. 33, n. 1, p. 13–21, 2010.
- TÜRKER, F.; COOK, E. K.; MARGOLIS, S. S. The Proteasome and its Role in the Nervous System. **Cell chemical biology**, v. 28, n. 7, p. 903–917, 15 jul. 2021.
- TURNER, S. E. et al. Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v. 103, p. 61–101, 2017.
- UJVÁRY, I.; HANUŠ, L. Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on Their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 1, n. 1, p. 90–101, 1 mar. 2016.
- VAN EEDEN, W. A. et al. Basal and LPS-stimulated inflammatory markers and the course of individual symptoms of depression. **Translational Psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 15 jul. 2020.
- VARNUM, M. M.; IKEZU, T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, v. 60, n. 4, p. 251–266, ago. 2012.
- VENTURINO, A. et al. Microglia enable mature perineuronal nets disassembly upon anesthetic ketamine exposure or 60-Hz light entrainment in the healthy brain. **Cell Reports**, v. 36, n. 1, p. 109313, 6 jul. 2021.
- VIDYADHARA, D. J. et al. Dopamine transporter and synaptic vesicle sorting defects underlie auxilin-associated Parkinson's disease. **Cell Reports**, v. 42, n. 3, p. 112231, 28 mar. 2023.
- VRECHI, T. A. M. et al. Cannabidiol induces autophagy via ERK1/2 activation in neural cells. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 5434, 8 mar. 2021.

- WAKE, H. et al. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 13, p. 3974–3980, 1 abr. 2009.
- WALLET, C. et al. Microglial Cells: The Main HIV-1 Reservoir in the Brain. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 2019.
- WANG, C. et al. Microglia mediate forgetting via complement-dependent synaptic elimination. **Science (New York, N.Y.)**, v. 367, n. 6478, p. 688–694, 7 fev. 2020.
- WANG, H. et al. Microglia in depression: an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 132, 6 jun. 2022a.
- WANG, P. et al. Hypoxia inducible factor-1 α regulates autophagy via the p27-E2F1 signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 2, p. 2107–2112, ago. 2017.
- WANG, Y.; LIU, N.; LU, B. Mechanisms and roles of mitophagy in neurodegenerative diseases. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 25, n. 7, p. 859–875, 2 maio 2019.
- WANG, Z. et al. Cannabidiol induces autophagy and improves neuronal health associated with SIRT1 mediated longevity. **GeroScience**, v. 44, n. 3, p. 1505–1524, jun. 2022b.
- WEN, J.-H. et al. Is LysM-Cre a good candidate Cre for knocking out Atg5 gene in mice? **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 964496, 26 ago. 2022.
- WIECKIEWICZ, G. et al. Cannabidiol (CBD) in the Self-Treatment of Depression- Exploratory Study and a New Phenomenon of Concern for Psychiatrists. **Frontiers in Psychiatry**, v. 13, p. 837946, 22 mar. 2022.
- WOHLEB, E. S. et al. β -Adrenergic Receptor Antagonism Prevents Anxiety-Like Behavior and Microglial Reactivity Induced by Repeated Social Defeat. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 17, p. 6277–6288, 27 abr. 2011.
- WU, J.; LIPINSKI, M. M. Autophagy in Neurotrauma: Good, Bad, or Dysregulated. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 693, 10 jul. 2019.
- WU, M. et al. The Host Autophagy During Toxoplasma Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 589604, 22 out. 2020.
- WU, M.-Y.; LU, J.-H. Autophagy and Macrophage Functions: Inflammatory Response and Phagocytosis. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 70, 27 dez. 2019.
- XIAO, X. et al. Nicotine alleviates chronic stress-induced anxiety and depressive-like behavior and hippocampal neuropathology via regulating autophagy signaling. **Neurochemistry International**, v. 114, p. 58–70, 1 mar. 2018.
- XIAO, X. et al. NADPH-Oxidase 2 Promotes Autophagy in Spinal Neurons During the Development of Morphine Tolerance. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 8, p. 2089–2096, 1 ago. 2021.

