



**TLR9: Contribución en la resiliencia  
contra los déficits emocionales  
inducidos por la inflamación  
cerebral, el estrés oxidativo y la  
disfunción mitocondrial.**

Tesis Doctoral presentada por

**Álvaro Morcuende Campos**

Director de tesis:

**Dra. TERESA FEMENÍA CANTÓ**

*Programa de Doctorado en Neurociencias*

*Universidad Miguel Hernández de Elche-CSIC*

-2024-





**TLR9: Contribución en la resiliencia  
contra los déficits emocionales inducidos  
por la inflamación cerebral, el estrés  
oxidativo y la disfunción mitocondrial.**

Biblioteca  
Tesis Doctoral presentada por

**Álvaro Morcuende Campos**

- 2024 -

**Director de tesis:**

***Dra. TERESA FEMENÍA CANTÓ***

*Programa de Doctorado en Neurociencias*

*Instituto de Neurociencias*

*Universidad Miguel Hernández de Elche-CSIC*



Sant Joan d'Alacant, 02 de mayo de 2024

D<sup>a</sup>. Teresa Femenía Cantó, directora de la tesis titulada “TLR9: Contribución en la resiliencia contra los déficits emocionales inducidos por la inflamación cerebral, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial”

CERTIFICA:

Que Álvaro Morcuende Campos ha realizado bajo mi supervisión el trabajo titulado “TLR9: Contribución en la resiliencia contra los déficits emocionales inducidos por la inflamación cerebral, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial” de acuerdo con los términos y condiciones establecidos en su Plan de Investigación y de acuerdo con el Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo satisfactoriamente los objetivos previstos para su defensa pública como tesis doctoral.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Dra. Teresa Femenía Cantó

Sant Joan d'Alacant, 02 de mayo de 2024

Sra. María Cruz Morenilla Palao, Coordinadora del Programa de Doctorado en Neurociencias en el Instituto de Neurociencias en Alicante, un centro conjunto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

CERTIFICO:

Que el Sr. Álvaro Morcuende Campos ha llevado a cabo bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado " TLR9: Contribución en la resiliencia contra los déficits emocionales inducidos por la inflamación cerebral, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial", de acuerdo con los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y en cumplimiento del Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, satisfaciendo de manera satisfactoria los objetivos previstos para su defensa pública como tesis doctoral.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Dr. María Cruz Morenilla Palao

Coordinadora del Programa de Doctorado en Neurociencias

Email:

[cruz@umh.es](mailto:cruz@umh.es)

[www.in.umh.es](http://www.in.umh.es)

Tel: +34 96 591 9594

Av Ramón y Cajal s/n

CAMPUS DE SANT JOAN 03550

SANT JOAN D'ALACANT

ALICANTE, ESPAÑA

## AGRADECIMIENTOS

A Teresa, por y apostar por mí y darme la oportunidad para desarrollar mis habilidades investigadoras, cuando tenía perdida toda esperanza de realizar el doctorado. Gracias a ti he aprendido a tener un gran ojo crítico y a cuestionar lo establecido, a centrarme para poder encontrar un camino que me dé la respuesta que necesito en cada momento, siempre desde el máximo rigor y excelencia científica.

A Jorge, que, como tutor me ha sabios consejos para llegar hasta este punto.

A María, que ha sido mi ángel guardián ayudándome en cualquier duda que me ha surgido durante estos 4 años.

Al resto de compañeros del pequeño laboratorio compartido, por los momentos compartidos durante estos años. Con el grupo de Juan Antonio, y sus “predocs”, Rubén y Chema. Como con nuevo grupo de Andreas, y sus integrantes Giovanni, Sofia y especialmente a Kuisong, el cual ha sido un gran amigo en los últimos momentos de la tesis. Os deseo el mayor de los éxitos a todos.

A todos mis amigos, en especial a Anishia e Ilde que han estado estos últimos años conmigo sacándome una sonrisa, necesitamos otra pandemia.

A mis Padres, José y Lola, por su apoyo durante toda mi vida, sin los cuales no estaría aquí. A mis hermanos, Eduardo e Isabel, no os rindáis nunca y luchar por vuestros sueños. A mi familia armenia Anahit y Hovik, los cuales nos han estado apoyando todos estos años *շնորհակալութիւն*.

En especial, quiero agradecer a mi pequeña familia David y Ani, mi razón de ser, con todos nuestros pequeño animalitos Boo, Luna y mi preciosa Moca. David, el hijo más maravilloso que un padre puede tener, ojalá tengas mucha felicidad y éxitos en tu vida. Ani, mi compañera durante estos últimos años, el amor que me has dado y que siento por ti es indescriptible. Me has dado lo mejor que tienes y has sufrido conmigo durante todos estos años, siempre estaré eternamente agradecido contigo. Os quiero mucho.

*Debemos usar el tiempo sabiamente y darnos cuenta que siempre es el momento oportuno para hacer las cosas bien.*

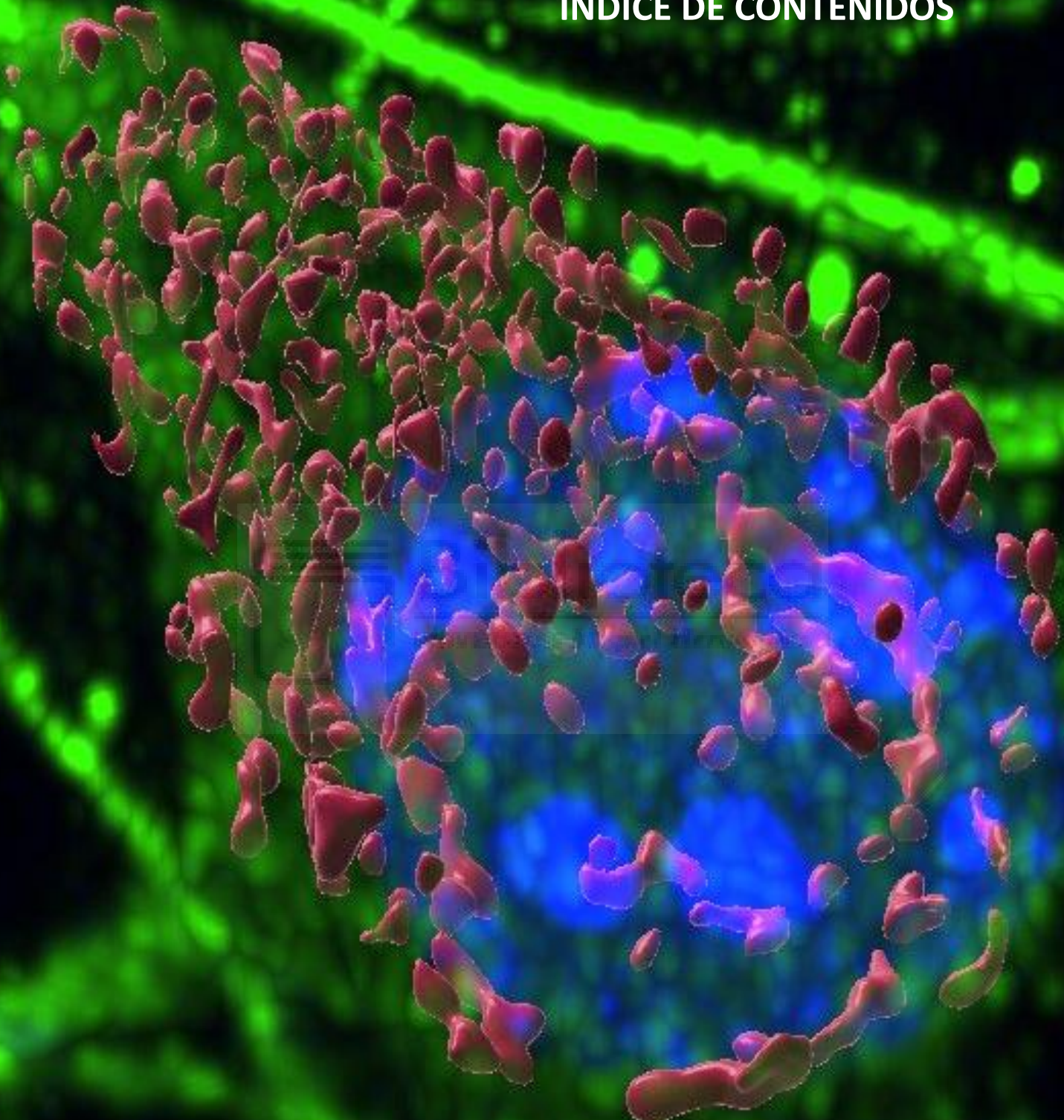


Biblioteca  
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Nelson Mandela



# ÍNDICE DE CONTENIDOS



<b>ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	10
1.1. LA DEPRESION.....	11
1.2. 1.2 NEUROBIOLOGÍA DE LA DEPRESIÓN.....	13
1.3. ESTRUCTURAS CEREBRALES IMPLICADAS EN LA DEPRESIÓN.....	14
1.4. TERAPIA DISPONIBLES PARA TRATAR LA DEPRESIÓN.....	15
1.5. TERAPIAS FARMACOLOGICA ANTIDEPRESIVA.....	16
1.6. LA INFLAMACIÓN EN LA DEPRESIÓN.....	18
1.7. MODELO DE DEPRESIÓN INDUCIDO POR UNA INFLAMACIÓN SISTEMICA.....	21
1.8. RECEPTORES TIPO TOLL.....	22
1.9. RECEPTOR TIPO TOLL 9.....	26
<b>2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</b> .....	30
2.1. Objetivos generales.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b> .....	33
3.1. Modelos Animales.....	34
<b>3.1.1.</b> Animales.....	34
<b>3.1.2.</b> Fármacos .....	34
<b>3.1.3.</b> Diseño experimental.....	34
<b>3.1.4.</b> Estudios conductuales.....	35
3.1.4.1. Test de suspensión por la cola.....	36
3.1.4.2. Caja clara y oscura.....	37
<b>3.1.5.</b> Estudios de expresión génica.....	38
<b>3.1.6.</b> <i>Western Blot</i> .....	39
3.2. CULTIVOS CÉLULARES.....	41
<b>3.2.1.</b> Cultivos primarios neuronales.....	41
<b>3.2.2.</b> Cultivos de línea celular.....	42
<b>3.2.3.</b> Ensayo de Especies Reactivas de Oxígeno.....	42
<b>3.2.4.</b> Inmunomarcaje.....	43
<b>3.2.5.</b> Adquisición y procesamiento de imágenes.....	43
3.3. ANALISIS ESTADISTICO Y TRATAMIENTO DE DATOS.....	45

<b>4. RESULTADOS</b> .....	46
4.1. Efecto del TLR9 en la prueba del test de suspensión por la cola.....	47
4.2. Efecto del TLR9 en la prueba del test de la caja clara y oscura.....	47
4.3. Cambios en la expresión génica de citoquinas proinflamatorias.....	49
4.4. Modulación de la expresión génica de dianas asociadas a la inflamación.....	51
4.5. Cambios de la expresión génica de citoquinas antiinflamatorias.....	53
4.6. Cambios de la expresión proteica de las uniones estrechas.....	57
4.7. Cambios de la expresión proteica de los complejos mitocondrial implicados en la fosforilación oxidativa.....	59
4.8. Alteraciones en los aductos de malonaldehído.....	61
4.9. Visualización de los grupos mediante técnicas de reducción de la dimensionalidad.....	63
4.10. Generación de especies reactivas de oxígeno en células SH-SY5Y.....	67
4.11. Alteraciones en la morfología mitocondrial en cultivos primarios de neuronas.....	69
4.12. Cambios en la longitud de las neuritas en cultivos primarios de neuronas.....	69
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	73
5.1. Primera parte.....	75
<b>5.1.1.</b> La estimulación del TLR9 bloquea el desarrollo de alteraciones conductuales causadas por el LPS.....	75
<b>5.1.2.</b> La estimulación del TLR9 no bloquea la producción de citoquinas proinflamatorias inducida por LPS.....	77
<b>5.1.3.</b> El pretratamiento con ODN 1826 previo al LPS ayuda a la resolución del daño.....	78
<b>5.1.4.</b> Los ratones tratados con ODN1826 muestran un aumento de la respuesta antiinflamatoria tras la administración de LPS.....	82
<b>5.1.5.</b> El LPS afecta de manera diferente a las proteínas que conforman la barrera hematoencefálica en machos y hembras.....	83
<b>5.1.6.</b> La administración de ODN 1826 reduce el complejo mitocondrial I ante un insulto con LPS.....	85
<b>5.1.7.</b> La estimulación del receptor tipo Toll 9 reduce la producción de estrés oxidativo.....	87
<b>5.1.8.</b> Interpretación Integral de Patrones de Grupo a Través de Visualización Multidimensional.....	88

5.2. SEGUNDA PARTE.....	90
<b>5.2.1.</b> La estimulación del receptor tipo Toll 9 bloquea la producción de especies reactivas de oxígeno.....	91
<b>5.2.2.</b> La activación del TLR9 induce mecanismos mitoprotectores en las neuronas.....	92
<b>5.2.3.</b> La administración de ODN 1826 protege del daño neuronal.....	93
<b>CONCLUSIONES</b> .....	95
<b>REFERENCIAS</b> .....	97
<b>ANEXOS</b> .....	116
Anexo I – Efecto TLR9 a largo plazo.....	117
Anexo II – Artículo 1.....	118
Anexo III– Artículo 2.....	147



# LISTADO DE ABREVIATURAS

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**ADP** *Adenosine diphosphate*

**AIM2** *Absent In Melanoma 2*

**ANOVA** Análisis de Varianza

**ARN** Ácido ribonucleico

**ATP** adenosín trifosfato

**BCG** Bacilo de Calmette-Guerin

**CAG** *Chicken Beta-actin Promote*

**CD14** Clúster de Diferenciación 14

**CD24** Clúster de Diferenciación 24

**CD36** Clúster de Diferenciación 36

**CD40** Clúster de Diferenciación 40

**CD44** Clúster de Diferenciación 44

**CD91** Clúster de Diferenciación 91

**CLEC4E** *C-Type Lectin Domain Family 4 Member E*

**CpG ODN** oligodesoxinucleótidos ricos en regiones Citosina Guanina

**DAMPS** *Damage Molecular associated Patterns*

**DAARP-32** *dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein (32 KDa)*

**DMEM** *Dulbecco's modified Eagle's medium*

**FBS** *Fetal Bovine Serum*

**FPR1** *Formyl peptide receptor 1*

**GFP** *Green Fluorescence Protein*

**HSPs** *heat shock proteins*

**HPRT** *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*

**IBA1** *Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1*

**IL-1** interleucina 1

**IL-1 $\alpha$**  interleucina 1 alfa

**IL-1 $\beta$**  interleucina 1 beta

**IL-1R** Receptor interleucina 1

**IL-4** Interleucina 4

**IL-6** Interleucina 6

**IL-10** Interleucina 10

**IL-11** Interleucina 11

**IL-33** Interleucina 33

**IPS** *Induced Pluripotent Stem cells*

**KCL** Cloruro potasico

**LDB** Caja clara y oscura

**LPS** lipopolisacárido bacteriano

**MAP2** *Microtubule-associated protein 2*

**MAPK** *Mitogen-Activated Protein Kinase*

**MCP-1** *monocyte chemoattractant protein-1*

**MDA** Malonaldehído

**MyD88** factor de diferenciación mieloide 88

**NAD<sup>+</sup>** *Nicotinamide adenine nucleotide*

**NADH** *Nicotinamide adenine dinucleotide*

**NF $\kappa$ B** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NLRP3** *nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3 inflammasome*

**NLRs** Receptores tipo NOD

**PCA** análisis de componentes principales

**PBS** *Phosphate-buffered saline*

**PFA** Paraformaldehído

**RA** Tretinoína

**RAGE** *Receptor for Advanced Glycation End-products*

**ROS** *Reactive Oxygen Species*

**SARM1** *Sterile alpha and Toll/interleukin-1 receptor motif-containing 1*

**SNR** *Signal Noise Ratio*

**ST2** *Suppression of Tumorigenicity 2*

**TEC** *terapia electroconvulsiva*

**TCC** *terapia cognitivo conductual*

**TIR** *Toll/interleukin-1 receptor/resistance protein*

**TNF- $\alpha$**  *factor de necrosis tumoral alfa*

**TLR** *Toll-Like Receptor*

**TRIF** *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*

**TST** *Test de suspensión por la cola*

**UMAP** *Uniform Manifold Approximation and Projection*

**VCAM-1** *Vascular cell adhesion protein 1*

**ZO-1** *Zonula occludens 1*



# RESUMEN

La depresión, un trastorno mental que afecta a millones de personas en todo el mundo, ha suscitado un creciente interés en la comunidad científica debido a su complejidad y al profundo impacto que ejerce sobre la calidad de vida de quienes la experimentan. En la búsqueda de una comprensión más profunda de esta afección, se ha comenzado a explorar las conexiones entre la depresión, el sistema inmune y el metabolismo. Estas investigaciones tienen como objetivo desentrañar las interacciones complejas que pueden contribuir a la etiología y la progresión de la depresión.

Uno de los modelos de depresión existentes es el inducido por la administración periférica de lipopolisacárido bacteriano (LPS), que desencadena una fuerte respuesta inflamatoria, seguida de síntomas depresivos debido a la neuroinflamación. En este contexto, el sistema inmune innato, específicamente los receptores tipo Toll (TLR), ha emergido como un componente crucial. Los TLR son sensores del sistema inmune que detectan patógenos y desencadenan respuestas inflamatorias. Se ha observado que la actividad anormal de los TLR puede estar relacionada con la aparición de síntomas depresivos.

Comprender el papel de los TLR y su interacción con el sistema inmune en el contexto de la depresión inducida por una activación inmune aguda es esencial para avanzar en nuestro conocimiento de esta compleja enfermedad y desarrollar enfoques terapéuticos más efectivos. Por esta razón, esta tesis se centra en el estudio del papel del TLR9 en la respuesta emocional en un modelo de depresión e inflamación y en consecuencia en el potencial de la preestimulación del TLR9 como una posible diana terapéutica para mitigar el daño causado por el efecto del LPS. Este efecto se logra mediante el aumento de las vías antiinflamatorias, además de proteger contra las alteraciones mitocondriales, lo que a su vez se traduce en una protección contra el desarrollo del fenotipo ansioso-depresivo inducido por la neuroinflamación.



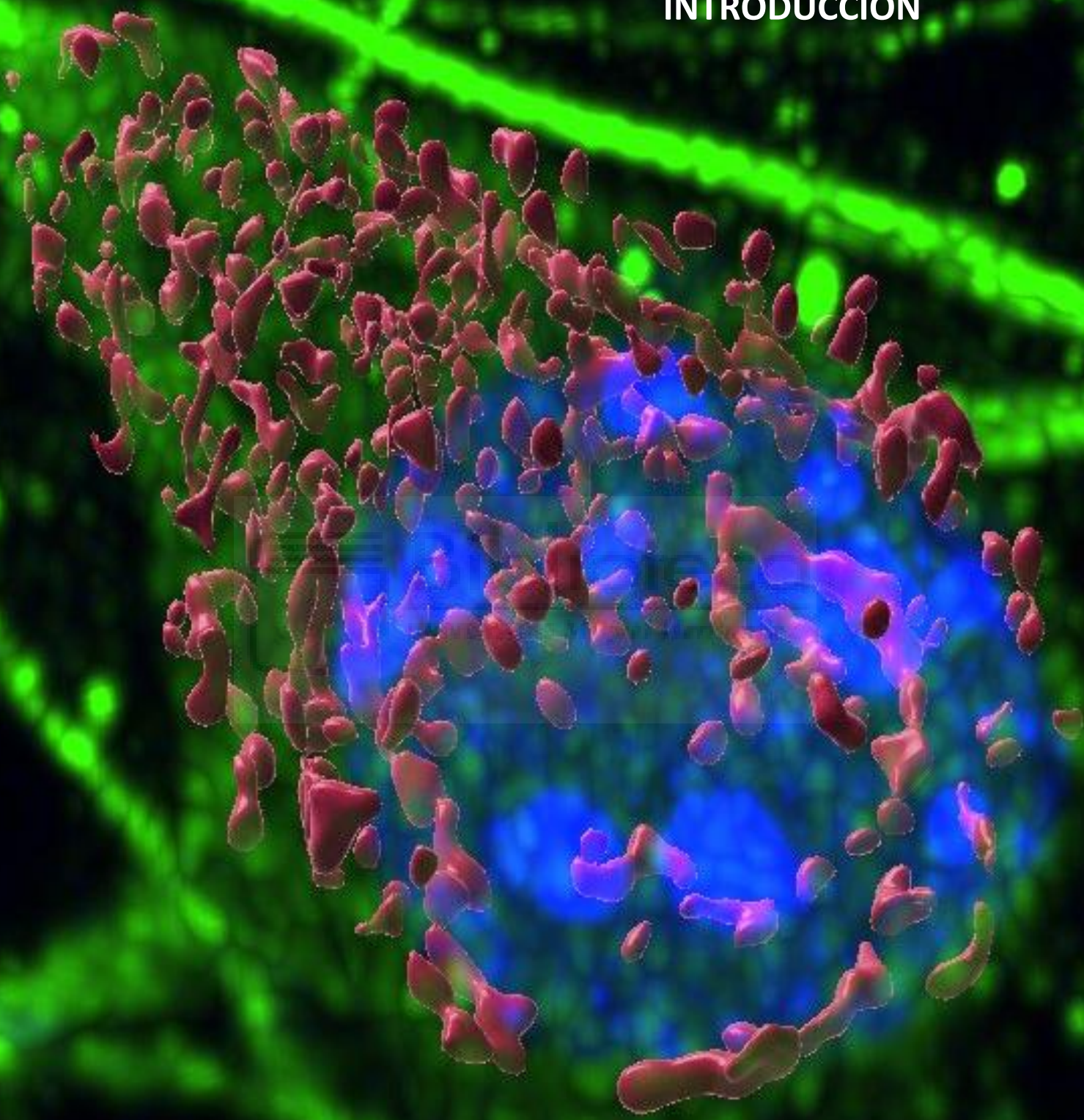
# ABSTRACT

Depression, a mental disorder affecting millions of people worldwide, has sparked growing interest in the scientific community due to its complexity and the profound impact it has on the quality of life of those who experience it. In the quest for a deeper understanding of this condition, exploration of the connections between depression, the immune system, and metabolism has begun. These research efforts aim to unravel the complex interactions that may contribute to the etiology and progression of depression.

One of the existing models of depression is induced by the peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS), triggering a robust inflammatory response followed by depressive symptoms due to neuroinflammation. In this context, the innate immune system, specifically Toll-like receptors (TLRs), has emerged as a crucial component. TLRs are sensors of the immune system that detect pathogens and initiate inflammatory responses. Abnormal TLR activity has been observed to be related to the onset of depressive symptoms.

Understanding the role of TLRs and their interaction with the immune system in the context of acute depression is essential to advance our knowledge of this complex condition and develop more effective therapeutic approaches. For this reason, this thesis focuses on the potential of TLR9 pre-stimulation as a therapeutic target to mitigate the damage caused by the effect of LPS. This effect is achieved by enhancing anti-inflammatory pathways and protecting against mitochondrial alterations, resulting in protection against the development of the anxious-depressive phenotype induced by neuroinflammation.

# INTRODUCCIÓN



## 1.1. LA DEPRESION

Las enfermedades neuropsiquiátricas abarcan una amplia gama de trastornos que afectan tanto al sistema nervioso como a la salud mental. Estas enfermedades, han demostrado ser una de las principales causas de discapacidad en todo el mundo (**Figura 1**). Entre las enfermedades neuropsiquiátricas, la depresión destaca como una de las afecciones más prevalentes y de mayor impacto, representando aproximadamente el 1,84% la carga de discapacidad por enfermedad en la población en las últimas dos décadas (Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2019).

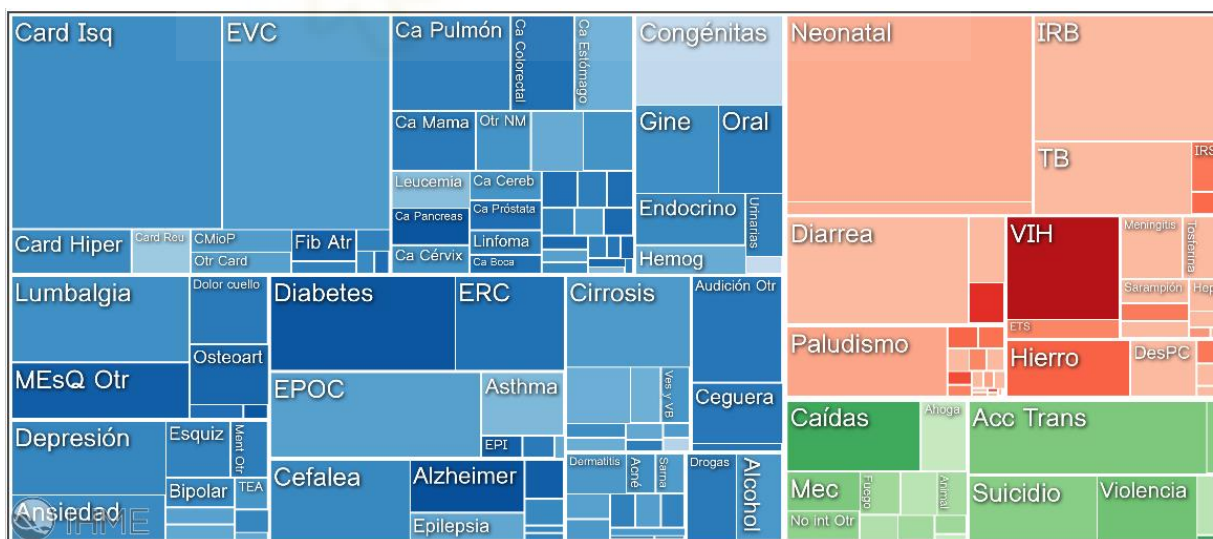
La relevancia de las enfermedades neuropsiquiátricas radica en su naturaleza incapacitante y su capacidad para afectar significativamente la calidad de vida de quienes las padecen. Estos trastornos no solo causan un sufrimiento considerable a nivel individual, sino que también generan una carga socioeconómica significativa para el sistema y los familiares.

En particular, la depresión se ha convertido en una preocupación creciente para la salud pública, se calcula que aproximadamente 280 millones de personas en el mundo sufren depresión. Esta cifra sigue aumentando, ya que se estima que ha habido un aumento del 28 % desde el año 2020 comparado con el año 2019. Además de ser causa de una gran proporción de discapacidad, la depresión también se asocia con un mayor riesgo de suicidio. Se estima que más de 700.000 personas mueren al año debido al suicidio (World Health Organization (WHO), 2022, 2023). Por tanto, tiene un gran impacto socioeconómico.

La depresión es un trastorno mental que puede manifestarse de diversas maneras y afectar a las personas de manera distinta. Sus síntomas son complejos y pueden variar ampliamente entre individuos. Algunas características principales de los síntomas depresivos son:

- Tristeza persistente: La persona experimenta una sensación continua de tristeza o desánimo que se mantiene durante un período prolongado.
- Desesperanza y pérdida de interés: La depresión puede llevar a sentirse sin esperanza respecto al futuro y perder interés en actividades que antes eran placenteras o significativas.
- Duración y gravedad: Los síntomas depresivos persisten durante semanas o incluso meses y pueden ser lo suficientemente graves como para interferir con el funcionamiento diario, incluyendo el trabajo, las relaciones sociales y la vida familiar.

La ansiedad es comúnmente una comorbilidad en los estados depresivos, lo que significa que ambos trastornos pueden coexistir en una misma persona. La relación entre la ansiedad y la depresión es compleja. Los síntomas de ansiedad, como preocupación excesiva, anticipación negativa y problemas de sueño, a menudo se presentan en personas que experimentan depresión. Esta comorbilidad puede complicar el diagnóstico y el tratamiento.



**Figura 1.** Años de vida ajustados por discapacidad. Fuente: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). (2019). GBD Compare Data Visualization. Recuperado de <https://www.thelancet.com/lancet/visualisations/gbd-compare> (Acceso el [15/08/23])

## 1.2. NEUROBIOLOGÍA DE LA DEPRESIÓN

La humanidad ha convivido durante siglos con la depresión. Así pues, en la antigua Grecia, según la teoría de los cuatro humores descrita por Hipócrates, se creía que las personas melancólicas tenían un exceso de bilis negra. A lo largo de la historia se han ido atribuyendo causas de origen espiritual o puramente psicológico. Sin embargo, hoy en día se sabe que subyace un origen neurobiológico multifactorial, incluyendo factores genéticos (Shadrina et al., 2018).

Existe varias hipótesis acerca del origen de la depresión. La corriente que ha imperado durante muchos años fue la teoría de las monoaminas. Esta simple teoría dice que hay un defecto en las concentraciones de serotonina, dopamina y noradrenalina en los espacios sinápticos (Florez et al., 2013). Sin embargo, esta teoría no es suficiente para explicar porque los fármacos antidepresivos necesitan un periodo de latencia de 3-4 semanas pese a incrementar las concentraciones plasmáticas rápidamente de estos neurotransmisores, además que hasta el 30% de los pacientes son refractarios al tratamiento (Boku et al., 2018). Por lo que se desarrollaron otras teorías que podrían ayudar a explicar estas alteraciones como: Desregulación en el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (eje del estrés) (Boku et al., 2018); hipótesis del descenso de la neuroplasticidad y la neurogénesis (Boku et al., 2018); y más recientemente la hipótesis inflamatoria (Roohi et al., 2021).

Sin embargo, la depresión es una enfermedad muy heterogénea, con manifestaciones clínicas casi antagónicas entre pacientes (GOLDBERG, 2011), por lo que cabe esperar que los pacientes puedan presentar diferentes alteraciones, y que sea necesario diseñar estrategias específicas, tanto farmacológicas como de diagnóstico, para individualizar la terapia y obtener una mayor eficacia terapéutica.

### **1.3. ESTRUCTURAS CEREBRALES IMPLICADAS EN LA DEPRESIÓN**

En la década de los 30' se describió por primera vez el sistema límbico como el sistema de las emociones, el cual conecta diversas estructuras como el hipocampo, hipotálamo, la corteza cingulada o la amígdala. Gran parte de los estudios sobre la depresión se han centrado en estudiar algunas estructuras del sistema límbico (Hipocampo y amígdala) además de otras áreas, como la corteza prefrontal: que incluye la corteza prefrontal ventromedial o dorsolateral, entre otras (Palazidou, 2012). Por lo que, se considera que la depresión es una enfermedad que puede afectar a varias regiones y sistemas cerebrales.

Entre las estructuras mencionadas, destacan los estudios realizados en el hipocampo, debido a su papel fundamental en el aprendizaje, la memoria y la respuesta emocional (Fanselow, 2000; Gazzaniga, 2004). Cabe destacar, la alta interconexión del hipocampo con otras áreas relacionadas con la regulación de las emociones, como la corteza prefrontal, la amígdala, el hipotálamo, mesencéfalo y tronco encefálico, etc... Además, estudios clínicos de neuroimagen apoyan la implicación del hipocampo en la depresión, donde se ha visto que los pacientes con depresión tienen un volumen de hipocampo reducido (MacQueen et al., 2003; Videbech & Ravnkilde, 2004). Asimismo, estas alteraciones estructurales podría ser un predictor de riesgo para el desarrollo de depresión (M. C. Chen et al., 2010). En una línea similar, se han observado cambios en la plasticidad sináptica hipocampal en modelos de depresión, estos cambios pueden ser revertidos mediante el empleo de terapia antidepresiva (W. Liu et al., 2017).

Por lo que no es de extrañar el interés en descubrir las alteraciones e implicaciones del hipocampo en la fisiopatología de la depresión. Y como la modulación farmacológica puede restablecer las alteraciones causadas por dicha enfermedad.

#### 1.4. TERAPIA DISPONIBLES PARA TRATAR LA DEPRESIÓN

En cuanto a la terapia disponible para tratar la depresión, se puede dividir en tres enfoques principales: tratamiento farmacológico, tratamiento no farmacológico y otros tratamientos. A continuación, se ejemplifican los diferentes enfoques terapéuticos:

- **Tratamiento Farmacológico:** Esta opción incluye el uso de fármacos antidepresivos que actúan sobre diferentes dianas terapéuticas en el cerebro para regular los niveles de neurotransmisores, especialmente la serotonina y la norepinefrina. Algunos fármacos antidepresivos comunes se encuentran en la **Tabla 1**, y pueden clasificarse en distintos grupos farmacoterapéuticos, donde destacan los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) por ser la primera línea de tratamiento de la depresión, debido a su seguridad y eficacia.
- **Tratamiento No Farmacológico:** Una opción importante en el tratamiento de la depresión es la terapia cognitivo-conductual, que se centra en identificar y modificar pensamientos y comportamientos negativos que contribuyen a la depresión. La TCC ha demostrado ser efectiva en el manejo de la depresión en monoterapia y en combinación con la administración de antidepresivos (Driessen & Hollon, 2010).
- **Otros tratamientos:** En situaciones de depresión grave y resistente al tratamiento, farmacológico y no farmacológico, se pueden considerar otras opciones terapéuticas. Como la terapia electroconvulsiva (TEC), y la estimulación magnética transcraneal (TMS). La TEC implica la aplicación controlada de corriente eléctrica al cerebro bajo anestesia, siendo muy efectiva y eficiente en el tratamiento de las depresiones resistentes (Ross et al., 2018; Trifu et al., 2021). Por otro lado, la TMS utiliza pulsos magnéticos, que puede despolarizar neuronas cerebrales de manera no invasiva, para estimular áreas específicas del cerebro asociadas con la regulación del estado de ánimo. Esta técnica es más novedosa que la TEC, y parece tener una buena efectividad en el tratamiento de las depresiones resistentes (Rizvi & Khan, 2019).

Es importante destacar que la elección del enfoque terapéutico dependerá de la **gravedad** de la depresión, la **respuesta** individual del paciente y las **preferencias** personales.

### 1.5. TERAPIAS FARMACOLOGICA ANTIDEPRESIVA

Varios metaanálisis han demostrado que la terapia farmacológica antidepresiva proporciona mejorías sustanciales de sus síntomas, en alrededor del 50% de los pacientes (Cuijpers et al., 2020). Sin embargo, existe un grupo de pacientes con depresión mayor que presentan resistencia a la terapia convencional, experimentando mejorías menores de aproximadamente el 25% en sus síntomas (M. Bauer et al., 2015).

Debido a la necesidad de encontrar mejores enfoques para abordar la depresión, la investigación básica se ha enfocado en descubrir nuevas áreas de intervención y enfoques farmacoterapéuticos que puedan aplicarse en pacientes. Esta dirección representa un avance significativo en el campo, yendo más allá de la tradicional teoría monoaminérgica que, como se mencionó anteriormente, era hasta hace poco la principal hipótesis en la comprensión de la fisiopatología de la depresión

Estos avances, han llevado al desarrollo de medicamentos que modulan diversas dianas implicadas, como los receptores NMDA, ejemplificado por la esketamina, o los receptores de la melatonina (**Tabla 1**). Todo con el propósito de proporcionar alternativas más eficaces para el tratamiento de la depresión.

Estos nuevos medicamentos, como la esketamina, han exhibido eficacia en el tratamiento de la depresión mayor resistente. Un estudio reciente evidenció que, la incorporación de esketamina a la terapia antidepresiva conlleva una reducción del riesgo de recaída del 51% en aquellos pacientes que han logrado una remisión estable (Daly et al., 2019). A pesar de estos resultados prometedores, algunos investigadores



sugieren que el respaldo sobre su efectividad a largo plazo sigue siendo escaso, y que se necesitan más ensayos clínicos aleatorizados con muestras más grandes para corroborar su efectividad (Capuzzi et al., 2021).

<b>Grupo terapéutico</b>	<b>Fármacos representativos</b>	<b>Mecanismo de acción simplificado</b>
Antidepresivos tricíclicos	Amitriptilina, Imipramina, Clomipramina	Bloquean la recaptación de noradrenalina y serotonina en la sinapsis, aumentando su concentración en el espacio sináptico. También ejercen efectos sobre otros sistemas de neurotransmisión, como los receptores de histamina y los receptores muscarínicos
Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS)	Fluoxetina, Sertralina, Paroxetina	Bloquean selectivamente la recaptación de serotonina en la sinapsis, aumentando su concentración en el espacio sináptico.
Inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (IRSN)	Venlafaxina, Duloxetina	Bloquean la recaptación de serotonina y noradrenalina en la sinapsis, aumentando su concentración en el espacio sináptico.
Inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO)	Fenelzina, Tranilcipromina	Inhiben la enzima monoaminoxidasa, aumentando la concentración de noradrenalina, serotonina y dopamina en el espacio sináptico.
Inhibidores de la recaptación de dopamina (IRD)	Bupropion	Bloquean la recaptación de dopamina en la sinapsis, aumentando su concentración en el espacio sináptico.
Inhibidores de la recaptación de norepinefrina (IRN)	Reboxetina	Bloquean la recaptación de norepinefrina en la sinapsis, aumentando su concentración en el espacio sináptico
Antagonistas de los receptores de NMDA	Ketamina, Esketamina	Bloquean los receptores de NMDA
Agonistas receptores de melatonina	Agomelantina	Actúa como agonista de los receptores de melatonina 1 y 2 y antagonista de los receptores de serotonina 5-HT <sub>2C</sub> .

**Tabla 1.** Tratamiento farmacológico para tratar la depresión. Fuente elaboración propia, datos obtenidos de Farmacología humana, sexta edición (Florez et al., 2013).

En la búsqueda de una mejor comprensión de la depresión y de tratamientos eficaces, se ha comenzado a explorar la interrelación con otros sistemas que pudieran estar implicados en la instauración y progresión de la depresión. Dado que existe una diversidad considerable en las causas fisiológicas que subyacen a la depresión, se ha visto que algunos pacientes que no responden a las terapias convencionales presentan niveles elevados de inflamación (Haroon et al., 2018). Esto se ha podido contrastar en modelos animales, donde se ha visto que mitigando la respuesta inflamatoria se puede mejorar respuesta a la terapia antidepressiva (Almutabagani et al., 2023). Por tanto, en los últimos años ha ganado relevancia los estudios enfocados a dilucidar la implicación de la inflamación en los estados depresivos.

## **1.6. LA INFLAMACIÓN EN LA DEPRESIÓN**

La inflamación *per se* es un proceso fisiológico que ayuda a reparar el daño en los tejidos y resolver infecciones. El sistema inmunológico, comúnmente, se divide en sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo.

La inmunidad innata brinda una respuesta temprana y no específica contra infecciones o daño tisular. Por otro lado, la inmunidad adaptativa, tanto la humoral como el celular, ofrece una respuesta específica para antígenos particulares y tiene memoria para mejorar la respuesta ante estos antígenos, así como la capacidad de responder a una amplia variedad de los mismos.

Sin embargo, cuando la respuesta inflamatoria no es proporcional al estímulo, o se regula de manera anormal puede perder su papel protector.

En este sentido, se ha observado respuestas inmunes alteradas, incluyendo la presencia de neuroinflamación, en diversas enfermedades neuropsiquiátricas, tales como la depresión mayor, los trastornos de ansiedad, la esquizofrenia o el trastorno por

consumo de sustancias (M. E. Bauer & Teixeira, 2019; De Berardis et al., 2006; E. K. Erickson et al., 2019; Hsuchou et al., 2012; **Morcuende et al., 2021**; Najjar et al., 2013). En concreto, diversos metaanálisis han observado la implicación de la inflamación periférica y la presencia de depresión (Colasanto et al., 2020; Luo et al., 2022; Ng et al., 2022), así como la presencia de inflamación central (Enache et al., 2019). En la misma línea, estos hallazgos han sido corroborados en modelos animales (Cao et al., 2021; H. Jung et al., 2023; Masanetz et al., 2022)

En este tipo de enfermedades, la inflamación, ocurre típicamente en ausencia de microorganismos y, por lo tanto, se denomina "inflamación estéril". De manera similar a la inflamación inducida por microorganismos, la inflamación estéril se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos, así como la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, especialmente el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina-1 (IL-1). Esta inflamación está mediada principalmente por el sistema inmune innato, y los receptores de reconocimiento de patrones (RRP). Estos forman una superfamilia de RRP entre los que destacan los Receptores Tipo Toll (TLRs) o los Receptores tipo NOD (NLRs), entre otros. Estos receptores aparte de reconocer patógenos, son capaces de detectar Patrones Moleculares Asociados al Daño (**Tabla 2**), o productos asociados con el estrés oxidativo, como las especies reactivas del oxígeno (ROS) y promover la inflamación estéril (G. Y. Chen & Nuñez, 2010; Franklin et al., 2018).

<b>Patrones Moleculares Asociados al Daño</b>	<b>Sensor putativo</b>
<b>Endógeno</b>	
<b>HMGB1</b>	TLR2, TLR4, TLR9, RAGE y CD24
<b>HSPs</b>	TLR2, TLR4, CD91, CD24, CD14 y CD40
<b>Proteínas S100</b>	RAGE
<b>SAP130</b>	CLEC4E
<b>Ácido ribonucleico</b>	TLR3
<b>Ácido desoxirribonucleico</b>	TLR9 y AIM2
<b>Ácido úrico y cristales de urato monosódico</b>	NLRP3

<b>ATP</b>	NLRP3
<b>Hialuronano</b>	TLR2, TLR4 y CD44
<b>Biglicano</b>	TLR2 y TLR4
<b>Versicano</b>	TLR2
<b>Heparán sulfato</b>	TLR4
<b>Péptidos formil (mitocondriales)</b>	FPR1
<b>Ácido desoxirribonucleico mitocondrial</b>	TLR9
<b>Cristales de pirofosfato de calcio dihidrato</b>	NLRP3
<b><math>\beta</math>-amiloide</b>	NLRP3, CD36 y RAGE
<b>Cristales de colesterol</b>	NLRP3 y CD36
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	IL-1R
<b>IL-33</b>	ST2
<b>Exógeno</b>	
<b>Sílice</b>	NLRP3
<b>Asbesto</b>	NLRP3

**Tabla 2.** Ejemplos de patrones moleculares asociados al daño y los receptores que los reconocen. Traducida y adaptada de (G. Y. Chen & Nuñez, 2010).

En este contexto, se requiere un delicado equilibrio entre los niveles de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-11 y IL-13) para una adecuada resolución del proceso inflamatorio. Estas señales se regulan según el fenotipo M1 (proinflamatorio) y M2 (antiinflamatorio) adquirido por las células inmunes en ventanas de tiempo específicas (Martinez & Gordon, 2014; **Morcuende et al., 2022**; Tang & Le, 2016).

En relación a la depresión, Varios meta-análisis han encontrado correlaciones positivas entre los niveles sanguíneos tanto de la proteína C-reactiva como de IL-6 con la depresión (Haapakoski et al., 2015; Valkanova et al., 2013), mientras que otros han reportado fuertes asociaciones entre los síntomas de depresión y los niveles circulantes

de TNF e IL-1 $\beta$  (Dowlati et al., 2010; Franklin et al., 2018; Howren et al., 2009; Y. Liu et al., 2012).

A su vez, la inflamación sistémica puede promover una neuroinflamación al alterar la barrera hematoencefálica, haciéndola más permeable al paso de Patrones Moleculares Asociados al Daño (DAMPs), citocinas proinflamatorias, e infiltración de leucocitos y macrófagos. (Niklasson & Agren, 1984; Sumner et al., 2018; Varatharaj & Galea, 2017).