- XU, B. et al. Neuroinflammation induced by secretion of acetylated HMGB1 from activated microglia in hippocampi of mice following chronic cold exposure. **Brain Research**, v. 1726, p. 146495, 1 jan. 2020.
- YAN, J. et al. SQSTM1/p62 Interacts with HDAC6 and Regulates Deacetylase Activity. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. e76016, 27 set. 2013.
- YANG, G. et al. The AMPK pathway triggers autophagy during CSF1-induced microglial activation and may be implicated in inducing neuropathic pain. **Journal of Neuroimmunology**, v. 345, p. 577261, 15 ago. 2020.
- YANG, S. et al. Cannabidiol Enhances Microglial Beta-Amyloid Peptide Phagocytosis and Clearance via Vanilloid Family Type 2 Channel Activation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 5367, jan. 2022.
- YANG, Z. et al. Hypoxia induces microglia autophagy and neural inflammation injury in focal cerebral ischemia model. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 98, n. 2, p. 219–224, 1 abr. 2015.
- YE, X. et al. Lipopolysaccharide induces neuroinflammation in microglia by activating the MTOR pathway and downregulating Vps34 to inhibit autophagosome formation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 18, 11 jan. 2020.
- YEUNG, C. H. T. et al. Verifying in vitro-determined enzyme contributions to cannabidiol clearance for exposure predictions in human through physiologically-based pharmacokinetic modeling. **CPT: pharmacometrics & systems pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 320–332, mar. 2023.
- YIRMIYA, R.; RIMMERMAN, N.; RESHEF, R. Depression as a microglial disease. **Trends in Neurosciences**, v. 38, n. 10, p. 637–658, out. 2015.
- YOUSEFI, S. et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 1124–1132, out. 2006.
- YUNNA, C. et al. Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, v. 877, p. 173090, 15 jun. 2020.
- ZANELATI, T. V. et al. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 1, p. 122–128, jan. 2010.
- ZHAN, Y. et al. HDAC6 Regulates the Fusion of Autophagosome and Lysosome to Involve in Odontoblast Differentiation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020.
- ZHANG, C. Flare-up of cytokines in rheumatoid arthritis and their role in triggering depression: Shared common function and their possible applications in treatment (Review). **Biomedical Reports**, v. 14, n. 1, p. 16, jan. 2021.
- ZHANG, L.; WANG, H. Autophagy in Traumatic Brain Injury: A New Target for Therapeutic Intervention. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, p. 190, 5 jun. 2018.

ZHANG, M. et al. SIRT3 Protects Rotenone-induced Injury in SH-SY5Y Cells by Promoting Autophagy through the LKB1-AMPK-mTOR Pathway. **Aging and Disease**, v. 9, n. 2, p. 273–286, 1 abr. 2018.

ZHANG, Y. et al. Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation. **Blood**, v. 119, n. 12, p. 2895–2905, 22 mar. 2012.

ZHANG, Y. et al. NLRP3 Inflammasome Mediates Chronic Mild Stress-Induced Depression in Mice via Neuroinflammation. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 8, p. pyv006, 1 jun. 2015.

ZHENG, L.-S. et al. Mechanisms for Interferon- α -Induced Depression and Neural Stem Cell Dysfunction. **Stem Cell Reports**, v. 3, n. 1, p. 73–84, 26 jun. 2014.

ZHENG, L.-S.; KANEKO, N.; SAWAMOTO, K. Minocycline treatment ameliorates interferon-alpha- induced neurogenic defects and depression-like behaviors in mice. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, 2015.

ZHOU, P. et al. Cytoprotective effect of autophagy on phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. **Experimental Cell Research**, v. 348, n. 2, p. 165–176, 1 nov. 2016.

ZHOU, T. et al. Microglia Polarization with M1/M2 Phenotype Changes in rd1 Mouse Model of Retinal Degeneration. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 11, 2017.

ZHOU, X.-G. et al. Targeting microglial autophagic degradation of the NLRP3 inflammasome for identification of thomningianin A in Alzheimer's disease. **Inflammation and Regeneration**, v. 42, n. 1, p. 25, 3 ago. 2022.

ZSCHOCKE, J. et al. Antidepressant drugs diversely affect autophagy pathways in astrocytes and neurons-dissociation from cholesterol homeostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 8, p. 1754–1768, 2011.

ZUARDI, A. W. et al. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by δ 9-THC in normal subjects. **Psychopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 245–250, 1 mar. 1982.