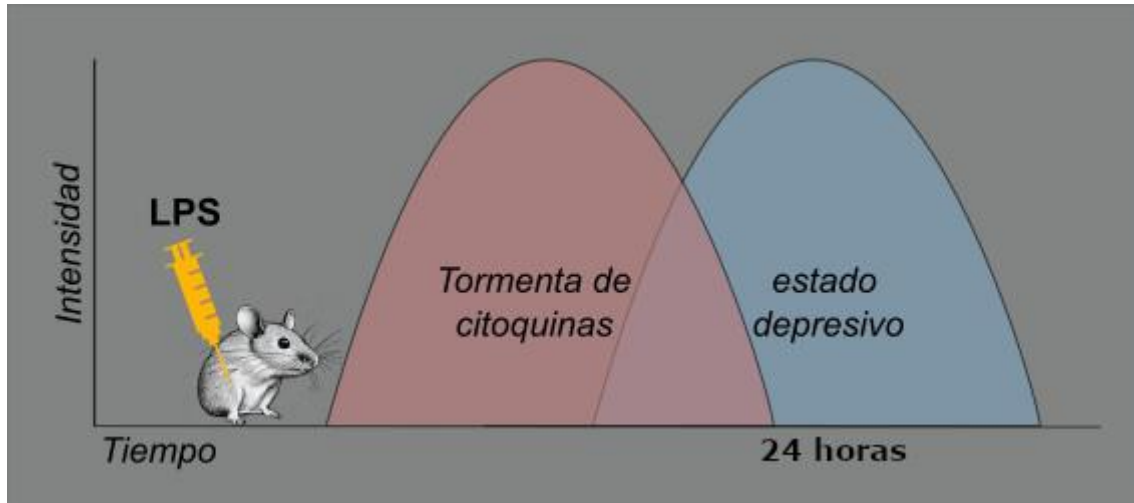
### 1.7. MODELO DE DEPRESIÓN INDUCIDO POR UNA INFLAMACIÓN SISTEMICA

Para evaluar los cambios conductuales que se producen asociados a procesos inflamatorios, se dispone de modelos de depresión inducido por agentes proinflamatorios como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), el bacilo de Calmette-Guerin (BCG), o el Poli I:C. (Gibney et al., 2013; Moreau et al., 2008; O'Connor et al., 2009). Estos modelos se caracterizan por una primera fase dónde se estimula la producción de citoquinas inflamatorias, seguida de una segunda fase dónde los animales presentan rasgos fenotípicos de los estados depresivos.

El empleo de LPS es uno de los modelos más utilizados para inducir estados depresivos derivados de la inflamación. Consiste en inyectar de manera sistémica LPS, un componente de las bacterias gram negativas, el cual produce una estimulación del TLR4, uno de los TLR más estudiados. La estimulación induce una potente inflamación estéril, que se ha relacionado con el desarrollo de los rasgos depresivos en este modelo (Chow et al., 1999; Figueroa-Hall et al., 2020; Frenois et al., 2007; Ge et al., 2015; O'Connor et al., 2009; Sulakhiya et al., 2016; Zhang et al., 2022).

El LPS, en una primera fase, produce una potente respuesta inflamatoria con liberación de mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , que típicamente, se resuelve a las 24h dejando paso a una segunda fase, con un fenotipo característico de la depresión (**Figura 2**). Esta fase se puede evaluar mediante pruebas conductuales, como el test de suspensión por la cola o el test de la natación forzada. Estas pruebas son muy útiles para

medir la desesperanza que presentan los animales tratados con LPS, un rasgo fenotípico de la depresión. Además, se han descrito alteraciones en la ruta de síntesis de la serotonina (O'Connor et al., 2009), siendo la vía de la serotonina una de las principales dianas de los antidepresivos comercializados (**Tabla 1**).



**Figura 2.** Modelo de depresión inducida por Lipopolisacárido bacteriano. Imagen propia adaptada de (Remus & Dantzer, 2016).

Por tanto, este método es una potente herramienta para el estudio de la depresión inducida por alteraciones inflamatorias. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la magnitud y la duración de la conducta depresiva puede variar en función de la edad, el sexo y la cepa del animal. Pudiendo llegar a detectarse rasgos depresivos hasta 28 días después, en el caso de la cepa C57BL6/J, no siendo así en los ratones CD1 (Murtaj et al., 2019; Painsipp et al., 2011).

### 1.8. RECEPTORES TIPO TOLL

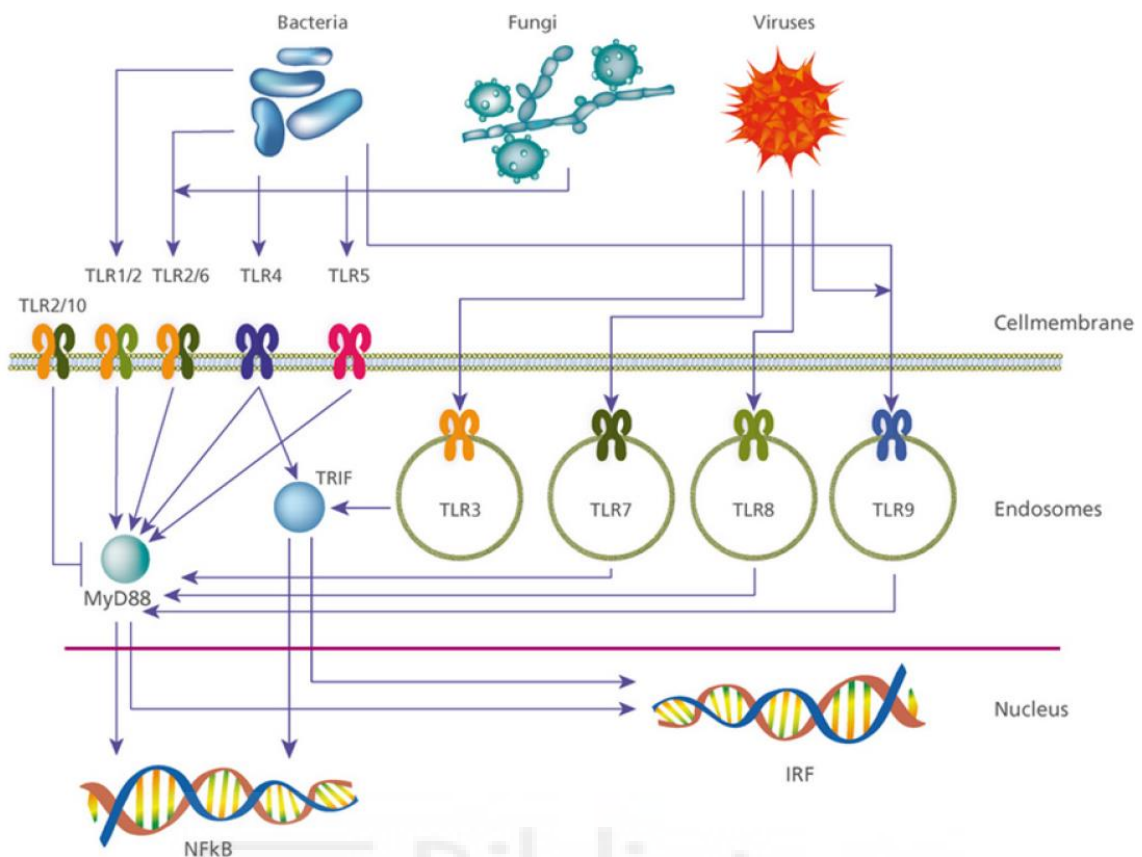
Los receptores tipo Toll, son receptores transmembranas expresados en la superficie de las células, o en la superficie de compartimentos intracelulares como los endosomas y lisosomas (**Figura 3**). Estos receptores fueron descritos por primera vez en moscas del género *Drosophila*, las principales atribuciones, como se ha comentado previamente, sería el reconocimiento de moléculas asociadas a patógenos o al daño,

estimulando la expresión de citoquinas proinflamatorias y la maduración de células presentadoras de antígenos del sistema inmune innato.

Sin embargo, se han descrito su presencia en células no inmunes, además, se han relacionado con procesos fisiológicos (Song et al., 2019), más allá de una respuesta defensiva. Como en la embriogénesis (Anderson et al., 1985; Morisalo & Anderson, 1995), el desarrollo del sistema nervioso central (Barak et al., 2014) o la neurogénesis del adulto (Rolls et al., 2007), entre otros procesos.

Clásicamente, la vía de señalización de los receptores tipo Toll (**Figura 3**) que se ha descrito ha sido en relación al sistema inmune. Esta es, después que un ligando tanto endógeno como exógeno (**Tabla 2, Figura 3**) se une al TLR, que pueden estar formado por homodímeros o heterodímeros, activando dos posibles rutas de señalización distintas.

La primera, es la vía dependiente del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), que transloca el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκβ, por sus siglas en inglés) al núcleo y estimula la producción de mediadores proinflamatorios. La segunda, es la vía independiente de MyD88. MyD88 es la proteína adaptadora universal reclutada por todos los TLR, excepto TLR3, que utiliza la proteína adaptadora que contiene el dominio *Toll/interleukin-1 receptor/resistance protein* (TIR) que induce la expresión de *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β* (TRIF), la producción de interferón-β juega un rol muy importante en la respuesta ante infecciones de origen viral (Kawai & Akira, 2007; Okun et al., 2011).



**Figura 3.** Representación de ligandos, ubicación y ruta de señalización de los TLR. Obtenido de (Rietdijk et al., 2016).

La activación de una u otra vía puede diferir en función del tipo celular. En el caso del sistema nervioso central las neuronas, la microglía, y los astrocitos pueden presentar respuestas específicas y reguladas de manera diferente frente a la estimulación del mismo receptor.

En este contexto, se han descrito rutas de señalización alternativas en tipos celulares inmunes y no inmunes del sistema nervioso central, por ejemplo:

En el caso del TLR4, se activarían ambas rutas en el caso de la microglía con aumento de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6 (D. Y. Jung et al., 2005); en el caso de los astrocitos activaría MyD88 pero no TRIF aumentando la expresión de TNF- $\alpha$  y otras moléculas como Moléculas de adhesión endoteliales (VCAM-1), metaloproteinasa de matriz 9



(MMP-9), entre otros mediadores implicados en la respuesta inflamatoria (Gorina et al., 2011; Okun et al., 2011).

En el caso de las neuronas, el conocimiento es más limitado acerca de cómo y para qué la neurona emplea estas rutas de señalización de los receptores tipo Toll.

Un estudio sugiere que la activación de  $\text{NF}\kappa\beta$  podría proteger a las neuronas hipocámpales del estrés oxidativo (Mattson et al., 1997). Mientras que otros han descrito como las neuronas podrían emplear un adaptador alternativo a MYD88, como es el Sterile alpha and Toll/interleukin-1 receptor motif-containing 1 (SARM1) (Dalod, 2007). Dónde se ha visto la importancia de esta ruta durante la apoptosis neuronal (Mukherjee et al., 2015). Además, en neuronas del ganglio de la raíz dorsal, se ha relacionado la actividad del adaptador SARM1 como un sensor metabólico, que se activa por una relación aumentada de NMN/ $\text{NAD}^+$ , y podría participar en la degeneración axonal en este tipo neuronal (Figley et al., 2021).

A pesar que los mecanismos exactos aún son desconocidos, se ha implicado que la actividad neuronal de los receptores tipo Toll (TLR) desempeña un papel en la plasticidad sináptica, así como en los procesos de memoria, aprendizaje, degeneración y supervivencia neuronal (Okun et al., 2011).

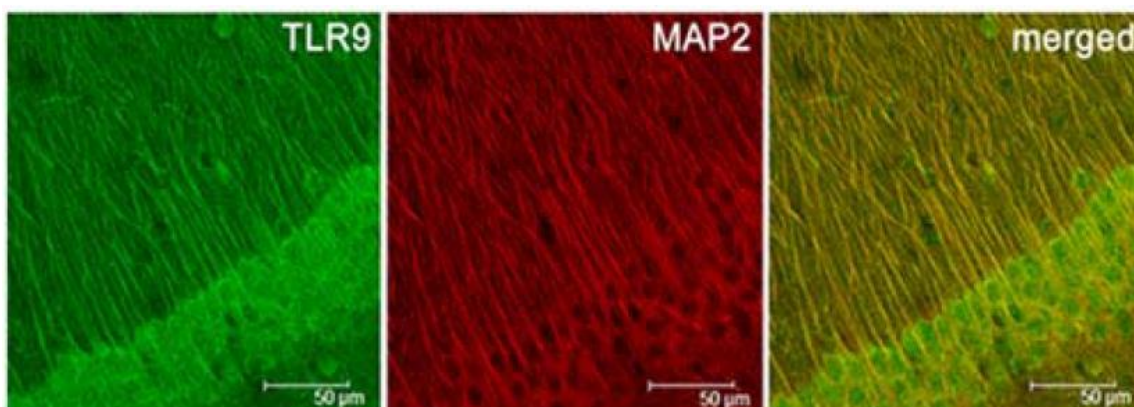
Además, podría estar implicados en la respuesta emocional, como el estudio realizado por Femenia, dónde vio que los animales carentes de TLR4 tenían mayor fenotipo ansioso y una menor interacción social. Lo cual, podría estar mediado por la modulación de DAARP-32, que juega un papel crítico en la integración de numerosos sistemas de neurotransmisores, incluyendo la dopamina y el glutamato (Femenia et al., 2018). Por otro lado, también se ha observado una activación del TLR4 en animales sujetos a un modelo de estrés crónico leve, asociado a la presencia de mediadores proinflamatorios en el cerebro (Gárate et al., 2011). Adicionalmente, otros receptores se han visto

implicados en la fisiopatología de la depresión, tanto en modelos animales como en estudios clínicos (Figuroa-Hall et al., 2020), siendo actualmente objeto de estudio.

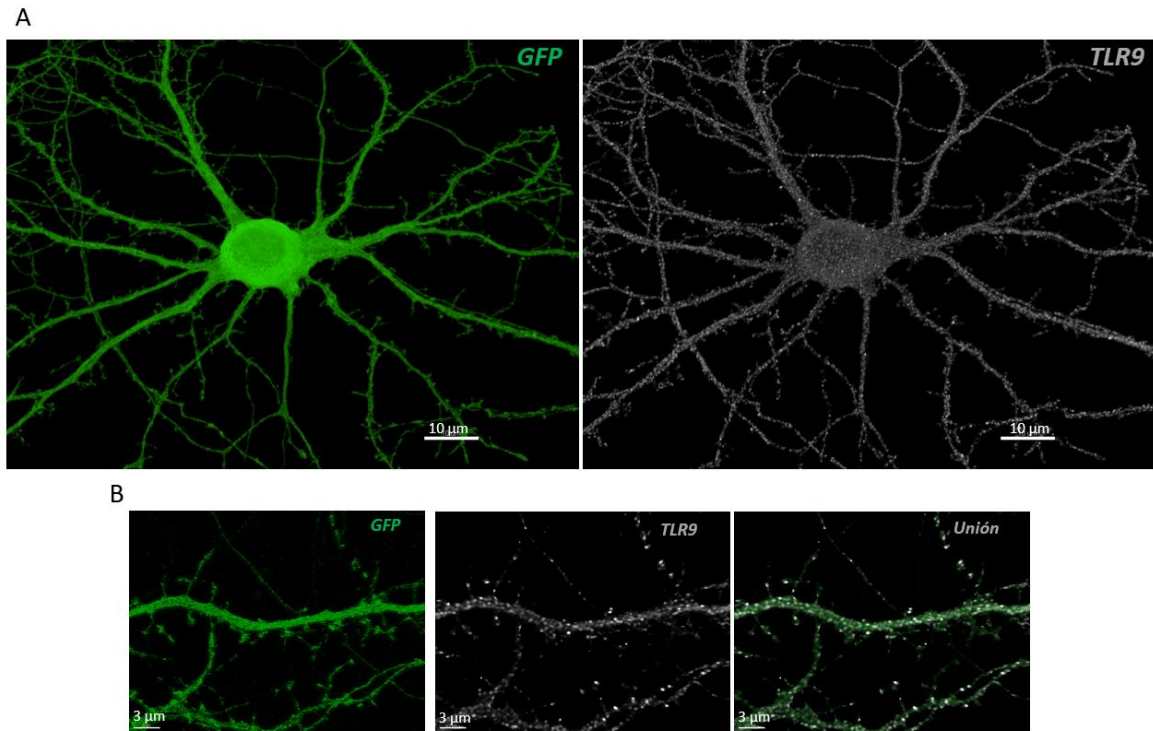
### 1.9. RECEPTOR TIPO TOLL 9

El TLR9 es un receptor tipo Toll intracelular, al igual que el resto, es un receptor transmembrana que ha sido descrito en varios orgánulos, incluyendo la superficie de endosomas, lisosomas y el retículo endoplasmático (Leifer et al., 2004). Su función principal es reconocer fragmentos de Ácido desoxirribonucleico (ADN) que contengan secuencias no metiladas de citosina y guanina enlazadas por un fosfato (CpG), que son más comunes en ADN de virus y bacterias. Como se ha visto con anterioridad (**Tabla 2**). Además, el TLR9 se ha asociado con el reconocimiento de ADN mitocondrial, como patrón molecular asociado al daño.

La distribución y la implicación que tienen el TLR9 en el sistema nervioso central ha sido poco estudiada; sin embargo, algunos estudios han puesto de manifiesto su presencia en neuronas del hipocampo de ratones. (**Figura 4**) (Kaul et al., 2012). En paralelo, nuestro laboratorio ha encontrado amplia expresión de este receptor en células obtenidas de hipocampo de ratón, cultivadas in vitro, tanto en el soma (**Figura 5A**) como en las dendritas (**Figura 5B**).



**Figura 4.** Imagen confocal de hipocampo de ratón, representando en verde TLR9, en rojo marcador neuronal MAP2, y la zona de superposición de la señal en amarillo. Obtenida de (Kaul et al., 2012).



**Figura 5.** Imagen confocal de un cultivo celular de células del hipocampo de ratón. En verde, se observa la neurona transducida con lentivirus CAG-GFP, mientras que en gris se aprecia el TLR9 marcado con un anticuerpo. A) Representación del soma y las dendritas. B) Imagen ampliada de las dendritas. Fuente: elaboración propia; las imágenes están pendientes de publicar.

Por otro lado, la mayoría de los estudios se centran sobre el papel de este receptor en enfermedades como el cáncer o enfermedades autoinmunes. Respecto a estudios relacionados con el cáncer, se ha descrito que el empleo de agonistas oligodesoxinucleótidos CpG no metilados sintéticos (CpG ODN) podría estimular la respuesta antitumoral del organismo al inhibir las células T reguladoras mediante la producción de IL-6 mediado por las células dendríticas del sistema inmune innato (Pasare & Medzhitov, 2003). La estimulación con los CpG ODN promueven la inducción de células T reguladoras (Treg) que secretan IL-10. Esto ocurre a través de la producción de IL-10 inducida por la vía de señalización p38 *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) en las células dendríticas (Jarnicki et al., 2008).

Es necesario remarcar que existen multitud de ligandos sintéticos que se unen al TLR9. En concreto, se pueden englobar en 3 clases (**Tabla 3**), teniendo distinto grado de

fosforotiorilación y selectividad celular. La fosforotiorilación implica la sustitución de un átomo de oxígeno por un átomo de azufre, esto puede mejorar la estabilidad, afinidad y propiedades farmacocinéticas del compuesto.

Clase ligando	Características
CpG-A ODN	Contiene un motivo palíndromo central que contiene CpG con esqueleto fosfodiéster y una cadena de poli-G modificada con fosforotioato en el extremo 3'. Induce alta producción de IFN- $\alpha$ por las células dendríticas, pero tiene una débil capacidad para estimular la señalización NF $\kappa$ B dependiente de TLR9 y la producción de citocinas proinflamatorias.
CpG-B ODN	Contiene un esqueleto completamente fosforotioado y uno o más dinucleótidos CpG. Activa fuertemente las células B y la señalización NF $\kappa$ B dependiente de TLR9, pero estimula débilmente la secreción de IFN- $\alpha$ .
CpG-C ODN	Combina características de las clases A y B. Contiene un esqueleto completamente fosforotioado y un motivo palíndromo que contiene CpG. Induce fuerte producción de IFN- $\alpha$ por las células dendríticas y estimula también las células B.

**Tabla 3.** Características generales de las clases de CpG ODN. Elaboración propia, datos obtenidos de InvivoGen, <https://www.invivogen.com/tlr9-agonist> (Acceso 17/09/2023)

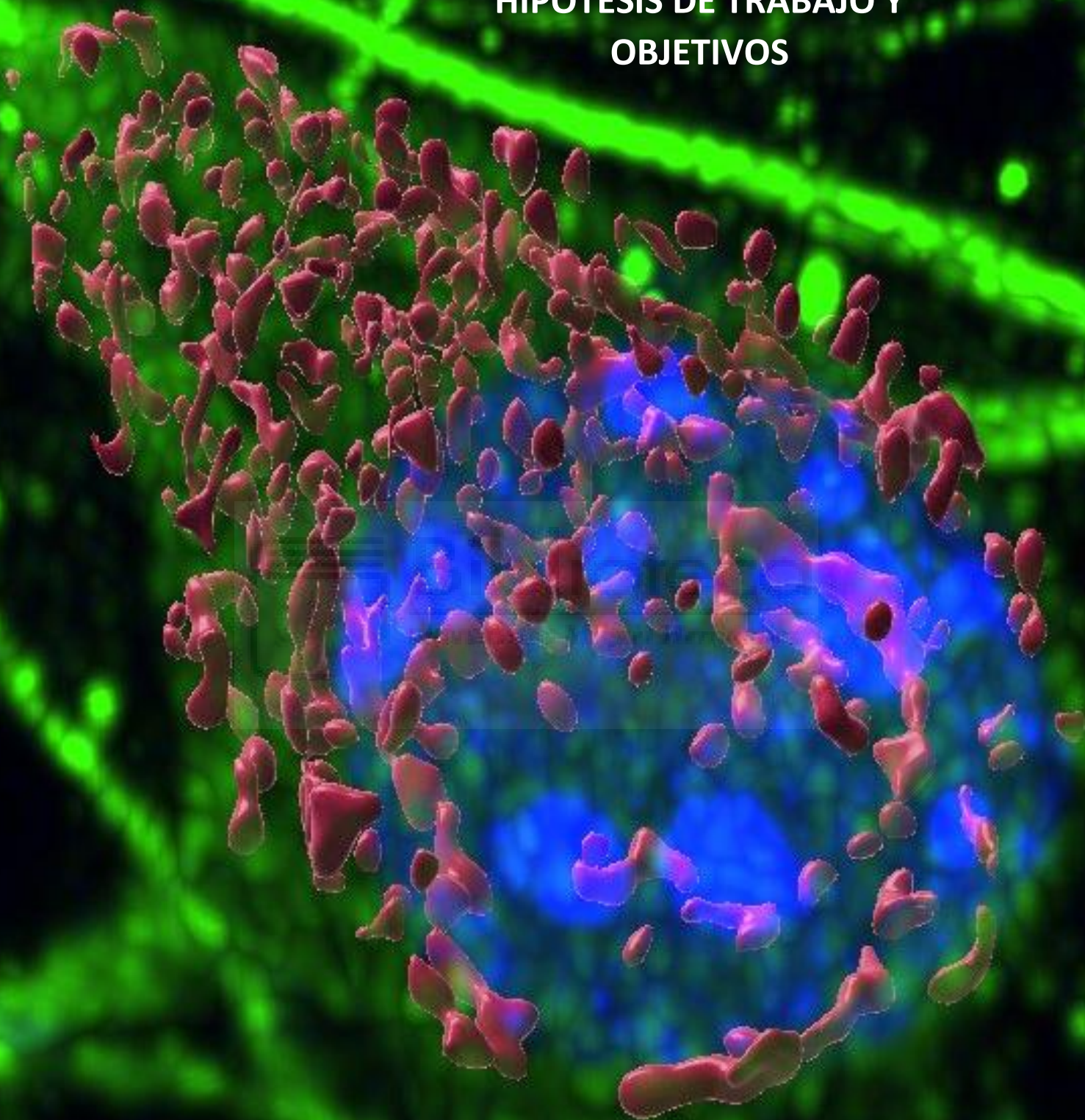
Sin embargo, A diferencia de los estudios centrados en la implicación oncológica del TLR9, su papel en otras funciones y tipos celulares es menos conocido. Shintani demostró in vitro, mediante el uso de ligandos sintéticos, que el TLR9 podría estar involucrado en la protección de cardiomiocitos y células de tipo neuronal (Shintani et al., 2013).

En la misma línea, Scholtzova demostró que la administración intraperitoneal de CpG clase B ODN 1826 en un modelo genético de Alzheimer, tanto antes como después del desarrollo de angiopatía amiloide cerebral, revirtió los déficits de memoria a corto plazo y mejoró la memoria espacial y de trabajo. Estos hallazgos se asociaron con una reducción significativa de la angiopatía amiloide cerebral, sin observarse efectos adversos (Scholtzova et al., 2017).

En contraposición, un estudio más reciente ha puesto de manifiesto como un estrés inducido por una restricción de movimiento crónica aumenta los niveles circulantes de ADN mitocondrial. Induciendo déficits en el comportamiento social de los roedores sometidos a dicho protocolo. Estos autores demostraron, mediante la administración sistémica de ADN mitocondrial, podían reproducir estos déficits en el comportamiento social, siendo ausentes en los ratones TLR9 *Kock-Out* (Tripathi et al., 2023).

Por lo tanto, es necesario dilucidar el papel que puede desempeñar el receptor tipo Toll 9 en patologías, tan prevalentes y con un gran impacto socioeconómico, como la depresión. Esto permitiría diseñar nuevas estrategias farmacológicas para mejorar la calidad de vida de aquellos pacientes en los que las terapias convencionales han fracasado.

# HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS



Existe un elevado interés en describir como el sistema inmune puede modular las actividades celulares a través de cambios metabólicos, y viceversa (Loftus & Finlay, 2016; Zmora et al., 2017)

La mayoría de los estudios sobre la relación sistema inmune-metabolismo se han centrado en su relación frente a procesos oncológicos. Sin embargo, aún se conoce poco acerca de cómo funciona esta interacción en las células del sistema nervioso central, y como pueden modificar mecanismos en los circuitos neuronales que regulan las emociones.

La hipótesis de este trabajo se centra en que el receptor TLR9 podría tener un papel en la regulación de las emociones y a su vez en la regulación de mecanismos moleculares relacionados con el metabolismo.

En base a esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

### **2.1. Objetivos generales:**

1. Evaluar el papel del TLR9 en la respuesta conductual emocional en un modelo de depresión inducido por LPS en ratones machos y hembras.
2. Determinar los mecanismos moleculares centrales asociados con el inmuno-metabolismo en respuesta a LPS y la activación de TLR9 que se asocian a la respuesta conductual en ratones machos y hembras.

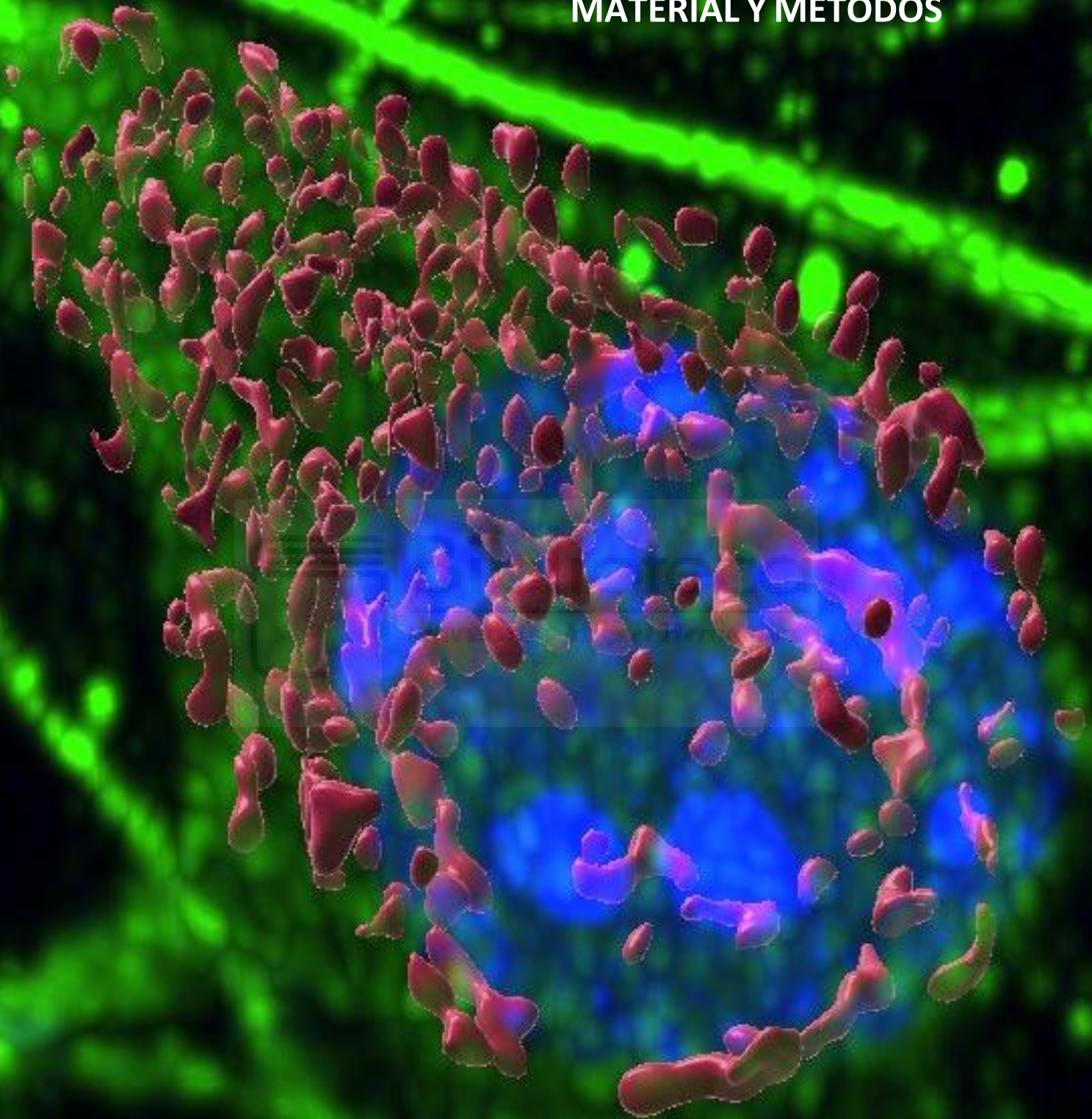
### **2.2. Objetivos específicos:**

1. Evaluar la respuesta conductual depresiva tras la estimulación central de TLR9 con ODN1826 previo a la activación inmune sistémica inducida por LPS.
2. Evaluar la respuesta conductual de ansiedad tras la estimulación central de TLR9 con ODN1826 previo a la activación inmune sistémica inducida por LPS.

3. Determinar el patrón temporal de expresión génica de mediadores de la inflamación, incluyendo citoquinas inflamatorias y antiinflamatorias en la región del hipocampo en el cerebro tras la activación de TLR9 y administración de LPS.
4. Evaluar posibles alteraciones en proteínas relacionadas con la integridad de la barrera hematoencefálica (proteínas implicadas en las uniones estrechas intercelulares) inducidas por LPS y el efecto de la activación de TLR9.
5. Analizar posibles alteraciones mitocondriales asociadas con la fosforilación oxidativa y el metabolismo en el hipocampo a nivel de expresión de proteína en el modelo de depresión y el efecto de la estimulación de TLR9.
6. Determinar el grado de estrés oxidativo en el modelo de LPS y el efecto de la estimulación de TLR9 en hipocampo de ratón e in vitro en cultivo neuronal de hipocampo.
7. Elucidar si el tratamiento con LPS y TLR9 induce alteraciones en la morfología de la mitocondria en neuronas.
8. Evaluar el efecto de la activación de TLR9 en la longitud de las neuritas en cultivo de neuronas de hipocampo y si la activación de TLR9 protege de las posibles alteraciones inducidas por LPS.
9. Análisis dimensional de los parámetros estudiados e identificación de diferencias potenciales entre sexo, tratamiento y alteraciones moleculares.



## MATERIAL Y MÉTODOS



En la presente tesis doctoral se empleó la siguiente metodología.

### **3.1. MODELOS ANIMALES**

#### **3.1.1. Animales**

Los experimentos conductuales se llevaron a cabo en ratones C57BL6J adultos, machos y hembras, de 2 a 3 meses de edad. Todos los ratones fueron obtenidos del servicio de experimentación animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH), Alicante, España. Los animales se estabularon en jaulas de plástico estándar, con 6-8 animales por jaula, en condiciones controladas de temperatura ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), humedad ( $60 \pm 10\%$ ) y luz (ciclo de 12 horas luz/12 horas oscuridad), se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*. Todos los estudios cumplieron con el Real Decreto 53/2013 de España, la Ley 32/2007 de España y la Directiva de la Unión Europea del 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE) que regula el cuidado de animales experimentales y fueron aprobados por el órgano de investigación responsable de la UMH.

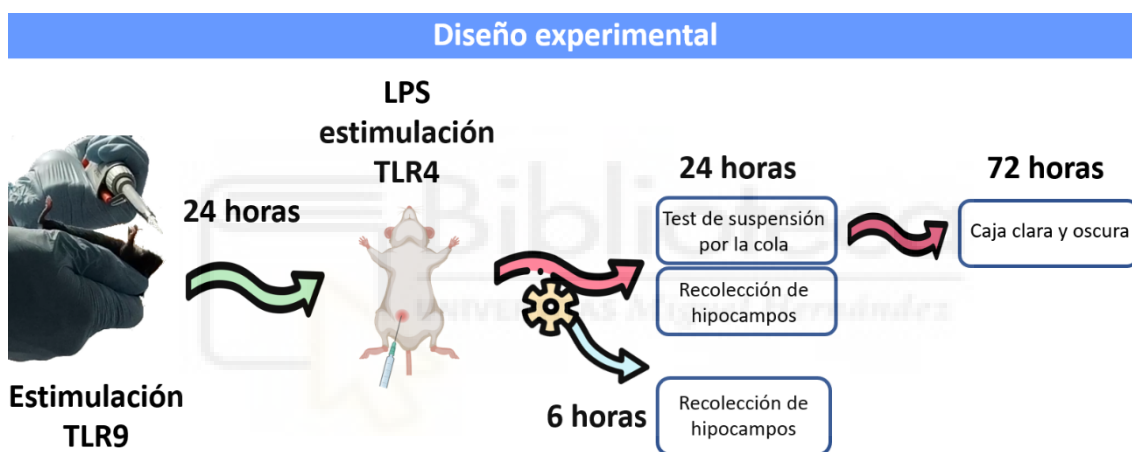
#### **3.1.2. Fármacos**

Los ratones fueron tratados intranasalmente (i.n.), en ratones despiertos, con 12 $\mu\text{L}$  que contenía 120  $\mu\text{g}$  del agonista del TLR9 ODN 1826 (aTLR9, tlr-1826, InvivoGen), o con el vehículo (solución salina tamponada con fosfato, PBS). Veinticuatro horas después de la administración de ODN 1826, se inyectó a los ratones 0,83 mg/kg de Lipopolisacárido bacteriano (LPS), intraperitonealmente (i.p.), proveniente de *Escherichia coli* Serotipo O55:b55 (LPS, L2880, Sigma-Aldrich), o vehículo (solución salina, 0,9% NaCl).

#### **3.1.3. Diseño experimental**

Previo a la administración Intranasal, 5 días antes, los animales fueron sometidos a un periodo de adaptación al experimentador y entrenados para recibir despiertos la administración intranasal.

Los animales se dividieron en varios grupos experimentales (**Figura 6**). El primer grupo experimental se empleó para evaluar la conducta a las 24h de la administración del LPS se realizó el test de suspensión por la cola, 72 horas después del LPS se realizó la caja clara y oscura. Adicionalmente, se emplearon dos grupos más para evaluar los cambios neuroquímicos. Dónde se recolectaron los hipocampos de ambos hemisferios, a las 6 y 24 horas de la administración del LPS. Estos, se diseccionaron sobre palcas de PBS congelado, y se embebieron los cerebros en PBS congelado picado, de esta manera se preserva mejor la integridad del ARN y las fosforilaciones de las proteínas (Y. Wang et al., 2015). Una vez extraídos los hipocampos, se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Este procedimiento se realizó tanto en machos como en hembras, en total se emplearon 171 roedores de ambos géneros.



**Figura 6.** Representación gráfica del diseño experimental. TLR: Receptor tipo Toll 9; LPS: Lipopolisacárido.

### 3.1.4. Estudios conductuales

Todas las pruebas conductuales se llevaron a cabo entre las 2:00 PM y las 6:00 PM. Antes de la evaluación conductual, los ratones fueron trasladados a la sala de pruebas al menos 60 minutos antes del inicio de las pruebas para minimizar el estrés causado por los cambios ambientales. Todas las pruebas conductuales se grabaron en video y se evaluaron a ciegas para disminuir el sesgo.

#### 3.1.4.1. Test de suspensión por la cola

El test de suspensión por la cola es un método ampliamente usado, descrito por Steru en 1985 (Steru et al., 1985). Sirve para evaluar los rasgos depresivos de los roedores, y el método consiste en medir el tiempo que el ratón permanece inmóvil en una situación dónde no tiene escape. Este tiempo de inmovilidad se asocia a la desesperanza, que es un signo característico de los cuadros depresivos.

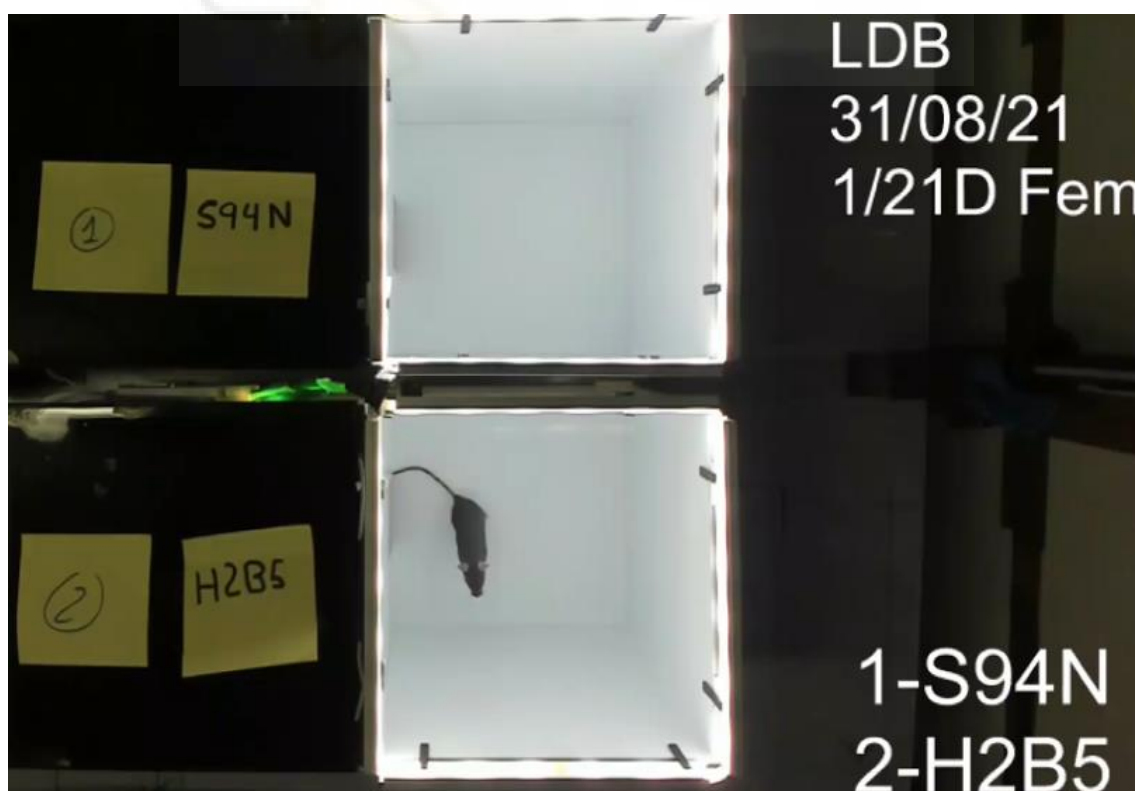
Veinticuatro horas después de la administración del LPS, se evaluó el fenotipo depresivo mediante el empleo de este test (**Figura 7**). Los ratones fueron suspendidos individualmente por las colas utilizando cinta adhesiva y grabados durante 10 minutos. Durante este período de 10 minutos, se midió manualmente el tiempo total de inmovilidad, que corresponde al tiempo en que los ratones permanecen pasivamente suspendidos y completamente inmóviles. Dicho test es útil para evaluar la capacidad antidepressiva de los fármacos testados (Cryan et al., 2005).



**Figura 7.** Imagen representativa de roedores en la prueba del test de suspensión por la cola.

### 3.1.4.2. Caja clara y oscura

La caja clara y oscura es una prueba que sirve para evaluar los rasgos ansiosos de los roedores. Esta prueba consiste en una caja dividida en dos compartimentos: uno oscuro y otro claro. El animal se coloca en la arena y se le permite explorar ambos lados. Los animales que muestran un comportamiento menos ansioso y más exploratorio pasarán más tiempo en el compartimento claro, mientras que aquellos más ansiosos preferirán permanecer en el compartimento oscuro. La preferencia por el compartimento oscuro refleja la tendencia natural de los animales a buscar refugio en lugares menos expuestos, mientras que una mayor exploración del compartimento claro indica una menor ansiedad (Crawley & Goodwin, 1980). Para ello se empleó una caja de metacrilato con dos compartimentos (20 × 20 × 15 cm L x A x Al), uno abierto e iluminado con un LED de 600 lux como espacio ansiogénico por la aversión natural de los roedores hacia zonas altamente iluminadas, y el otro negro y opaco, separados por una puerta (**Figura 8**). Al comienzo de la sesión de 5 minutos, los ratones fueron colocados en la caja oscura. Se evaluó el tiempo total que pasaron en la zona ansiogénica y el número de transiciones entre cajas. Se consideró una transición cuando las cuatro patas del ratón estaban dentro de la nueva caja.



**Figura 8.** Imagen representativa de roedor en la prueba de la caja clara y oscura.

### 3.1.5. Estudios de expresión génica

Al finalizar los procedimientos experimentales (**Figura 6**) los roedores se sacrificaron mediante dislocación cervical, para extraer los hipocampos. Después de la disgregación mecánica de los hipocampos se aisló el Ácido ribonucleico (ARN) total utilizando el kit RNeasy Plus Mini (74136, Qiagen, España). El procedimiento de extracción se basa en la tecnología de columna de sílice, que utiliza columnas de membrana con propiedades especiales para capturar y purificar el ARN específicamente. El ARN resultante, se cuantificó mediante técnicas espectrofotométricas empleando el NanoDrop (Thermo Scientific, España).

La transcripción inversa, que consiste en pasar el ARN total a ADN complementario, se realizó a partir de cantidades iguales de ARN (1 µg/reacción) mediante el kit de transcripción inversa de ADN de alta capacidad (4374966, Applied Biosystems, Madrid, España). El ADN complementario obtenido, se almacenó a -20°C hasta su uso.

Se realizó la técnica de PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) utilizando el sistema de detección QuantStudio 3 (Applied Biosystems, España). En cada pocillo de la reacción de qRT-PCR se añadieron 60 ng de ADN complementario, 0,5 µM de cada cebador para cada gen (**Tabla 4**), agua libre de nucleasas y el kit PowerUp SYBR Green Master Mix (A25742, Applied Biosystems, Madrid, España), en un volumen total de reacción de 20 µl. se hizo triplicados de cada muestra.

Los datos para cada gen objetivo se normalizaron con el gen de referencia hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HPRT). El cambio relativo en la expresión del gen objetivo se determinó utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

<i>Diana</i>	<i>Sentido (5'-&gt;3')</i>	<i>antisentido (5'-&gt;3')</i>	Tª de fusión °C	Nanogramos cDNA/reacción
<b>HPRT</b>	AGTCCCAGCGTCGT	TTTCCAAATCCTCG	60	12
	GATTAG	GCATAATGA		
<b>IBA1</b>	ATCAACAAGCAATT	CAGCATTTCGCTTCA	60	12
	CCTCGATGA	AGGACATA		
<b>TNFα</b>	CAGGCGGTGCCTAT	CGATCACCCCGAAG	60	60
	GTCTC	TTCAGTAG		
<b>MCP-1</b>	TTAAAAACCTGGAT	GCATTAGCTTCAGA	60	60
	CGGAACCAA	TTTACGGGT		
<b>IL-1β</b>	GAAATGCCACCTTT	TGGATGCTCTCATC	60	60
	TGACAGTG	AGGACAG		
<b>IL-4</b>	GGTCTCAACCCCA	GCCGATGATCTCTC	60	60
	GCTAGT	TCAAGTGAT		
<b>IL-6</b>	TAGTCCTTCTACCC	TTGGTCCTTAGCCA	60	60
	CAATTTCC	CTCCTTC		
<b>IL-10</b>	GCTCTTACTGACTG	CGCAGCTCTAGGA	60	100
	GCATGAG	GCATGTG		
<b>IL-11</b>	AATCCCAGCTGAC	TCTACTCGAAGCCT	60	100
	GGAGATCACA	TGTCAGCACA		
<b>MMP-9</b>	CGTCGTGATCCCCA	AACACACAGGGTTT	60	12
	CTTACT	GCCTTC		

**Tabla 4.** Lista de cebadores empleados para determinar la expresión relativa de cada gen.

### 3.1.6. Western Blot

El hipocampo se homogeneizó en 500 µL de tampón, de lisis y extracción, RIPA (89900, Thermo Scientific) y el cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas Halt (87786, Thermo Scientific). Los hipocampos fueron disgregados mediante sonicación.

Una vez obtenido el homogenizado, se determinó la cantidad de proteína total mediante BCA (23227, Thermo Scientific). Este ensayo es utilizado para determinar la concentración de proteínas presentes en una muestra biológica. Se basa en la reacción del cobre (II) con el ácido bicinchonínico en un medio alcalino, lo que produce un complejo de color púrpura. La intensidad del color generado es directamente proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la muestra, este color es cuantificable mediante un espectrofotómetro a 562nm de longitud de onda.

Una vez obtenidas las concentraciones, se cargaron cantidades iguales de proteína (15 µg), de cada muestra, en un gel de Bis-Tris NuPAGE 4-12% (NP0323, Invitrogen) usando tampón de muestra Laemmli (1610747, Biorad) y β-mercaptoetanol (63689, Sigma) como agente reductor. Las proteínas se separaron utilizando tampón de electroforesis NuPAGE MOPS SDS (NP0001, Invitrogen) o tampón de electroforesis MES SDS (NP0002, Invitrogen) y se transfirieron a una membrana de transferencia de PVDF (88518, Thermo Scientific).

Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios específicos (**Tabla 5**), La unión de los anticuerpos se reveló mediante quimioluminiscencia, por lo que las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano, o HRP por sus siglas en inglés, para el huésped de los anticuerpos primarios (**Tabla 5**). Posteriormente, para detectar la señal de estos anticuerpos se añadió el sustrato de HRP ECL (32209, Thermo Scientific). Las bandas de proteínas se detectaron utilizando Imager 680 de Amersham (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia), y la densidad óptica se cuantificó mediante el *software* NIH Image J versión 1.53q (National Institutes of Health). La proteína total teñida con Ponceau S se utilizó como control de carga (33427.01, Serva).



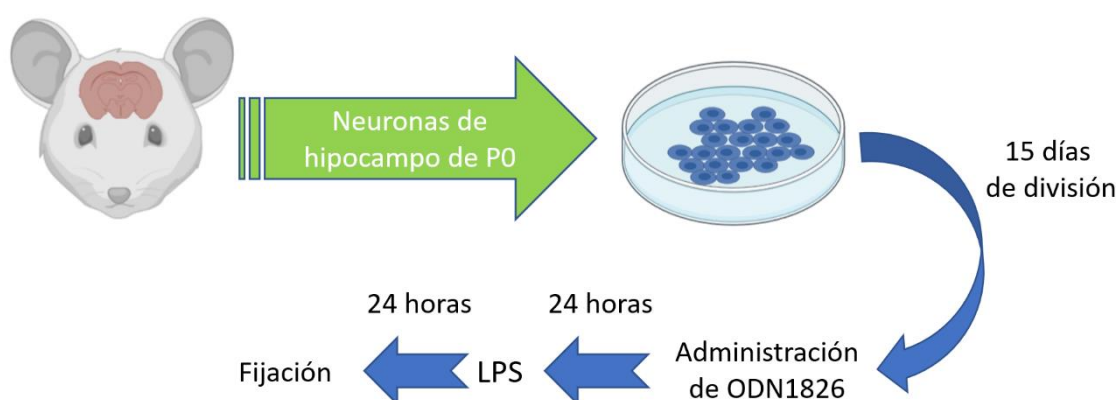
<i>Diana</i>	<i>Huésped</i>	<i>Dilución</i>	<i>referencia</i>
<b>Cóctel OXPPOS</b>	Ratón	1:500	45-8099, Invitrogen
<b>Claudina 5</b>	Conejo	1:1.000	34-1600, Invitrogen
<b>ZO-1</b>	Conejo	1:1.000	GTX10859, Genetex
<b>MDA</b>	Conejo	1:1.000	ab27642, Abcam
<b>Ratón</b>	Cabra	1:10.000	A28177, Invitrogen
<b>Conejo</b>	Cabra	1:10.000	G21234, Invitrogen

**Tabla 5.** Lista de anticuerpos primarios empleados en *Western Blot*.

### 3.2. CULTIVOS CÉLULARES

#### 3.2.1. Cultivos primarios neuronales

Se cultivaron neuronas primarias del hipocampo a partir de ratones C57BL6/J a día postnatal 0 (P0). De manera resumida, las neuronas del hipocampo se sembraron a una densidad de 50,000 células por pocillo en cubreobjetos de 8 mm recubiertos con poli-D-lisina (P7886, Merck) y laminina (L2020, Merck). Las células se mantuvieron en medio Neurobasal A (10888-022, Gibco), suplementado con 1X B27 (17504, Gibco), 1% Glutamax (35050061, Gibco) y 1% de penicilina-estreptomicina (15140122, Gibco). Quince días después de la división celular, las neuronas se trataron con 100 nM de ODN 1826 o PBS durante 24 horas, seguido de 24 horas de tratamiento con 1 µg/mL de LPS o PBS (**Figura 9**).



**Figura 9.** Representación esquemática de procedimiento experimental de cultivos neuronales de hipocampo. P0: día postnatal 0, LPS: lipopolisacáridos.

### 3.2.2. Cultivos de línea celular

Neuroblastomas de la línea SH-SY5Y, fueron cultivadas de manera basal en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, 21969, Gibco) suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS, 10500, Gibco), 1% de Glutamax (35050061, Gibco) y 1% de penicilina-estreptomicina (15140122, Gibco). Las células se cultivaron en una placa Petri de diámetro p90 a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Las células SH-SY5Y se diferenciaron hacia un fenotipo similar al de neuronas siguiendo una versión modificada del protocolo de Encinas (Encinas et al., 2000).

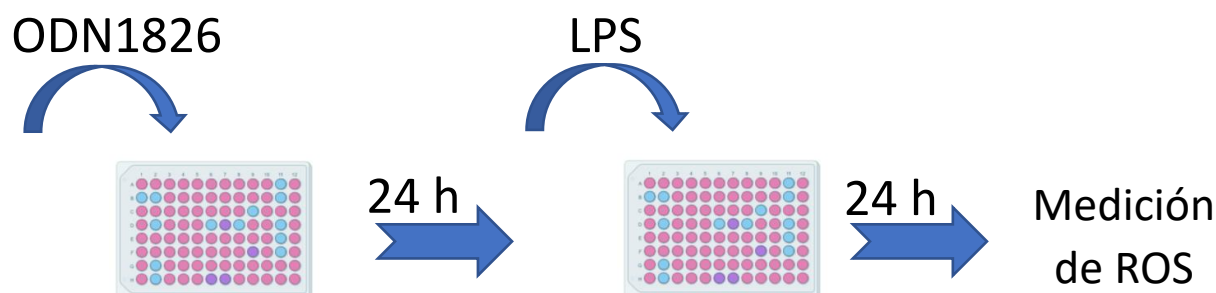
En primer lugar, las células se cultivaron durante 5 días con DMEM suplementado con un 5% de FBS, 1% de Glutamax, 1% de penicilina-estreptomicina y 10 µM Tretinoína (RA, R2625, Sigma-Aldrich). Después de 5 días, el medio se reemplazó por Neurobasal A, durante otros 5 días (NB, 10888, Gibco), suplementado con 1X B27 (17504, Gibco), 1% de Glutamax, 1% de penicilina-estreptomicina, 20 mM de KCl, 0,3 mM de Dibutiril ciclico-AMP (dbcAMP, D0627, Sigma-Aldrich) y 50 ng/mL de factor neurotrófico derivado del cerebro humano (BDNF, B3795, Sigma-Aldrich). Después de la diferenciación las células estuvieron listas para el procedimiento experimental.

### 3.2.3. Ensayo de Especies Reactivas de Oxígeno

Este ensayo consiste en utilizar una sonda fluorescente que se une a las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) presentes en la muestra, lo que genera una señal de fluorescencia proporcional a la cantidad de ROS. La intensidad de fluorescencia se puede medir con un lector de placas, lo que permite cuantificar el nivel de ROS en las células y evaluar el estrés oxidativo.

Para ello, las células SH-SY5Y diferenciadas se aislaron y se volvieron a cultivar en una placa de 96 pocillos (4000 células/pocillo), estas se trataron con 100 nM de aTLR9 o PBS durante 24 horas, seguidas de 24 horas con 1 µg/mL de LPS o PBS, por triplicado para cada condición experimental (**Figura 10**). Posteriormente, se incubó con la solución tampón con la sonda fluorescente (Cellular ROS Assay Kit Red ab186027, Abcam) y se

incubó 45 minutos a 37° con 5% de CO<sub>2</sub>. La intensidad de fluorescencia se midió con el lector de placas Infinite m200 (Tecan).



**Figura 10.** Representación esquemática del Ensayo de Especies Reactivas de Oxígeno. Llevado a cabo en el cultivo celular de la línea SH-SY5Y diferenciada en tipo neuronal. ROS: Especies reactivas de oxígeno.

#### 3.2.4. Inmunomarcaje

Después del tratamiento descrito con anterioridad, en el cultivo neuronal, **(Figura 9)**, los cultivos neuronales se incubaron durante 30 minutos con 50 nM de MitoTracker™ Red CMXros (M7512, Invitrogen), disuelto en medio de cultivo sin complementar (DMEM), seguido de 3 lavados con PBS atemperado a 37°C para retirar los excesos de la tinción. Posteriormente, se fijaron con 4% de paraformaldehído (PFA) a 37°C. Después de la fijación, las células se lavaron con PBS y se bloquearon con 2% de Suero Normal de Cabra y 0,1% de Triton X-100. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo anti-MAP2 de pollo (NB300-213, Novus Biologicals, 1:3000) y se detectaron utilizando el anticuerpo Alexa Fluor® 488 de Cabra Anti-IgY de Pollo AffiniPure (103-545-155, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 1:500), junto con Hoechst 33342 (5 µg/mL, Invitrogen, 1:2000) para la tinción de los núcleos.

#### 3.2.5. Adquisición y procesamiento de imágenes

Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 880 con un objetivo plan-Apochromat de inmersión en aceite de 63x, con apertura numérica de 1.4, a una resolución de 0.08 x 0.08 x 0.12 µm (X, Y, Z) por píxel y una profundidad de 12 bits. Posteriormente, se procedió a realizar la deconvolución de las imágenes para

mejorar la Relación Señal Ruido (SNR) utilizando la aplicación informática Huygens Professional (Scientific Volume Imaging). Una vez obtenidas las imágenes deconvolucionadas, las mitocondrias se modelizaron en 3D con el software Imaris (Bitplane), y los datos morfológicos se procesaron utilizando el algoritmo de reducción de la dimensionalidad UMAP, seguido de la agrupación no supervisada en 4 grupos (Fogo et al., 2021) mediante el algoritmo K-medias .

La reducción dimensional mediante UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) es una técnica de análisis de datos que permite representar datos complejos en un espacio de menor dimensión preservando su estructura y relaciones. UMAP transforma los datos en un espacio de menor dimensionalidad al capturar las similitudes y diferencias entre los puntos originales. Posteriormente, el algoritmo, de agrupamiento no supervisado, K-medias se aplica para clasificar los datos clústeres en función de su proximidad en el espacio reducido. K-medias es un método de agrupamiento ampliamente utilizado que busca asignar cada punto a un clúster cuyo centroide es el más cercano. Esta combinación de técnicas, UMAP seguida de K-medias, sirve para analizar grandes conjuntos de datos y descubrir patrones ocultos, lo que facilita la identificación de subgrupos o categorías dentro de los datos, permitiendo un análisis más profundo y una interpretación significativa de la información (Gultepe & Makrehchi, 2018; Hozumi et al., 2021).

Una vez obtenidos los grupos, se verificaron visualmente la morfología de las mitocondrias de los cultivos neuronales cercanas a los centroides para clasificar cada clúster generado en un tipo morfológico.

Para la medición de las neuritas, de los cultivos neuronales, se empleó el microscopio de campo abierto Thunder de Leica con un objetivo HC PL FLUOTAR de inmersión en aceite de 40x, con apertura numérica de 1.3, se escanearon hasta 20 campos visuales por imagen con una profundidad de 8 bits. Posteriormente, se procedió a realizar la deconvolución de las imágenes para mejorar la Relación Señal Ruido (SNR) utilizando el

propio *software* de adquisición (LASX, Leica). La cuantificación de la longitud las neuritas que salían desde el soma (neuritas primarias) se realizó de manera manual usando el *software* NIH Image J versión 1.53q (National Institutes of Health)

### **3.3. ANALISIS ESTADISTICO Y TRATAMIENTO DE DATOS**

Se realizaron análisis estadísticos utilizando GraphPad Prism 8. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Para las diferencias estadísticamente significativas se realizó un análisis *post hoc* para comparar las medias de cada grupo mediante el test de Fisher LSD. Se definió significancia estadística como  $p < 0.05$ . Todos los datos se presentan como medias ( $\pm$  error estándar de la media, E.E.M.).

En cuanto a los análisis computacionales, se recurrió a paquetes de Python para calcular la matriz de correlación mediante el coeficiente de Pearson, así como para aplicar los algoritmos UMAP y K-medias, para la reducción de dimensiones y el agrupamiento no supervisado.

Los datos se representaron gráficamente mediante Graphpad Prism 8, o las librerías de Python Seaborn y Matplotlib.

## RESULTADOS



En la presente tesis doctoral se evaluó el efecto conductual de la estimulación del receptor TLR9 previo a la administración de lipopolisacárido bacteriano junto con los cambios neuroquímicos observados en el hipocampo de los roedores. Asimismo, se ahondó en evaluar las variaciones en la mitocondria y el estrés oxidativo que pudiesen estar detrás del efecto observado en los cambios conductuales. Los principales resultados de esta investigación se detallan a continuación:

#### **4.1. Efecto del TLR9 en la prueba del test de suspensión por la cola**

En primer lugar, los resultados de las pruebas conductuales mostraron un aumento significativo en los tiempos de inmovilidad en los roedores tratados con vehículo y lipopolisacárido (LPS). Curiosamente, se observó una normalización respecto al control del tiempo de inmovilidad en los animales tratados con 120  $\mu$ g de ODN1826 previo a la administración de lipopolisacárido (aTLR9/LPS) en comparación con el grupo tratado solo con LPS, tanto en machos como en hembras (**Figura 11A**).

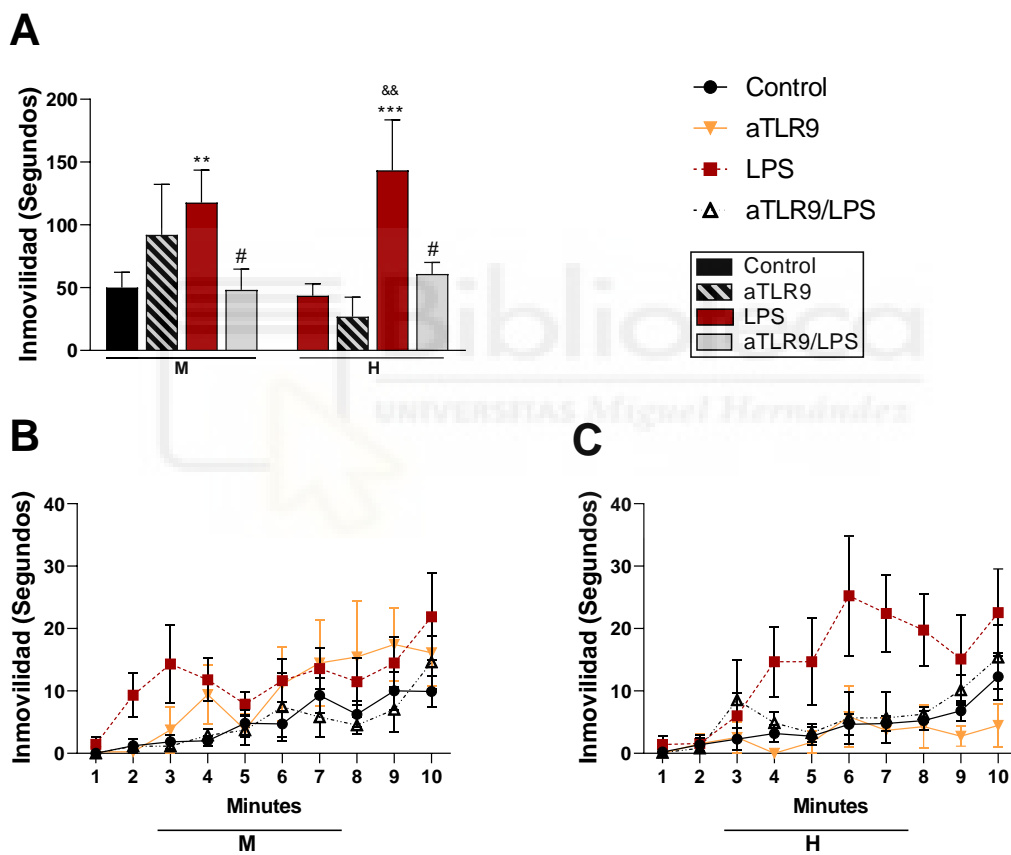
Además, se analizaron los patrones temporales de inmovilidad en los machos (**Figura 11B**) y se encontraron mayores diferencias en el tiempo de inmovilidad durante los primeros 5 minutos en el grupo tratado solo con LPS. En cuanto a las hembras, se observó una mayor diferencia en el tiempo de inmovilidad a partir del minuto 4 de la prueba en el grupo tratado solo con LPS (**Figura 11C**).

#### **4.2. Efecto del TLR9 en la prueba del test de la caja clara y oscura**

Por otro lado, La prueba de la caja clara y oscura arrojó unos resultados de tiempo de permanencia en el compartimento ansiogénico de -30% en el grupo LPS en machos respecto al control, mientras que se observa una reducción significativa del -50% en hembras (**Figura 12A**).

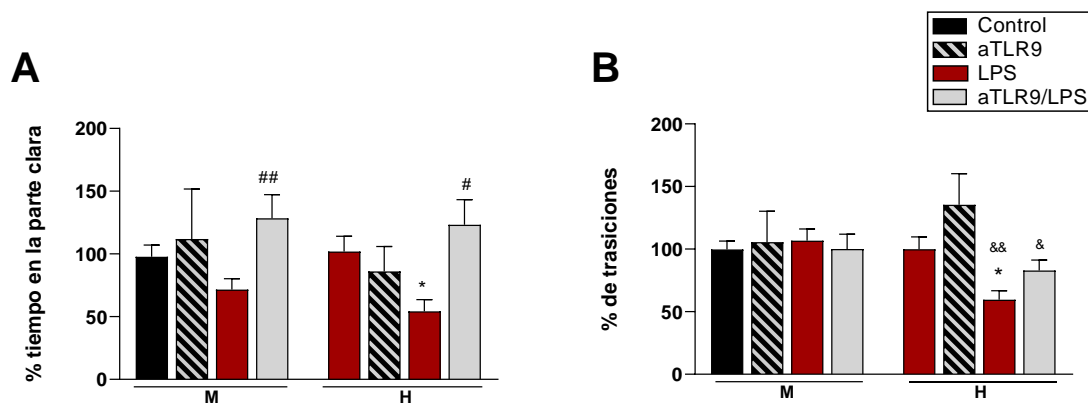
A su vez, el grupo aTLR9/LPS mostró mayor tiempo de permanencia en el compartimento ansiogénico respecto al grupo LPS tanto en machos como en hembras (**Figura 12A**), no existiendo diferencias respecto al grupo control. En cuanto al número de transiciones las hembras tratadas con LPS tienen una reducción significativa cercana al 50%, sin observar ningún efecto en los machos (**Figura 12B**).

En ninguna de las pruebas conductuales que se llevaron a cabo se ha podido comprobar ninguna alteración en el grupo aTLR9 respecto al control. (**Figura 11, Figura 12**).



**Figura 11:** Curso temporal del tiempo de inmovilidad durante la prueba de suspensión de cola en machos (A) y hembras (B); Tiempo total de inmovilidad en 10 minutos (C), machos y hembras, n=4-12 ratones/grupo; ANOVA de dos vías, seguido análisis *post hoc* mediante prueba de comparación múltiple de Fisher LSD: \*\*p<0.01; p<0.001 frente al grupo de control; && p<0.01 diferencias significativas frente al grupo aTLR9; #p<0.05 diferencias significativas frente al grupo LPS.; Las barras representan la media y el error estándar (E.E.M).





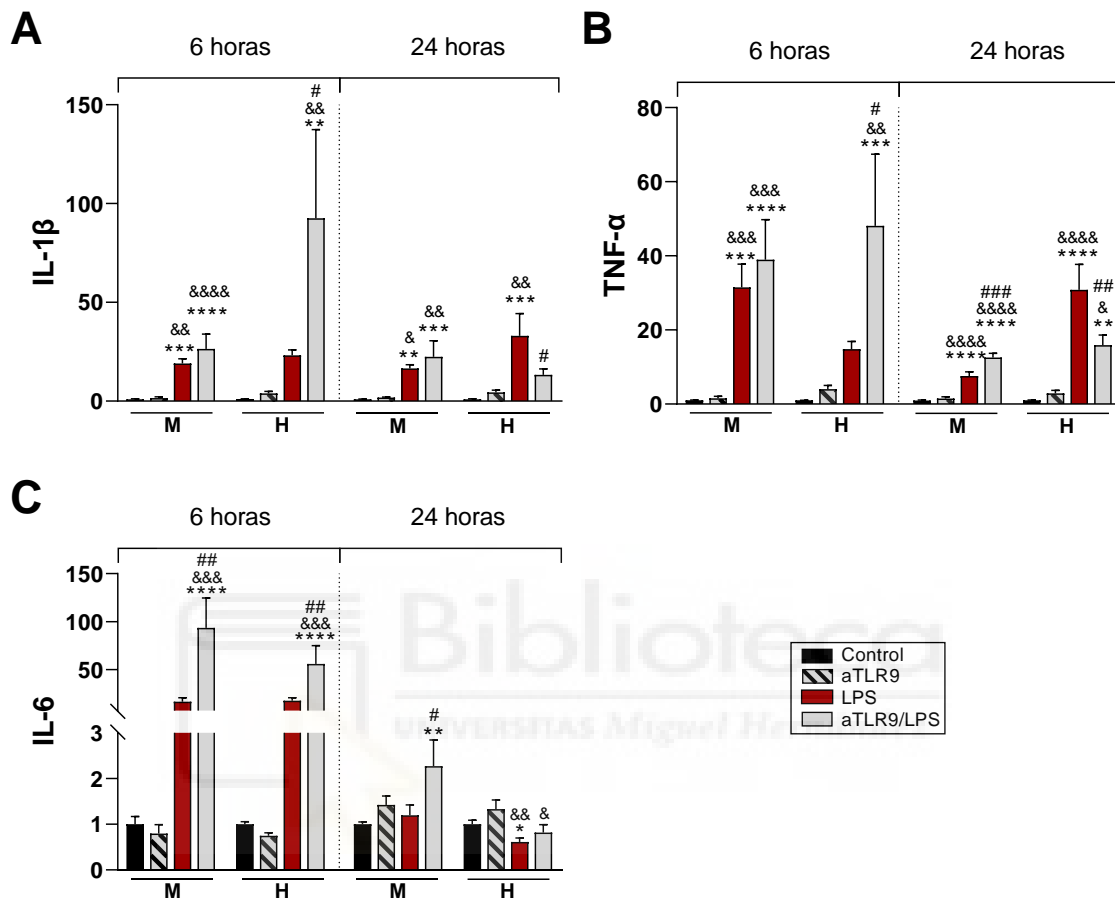
**Figura 12:** A) Tiempo transcurrido en la parte clara respecto al control, expresado como porcentaje de cambio respecto al grupo de control B) número de transiciones, expresado como porcentaje de cambio respecto al grupo de control. n=4-12 ratones/grupo; ANOVA de dos vías, seguido análisis *post hoc* mediante prueba de comparación múltiple de Fisher LSD: \* $p < 0.05$  frente al grupo de control; && $p < 0.01$  diferencias significativas frente al grupo aTLR9; # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$  diferencias significativas frente al grupo LPS; & $p < 0.05$ ; Las barras representan la media y el error estándar (E.E.M).

### 4.3. Cambios en la expresión génica de citoquinas proinflamatorias

En cuanto a los cambios en la expresión génica que se realizó, mediante técnicas de *rt-qPCR*, de las principales citoquinas asociadas a efectos proinflamatorios (**Figura 13**). En la expresión de ARN mensajero de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (**Figura 13A**, **Figura 13B**) se observó una expresión aumentada significativamente en el grupo LPS y en aTLR9/LPS respecto al control, a las 6 y 24h en machos. Sin embargo, en las hembras se puede observar diferencias significativas respecto al grupo LPS, en aTLR9/LPS, siendo más elevado a las 6 horas, pero posteriormente disminuyendo hasta la normalización respecto al control, en el caso de IL-1 $\beta$ , y de manera significativa respecto al LPS en ambas.

Por otro lado, la expresión de IL-6 (**Figura 13C**), a las 6h, el grupo aTLR9/LPS presentó una elevación significativa de dicha citoquina respecto al grupo control y al grupo LPS, en ambos géneros, permaneciendo elevada a las 24h solamente en los machos.

Cabe destacar que el efecto sobre la producción de estas citoquinas en el grupo aTLR9 es nula.



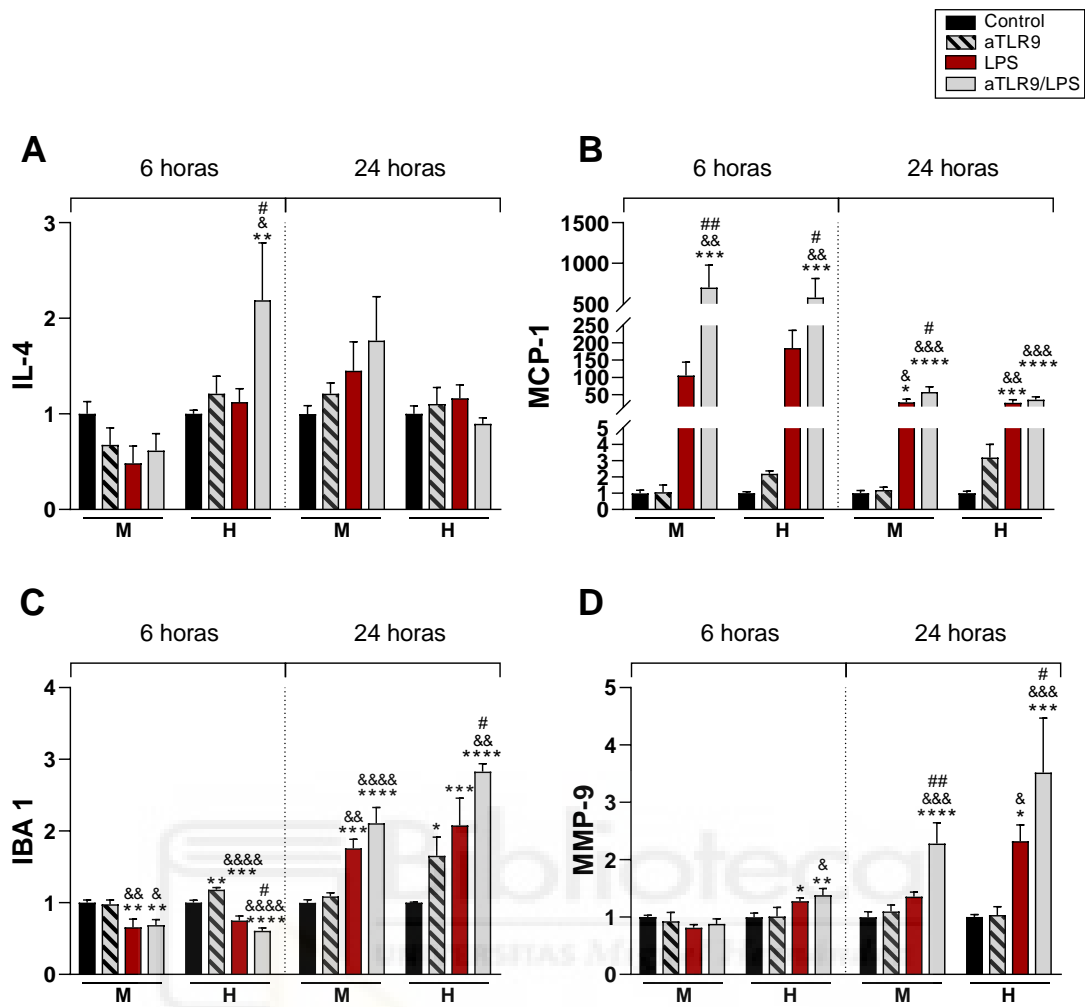
**Figura 13:** Expresión génica de las citoquinas proinflamatorias. Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (A), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (B), e interleucina 6 (IL-6) (C) en el hipocampo, a las 6 y 24 horas después de la exposición a LPS, machos y hembras, n=4-10 ratones/grupo ; ANOVA de dos vías, seguido análisis *post hoc* mediante prueba de comparación múltiple de Fisher LSD en cada punto temporal y género: \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001 diferencias significativas frente al grupo de control; &p<0.05; &&p<0.01; &&&p<0.001; &&&&p<0.0001 diferencias significativas entre el grupo aTLR9; #p<0.05; ##p<0.01 diferencias significativas frente al grupo LPS. Las barras representan la media y el error estándar (E.E.M) de  $2^{-\Delta\Delta C}$

#### 4.4. Modulación de la expresión génica de dianas asociadas a la inflamación

A su vez, La expresión génica de mediadores que pueden estar involucrados en la respuesta inflamatoria (**Figura 14**), se vio un aumento significativo a las 6h de la IL-4 del grupo aTLR9/LPS respecto al control y al LPS en hembras, y un ligero aumento no significativo a las 24h en machos (**Figura 14A**).

Remarcablemente, se observó aumento muy significativo en la expresión de MCP-1 en el grupo aTLR9/LPS a las 6h respecto al resto de grupos, con medias de 578 y 701 veces de cambio relativo (275, 233 E.E.M) en machos y hembras (**Figura 14B**).

En contraposición a este aumento, se observó una disminución significativa seguido de un aumento, a las 6h y 24h, de IBA 1 en los grupos tratados con LPS (**Figura 14C**). por último, cabe destacar la expresión de la MMP9, a las 24h, aumentó significativamente respecto al grupo control y LPS tanto en machos como en hembras (**Figura 14D**). Es importante resaltar que los roedores tratados con ODN1826 no muestran diferencias respecto al grupo control salvo un ligero aumento en las hembras de IBA1 tanto a las 6 como a las 24h.



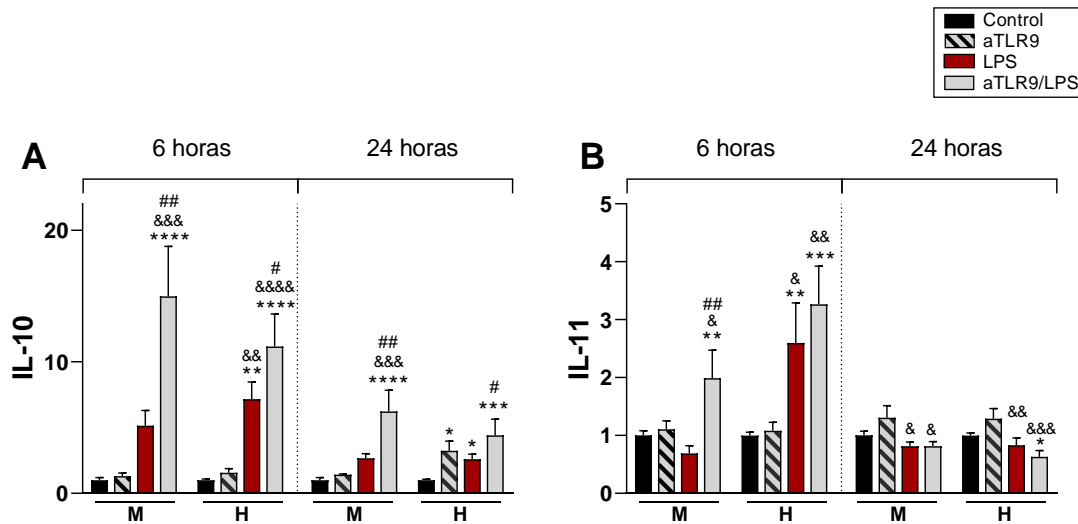
**Figura 14:** Expresión génica de moduladores de la inflamación. Interleucina 4 (IL-4) (A), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) (B), Molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (IBA 1) (C), y metaloproteína de la matriz 9 (MMP-9) (D) en el hipocampo, a las 6 y 24 horas después de la exposición a LPS, machos y hembras, n=4-10 ratones/grupo ; ANOVA de dos vías, seguido análisis *post hoc* mediante prueba de comparación múltiple de Fisher LSD en cada punto temporal y género: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001 diferencias significativas frente al grupo de control; &p<0.05; &&p<0.01; &&&p<0.001; &&&&p<0.0001 diferencias significativas entre el grupo aTLR9; #p<0.05; ##p<0.01 diferencias significativas frente al grupo LPS. Las barras representan la media y el error estándar (E.E.M) de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### 4.5. Cambios de la expresión génica de citoquinas antiinflamatorias

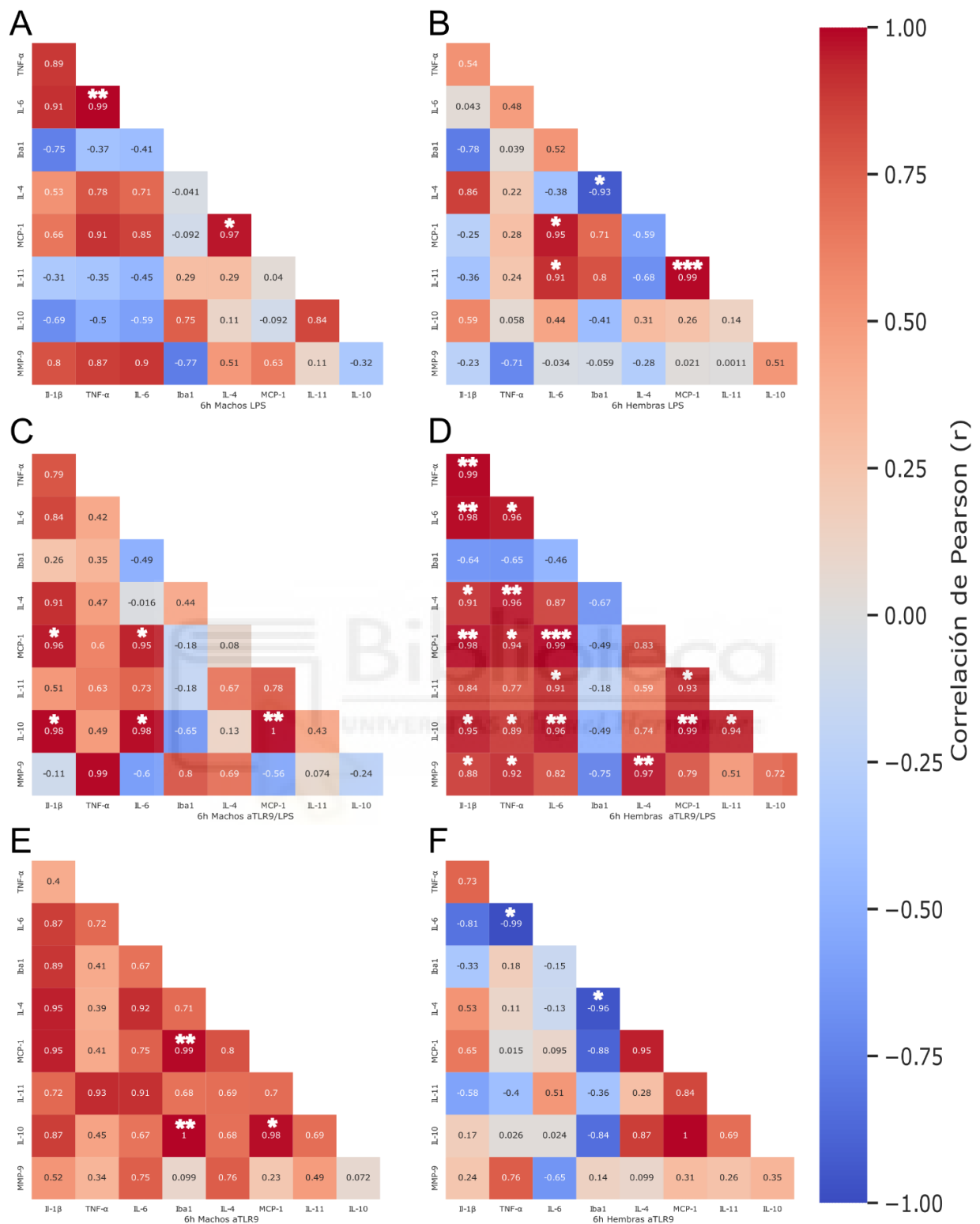
En comparación, la expresión génica de las citoquinas antiinflamatorias se observó un aumento significativo de la IL-11 a las 6 horas en el grupo aTLR9/LPS. Curiosamente, las hembras del grupo LPS 6 horas mostraron un aumento significativo respecto al control; mientras que, en los machos, en el grupo LPS 6 horas se observó una ligera disminución con una diferencia significativa respecto al grupo aTLR9/LPS (**Figura 15B**). Se puede apreciar que los roedores aTLR9/LPS tienen un aumento significativo en todos los puntos temporales de IL-10 (**Figura 15A**), respecto al grupo control como al grupo LPS. Mostrando un cambio relativo de 14,9 y 11,2 a las 6h veces, para machos y hembras respectivamente, como 6,2 y 4,4 veces a las 24h para machos y hembras respectivamente. En cuanto al grupo aTLR9 se observa una ligera tendencia a aumentar la IL-10 e IL-11 que solamente se vuelve significativa, IL-10, en las hembras del grupo 24h (**Figura 15A**).

Este aumento de la IL-10 en el grupo aTLR9/LPS se correlacionó fuerte y significativamente a las 6 horas con otras variables, como IL-1 $\beta$ , MCP-1 e IL-6, en machos y en hembras. (**Figura 16C, Figura 16D**). mientras que esas correlaciones no se observaron en los roedores tratados solamente con LPS (**Figura 16A, Figura 16B**).

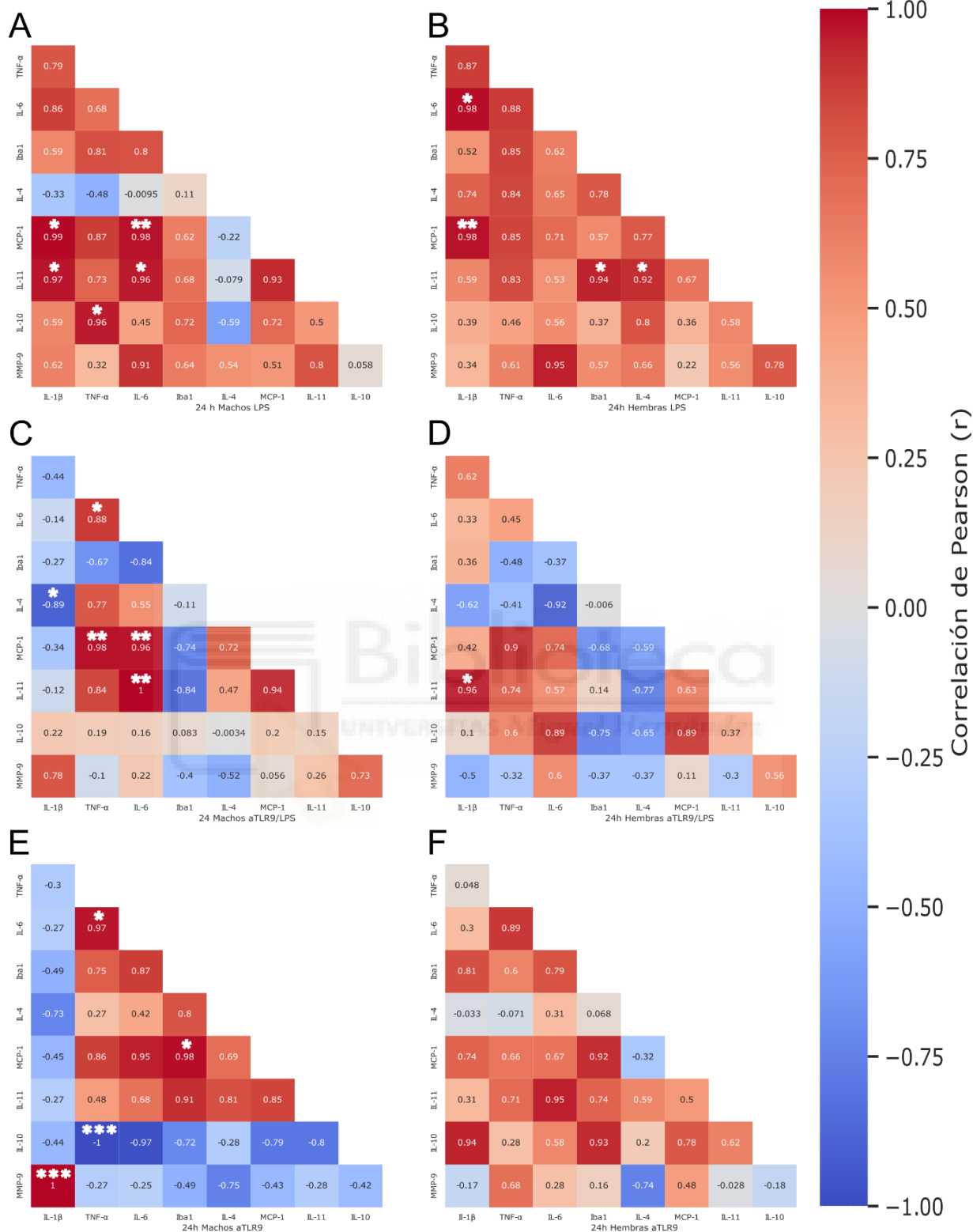
En cuanto al grupo tratado con agonista se vio una correlación fuerte y positiva de la IL-10 respecto al MCP-1, siendo solamente significativa en los machos (**Figura 16E, Figura 16F**). Sin embargo, estas correlaciones desaparecieron a las 24h (**Figura 17**).



**Figura 15:** Expresión génica de citoquinas antiinflamatorias. Interleucina 10 (IL-10) (A), e Interleucina 11 (IL-11)(B) en el hipocampo, a las 6 y 24 horas después de la exposición a LPS, machos y hembras, n=4-10 ratones/grupo ; ANOVA de dos vías, seguido análisis *post hoc* mediante prueba de comparación múltiple de Fisher LSD en cada punto temporal y género: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001 diferencias significativas frente al grupo de control; &p<0.05; &&p<0.01; &&&p<0.001; &&&&p<0.0001 diferencias significativas entre el grupo aTLR9; ##p<0.01 diferencias significativas frente al grupo LPS. Las barras representan la media y el error estándar (E.E.M) de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .



**Figura 16.** Matriz de correlación de la expresión del ARNm en el hipocampo en el grupo de machos LPS (A), grupo de hembras LPS (B), grupo de machos aTLR9/LPS (C), grupo de hembras aTLR9/LPS (D), grupo de machos aTLR9 (E), grupo de hembras aTLR9 (F) **6 horas** después de la exposición a LPS; n=4-10 ratones/grupo; Coeficiente de correlación de Pearson: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.



**Figura 17** Matriz de correlación de la expresión del ARNm en el hipocampo en el grupo de machos LPS (A), grupo de hembras LPS (B), grupo de machos aTLR9/LPS (C), grupo de hembras aTLR9/LPS (D), grupo de machos aTLR9 (E), grupo de hembras aTLR9 (F) **24 horas** después de la exposición a LPS; n=4-10 ratones/grupo; Coeficiente de correlación de Pearson: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

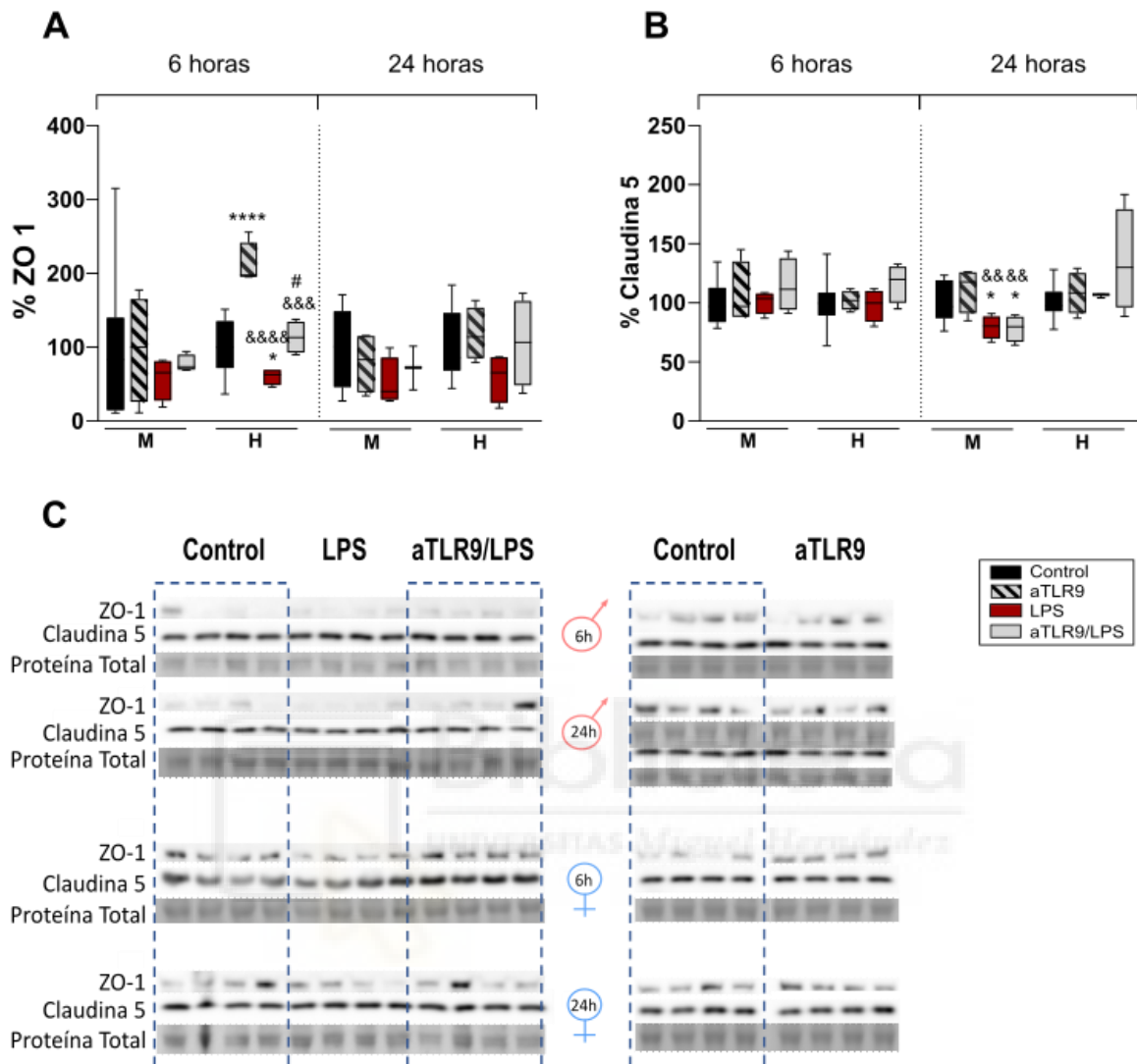


#### 4.6. Cambios de la expresión proteica de las uniones estrechas

De manera adicional se comparó la expresión de proteínas involucradas en las uniones intercelulares estrechas, mediante técnicas de *Western blot* (**Figura 18C**). se observó reducciones significativas de *Zonula occludens 1* (ZO1) a las 6 horas en hembras del grupo LPS; mientras que en el grupo aTLR9/LPS puede observarse una normalización respecto al control significativa de los niveles comparado con el grupo LPS, observándose esa misma tendencia a las 24h (**Figura 18A**).

Por otro lado, se apreció alteraciones a las 24h en los roedores machos tratados con LPS (**Figura 18B**). Cabe destacar que no se encontró efectos en la expresión de estas proteínas en los roedores del grupo aTLR9.



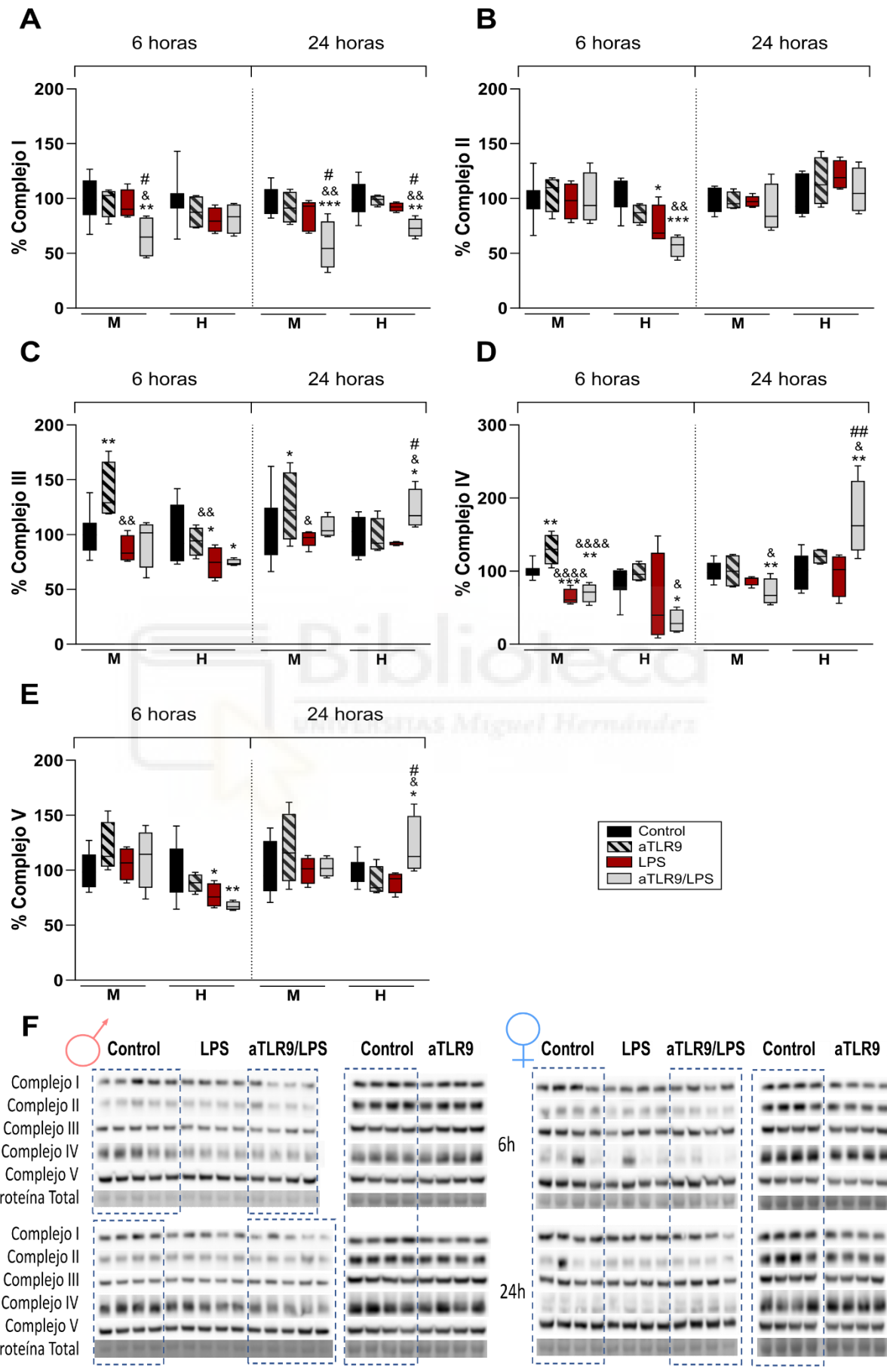


**Figura 18:** Expresión proteica de proteínas involucradas en las uniones intercelulares estrechas. *Zonula occludens 1* (ZO1) (A), Claudina 5 (B), imagen de los *Western Blot* analizados (C). A las 6 y 24 horas después de la exposición a LPS, machos y hembras, n=4-8 ratones/grupo ; ANOVA de dos vías, seguido análisis *post hoc* mediante prueba de comparación múltiple de Fisher LSD en cada punto temporal y género: \*p<0.05; \*\*\*\*p<0.0001 diferencias significativas frente al grupo de control; &&p<0.01; &&&p<0.0001 diferencias significativas entre el grupo aTLR9; #p<0.05 diferencias significativas frente al grupo LPS. Las barras representan la media expresado en porcentaje respecto al grupo control y el error estándar (E.E.M).

#### 4.7. Cambios de la expresión proteica de los complejos mitocondrial implicados en la fosforilación oxidativa

Por otro lado, se valoró posibles alteraciones en la expresión proteica de los complejos mitocondriales involucrados en la fosforilación oxidativa. se observó una disminución significativa del complejo mitocondrial I respecto a los grupos control y LPS de los roedores tratados con aTLR9 y LPS, a las 24h, tanto en machos con una reducción del 50% como en hembras con una reducción del 30%, pero no así en los animales tratados solamente con ODN1826 (**Figura 19A**). Sin embargo, se observó una mayor disparidad en la expresión del resto de complejos (**Figura 19B, Figura 19C, Figura 19D, Figura 19E**).



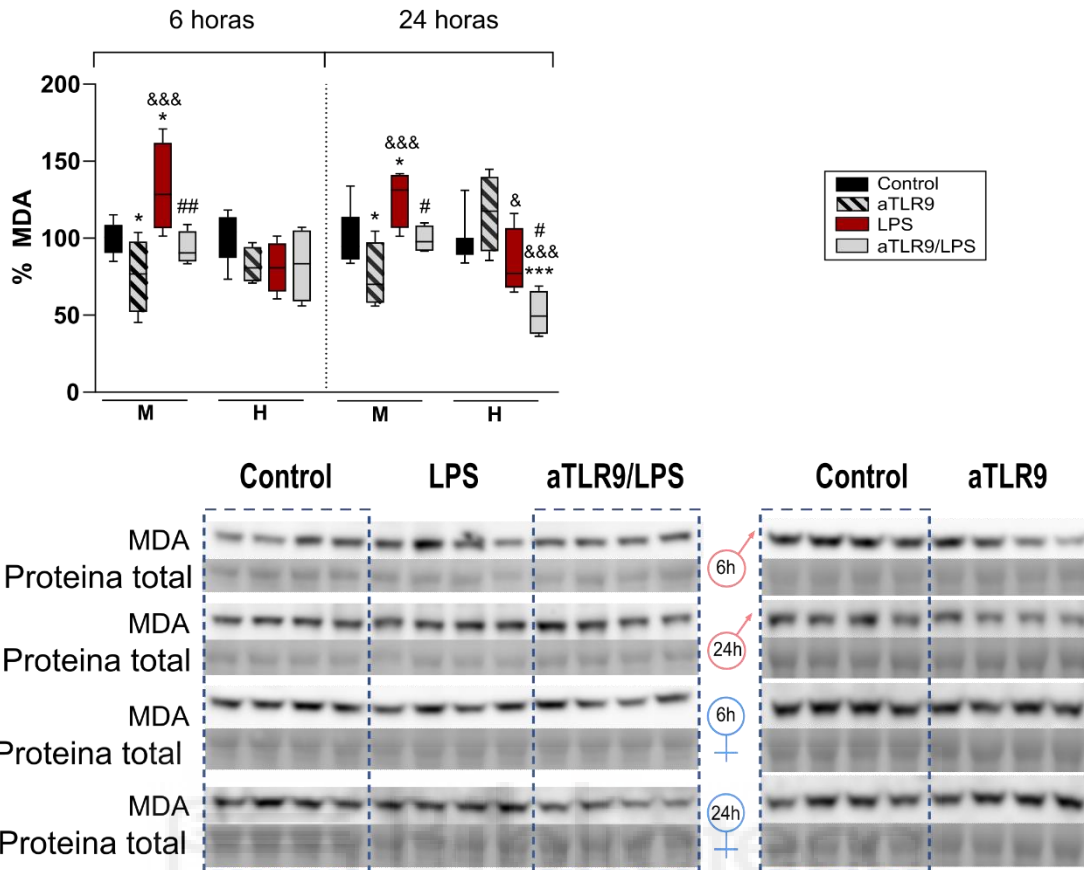


**Figura 19:** Expresión proteica de los complejos mitocondriales en el hipocampo. Complejo

mitocondrial I (A), complejo mitocondrial II (B), complejo mitocondrial III (C), complejo mitocondrial IV (D), complejo mitocondrial v (E), imagen de los *Western Blot* analizados (F). A las 6 y 24 horas después de la exposición a LPS, machos y hembras, n=4-8 ratones/grupo ; ANOVA de dos vías, seguido análisis *post hoc* mediante prueba de comparación múltiple de Fisher LSD en cada punto temporal y género: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 diferencias significativas frente al grupo de control; &p<0.05; &&p<0.01; &&&p<0.0001 diferencias significativas entre el grupo aTLR9; #p<0.05; ##p<0.01 diferencias significativas frente al grupo LPS. Las barras representan la media expresado en porcentaje respecto al grupo control y el error estándar (E.E.M).

#### 4.8. Alteraciones en los aductos de Malonaldehído

Así mismo, la expresión de los aductos de Malonaldehído (MDA) (**Figura 20**) en los machos mostró una elevación significativa de los niveles de MDA del grupo LPS, tanto a las 6 como a las 24h, mientras que los roedores del grupo aTLR9/LPS exhiben una normalización respecto al control significativa comparado con el grupo LPS a las 6 y 24h de la expresión de MDA. Sin embargo, en las hembras, no se observó un aumento en el MDA en el grupo LPS, pero si una reducción significativa en el grupo 24h respecto al grupo control y LPS. Finalmente, hay que remarcar que los ratones macho expuestos al ODN1826 muestran una disminución significativa en la expresión de MDA.

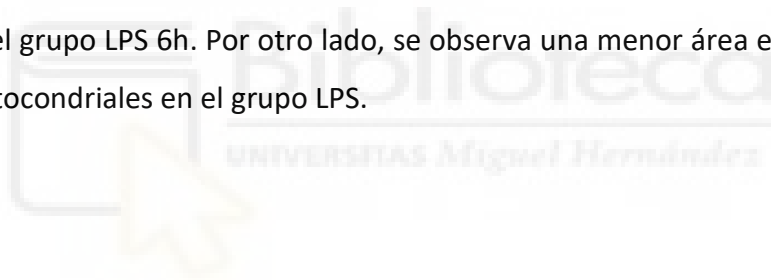


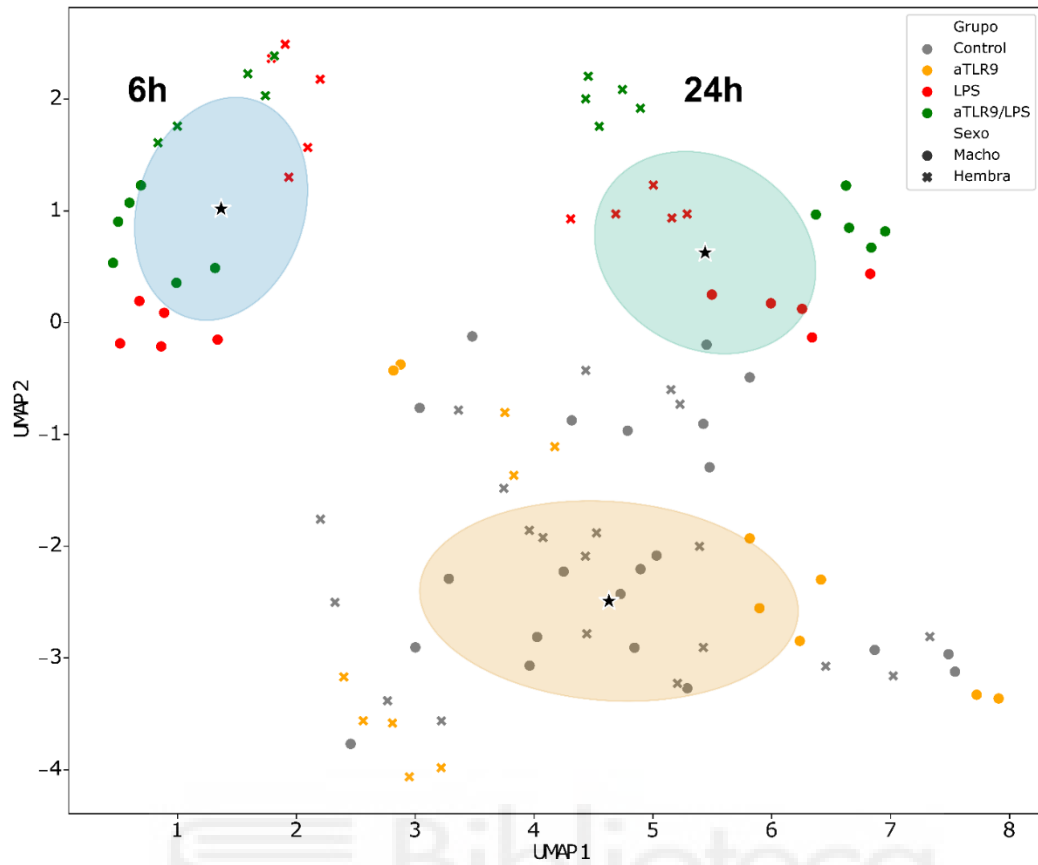
**Figura 20:** Expresión relativa de aductos de MDA en el hipocampo. A las 6 y 24 horas después de la exposición a LPS, machos y hembras, n=4-8 ratones/grupo ; ANOVA de dos vías, seguido análisis *post hoc* mediante prueba de comparación múltiple de Fisher LSD en cada punto temporal y género: \*p<0.05; \*\*\*p<0.001 diferencias significativas frente al grupo de control; &p<0.05; &&&p<0.001 diferencias significativas entre el grupo aTLR9; #p<0.05; ##p<0.01 diferencias significativas frente al grupo LPS. Las barras representan la media expresado en porcentaje respecto al grupo control y el error estándar (E.E.M).

#### 4.9. Visualización de los grupos mediante técnicas de reducción de la dimensionalidad

Mediante técnicas de reducción de dimensionalidad aplicadas a el conjunto de datos expuesto con anterioridad (**Figura 21**), muestran cómo el algoritmo k-medias divide en 3 grandes clústeres los individuos, dónde corresponden a los ratones 6h y los ratones 24h tratados con LPS, además de un tercer clúster que corresponde con los grupos control como aTLR9. Adicionalmente, se apreció dentro de los clústeres 6h y 24h una segregación por sexo, y por grupos entre LPS y aTLR9/LPS.

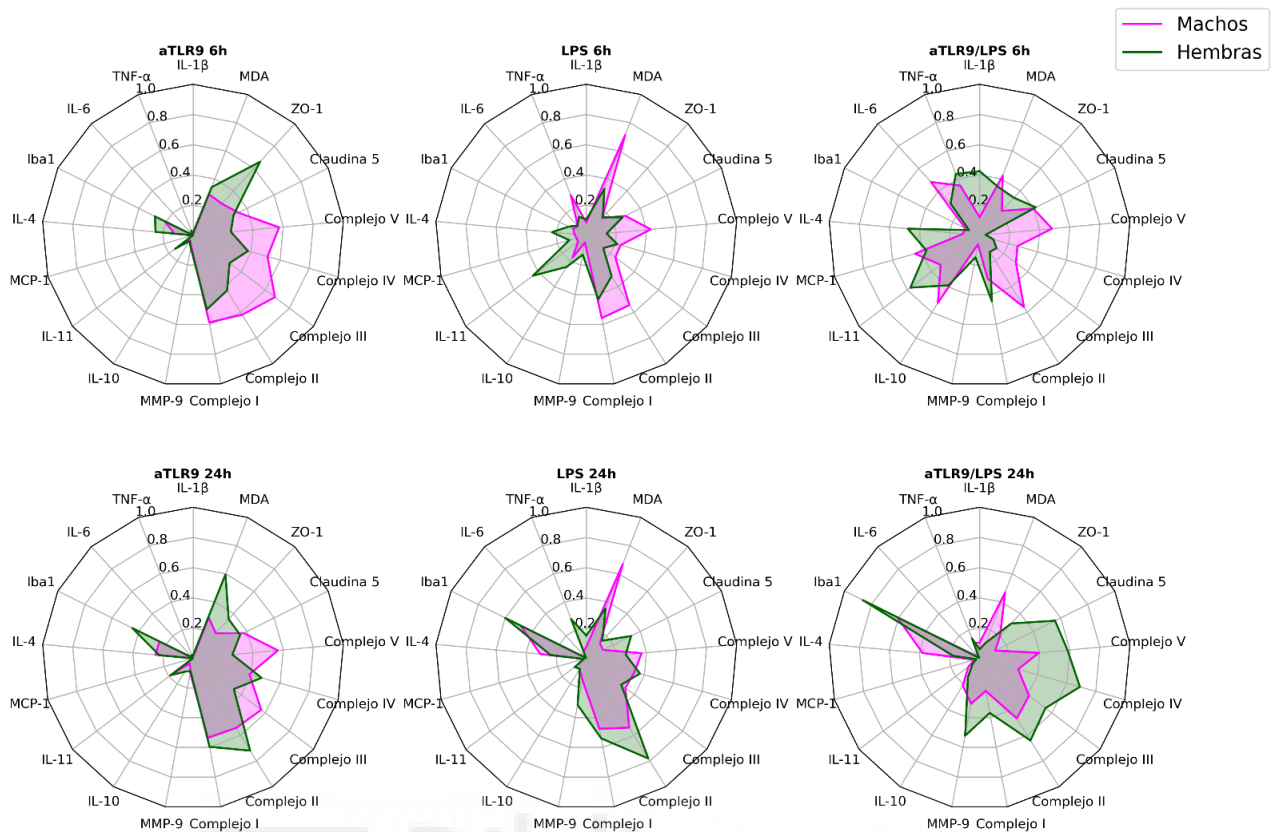
El gráfico de radar (**Figura 22**) muestra un resumen de todas las variables empeladas en la reducción dimensional, además, de cómo los machos y las hembras muestran patrones característicos en cada grupo. Cabe resaltar como los machos y hembras del grupo aTLR9/LPS 6h tienen mayor área en el eje IL-10, IL-11, MCP-1, IL-4 respecto a sus homólogos del grupo LPS 6h. Por otro lado, se observa una menor área en el eje de los complejos mitocondriales en el grupo LPS.





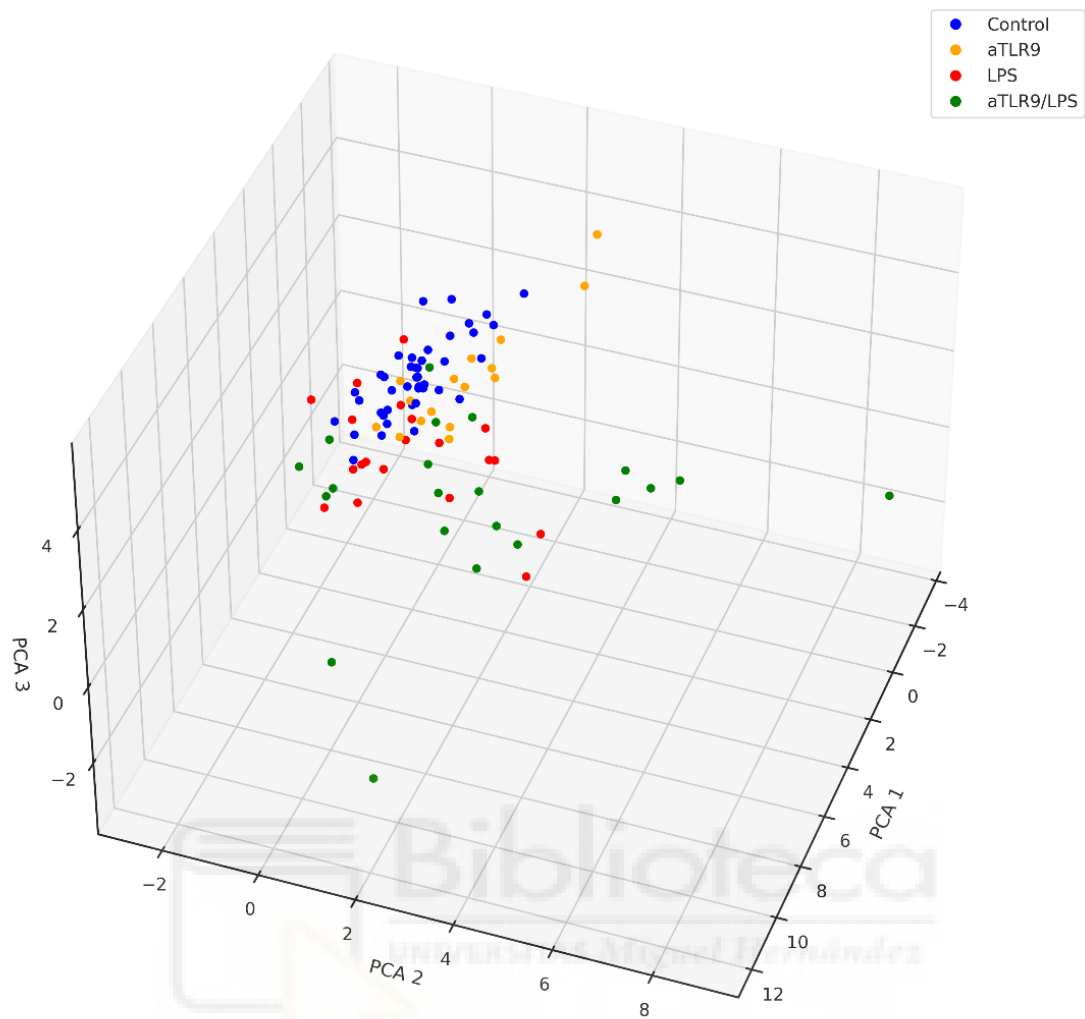
**Figura 21.** Reducción de dimensionalidad no lineal mediante algoritmo UMAP. Cada punto corresponde con un individuo  $n=98$ , Las estrellas representan los centrómeros de los tres clústeres generados con el algoritmo K-medias, las elipses representan la dispersión de dichos clústeres.



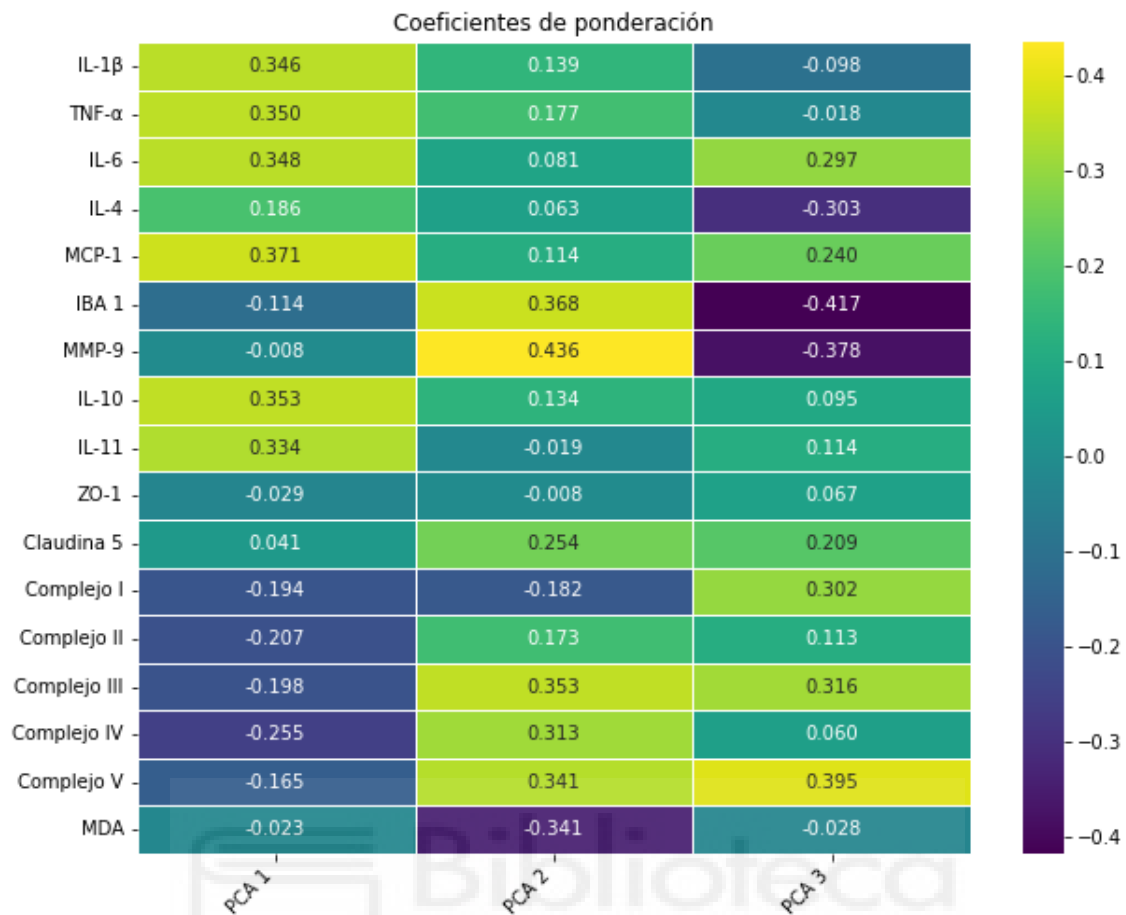


**Figura 22.** Gráfico de radar con el patrón de expresión de las diferentes dianas analizada en los ratones tratados con aTLR9, LPS y aTLR9/LPS, tanto en machos como en hembras. Se representa la expresión media de cada grupo escalada entre 0 y 1.

El resultado del análisis de componentes principales (PCA) muestra como con 3 componentes se puede explicar hasta el 65% de la variabilidad observada, como se puede apreciar en su representación en 3D (**Figura 23**), siendo el PCA1 el componente mayoritario que explicaría hasta un 36%, seguido de los componentes PCA2 (17%) y el PCA3 (12%). En este sentido, se observa una gran importancia del MCP-1 e IL-10 en el PCA1, así como el MMP-9 y de manera negativa MDA en el PCA2 (**Tabla 6**).



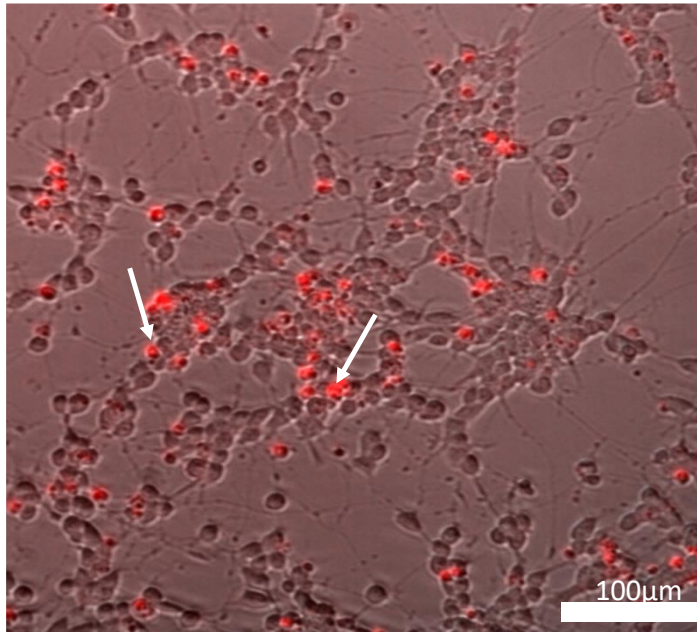
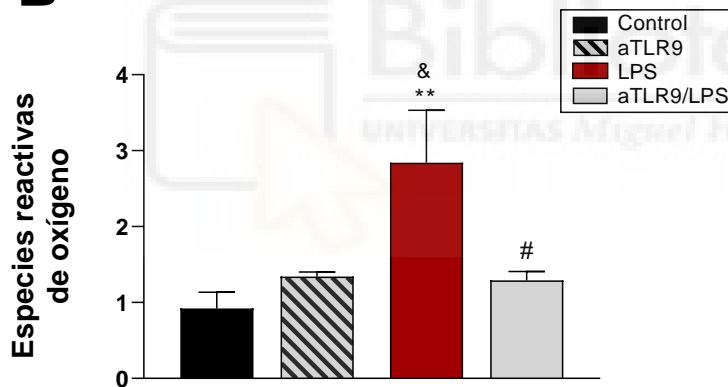
**Figura 23.** Representación tridimensional de los 3 componentes mayoritarios en el análisis PCA.



**Tabla 6.** coeficientes de ponderación de cada variable para los tres principales componentes.

#### 4.10. Generación de especies reactivas de oxígeno en células SH-SY5Y

Por otro lado, los estudios en cultivos de neuroblastomas humanos de la línea SH-SY5Y, diferenciados a tipo neuronal, mostraron un aumento significativo en la presencia de especies reactivas de oxígeno en el grupo LPS en comparación con el grupo control (**Figura 24**). Además, en el grupo aTLR9/LPS se observa como permanece disminuidas significativamente las especies reactivas de oxígeno en comparación con el grupo LPS.

**A****B**

**Figura 24.** Producción de especies reactivas de oxígeno en células SH-SY5Y diferenciadas en neuronas. A) representación de la producción de las especies reactivas de oxígeno. B) Gráfica representativa de los datos obtenidos. n = 3 pocillos/grupo; ANOVA de dos vías, prueba de comparación múltiple de Fisher LSD: \*\* $p < 0.01$  diferencias significativas con respecto al grupo de control; & $p < 0.05$  diferencias significativas con respecto al grupo aTLR9; # $p < 0.05$  diferencias significativas con respecto al grupo LPS. Las barras representan la media del cambio relativo respecto al grupo control y el error estándar (E.E.M).

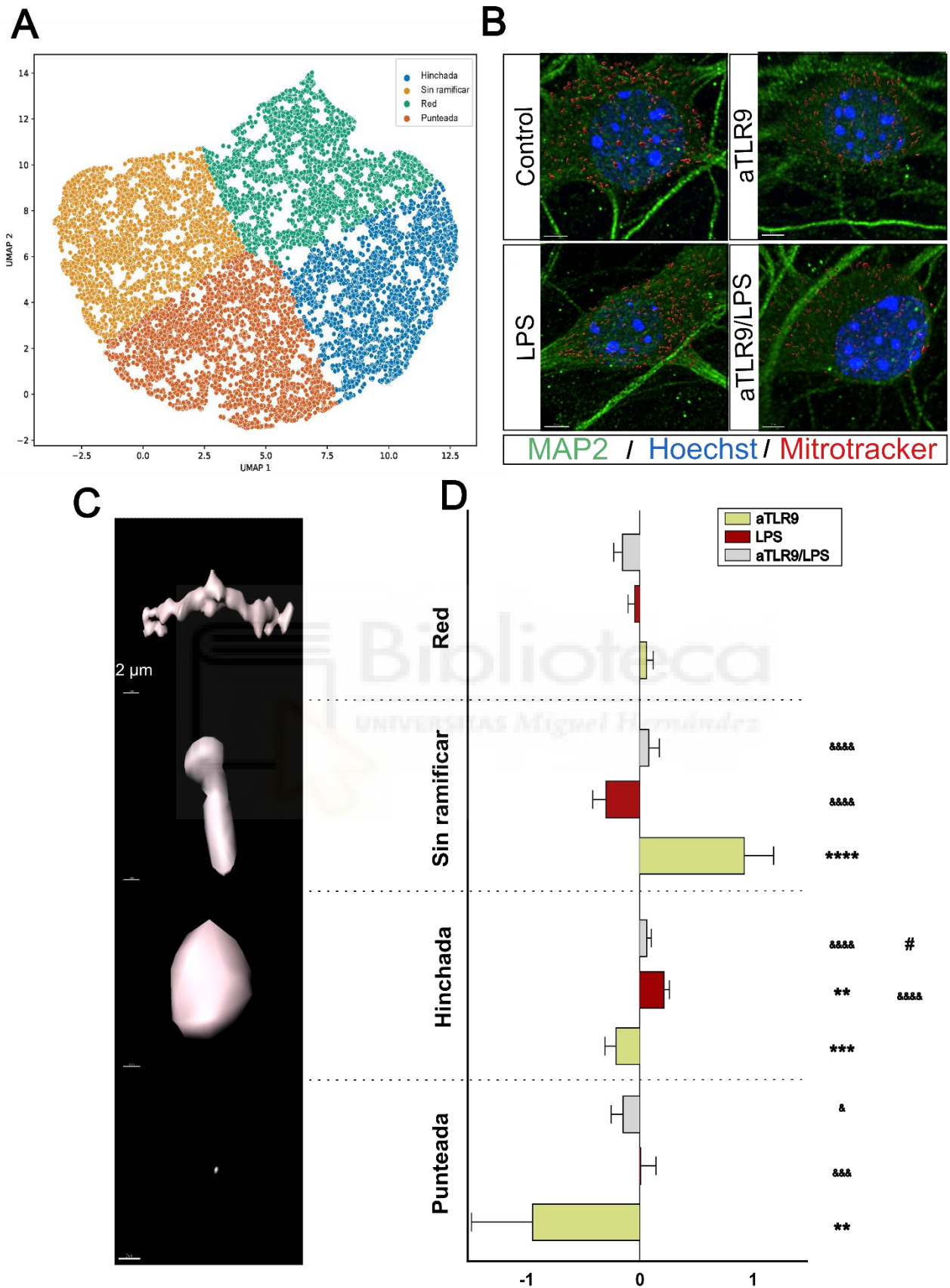
#### **4.11. Alteraciones en la morfología mitocondrial en cultivos primarios de neuronas**

Para finalizar, Se puede observar las imágenes representativas de cultivos neuronales primarios inmunomarcadas con MAP2 (neuronas), Hoescht, (Núcleos), y Mitotracker (mitocondrias) (**Figura 25B**). Una vez marcadas, se realizó una reconstrucción en 3D y los datos tridimensionales se emplearon para realizar una segmentación mediante reducción dimensional seguida de un agrupamiento no supervisado por K-medias (**Figura 25A**). Los clústeres obtenidos fueron analizados y se determinaron a que tipo morfológicos correspondía cada clúster (**Figura 25C**).

Los resultados de este análisis arrojaron un aumento significativo respecto al control y al grupo aTLR9/LPS de las mitocondrias tipo hinchada en el grupo LPS (**Figura 25D**). Cabe destacar que el grupo aTLR9 tiene una disminución significativa en las de tipo hinchada, además de, una disminución del tipo punteadas y un aumento en el tipo sin ramificar.

#### **4.12. Cambios en la longitud de las neuritas en cultivos primarios de neuronas**

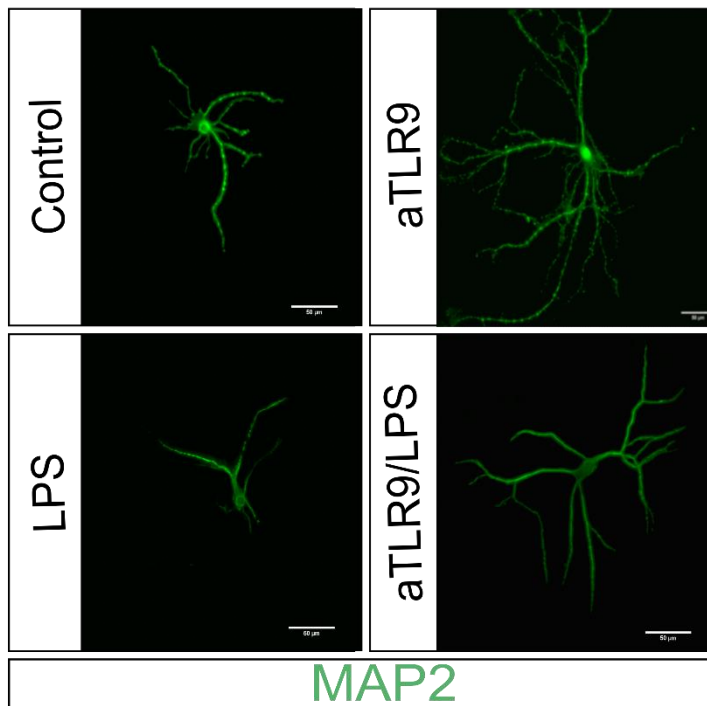
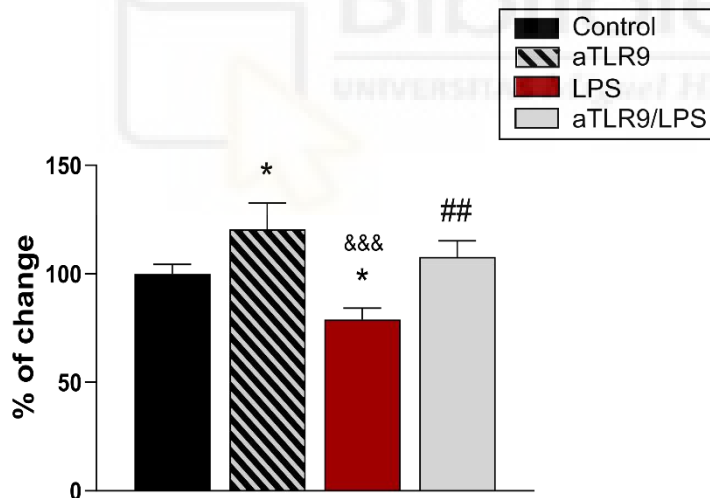
En última instancia, la medición de la longitud de las neuritas primarias arrojó una disminución del 22% en el grupo LPS (**Figura 26B**) respecto al control, esta disminución fue significativa respecto al grupo control y al grupo aTLR9/LPS. Es importante destacar que el grupo aTLR9 mostró un aumento significativo del 20% en el tamaño medio de sus neuritas primarias.



**Figura 25.** Morfología mitocondrial. Segmentación de la morfología mitocondrial mediante reducción dimensional seguido de agrupamiento mediante K-medias, cada punto representa una mitocondria  $n=11592$ , Las estrellas representan los centrómeros de los cuatro clústeres

generados(A). imágenes representativas de cada grupo empleadas para la clasificación mitocondrial (B). Imágenes representativas de cada clúster modelizado en 3D (C). Gráfico de expresión relativa de las morfologías mitocondriales entre cada grupo, n=72 neuronas (D); ANOVA de dos vías, seguido análisis post hoc mediante prueba de comparación múltiple de Fisher LSD; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; ; \*\*\*\*p<0.0001 diferencias significativas frente al grupo de control; &p<0.05; &&p<0.001; &&&p<0.0001 diferencias significativas entre el grupo aTLR9; #p<0.05 diferencias significativas frente al grupo LPS. Las barras representan el Log2 de la media de la expresión relativa respecto al grupo control y el error estándar (E.E.M).

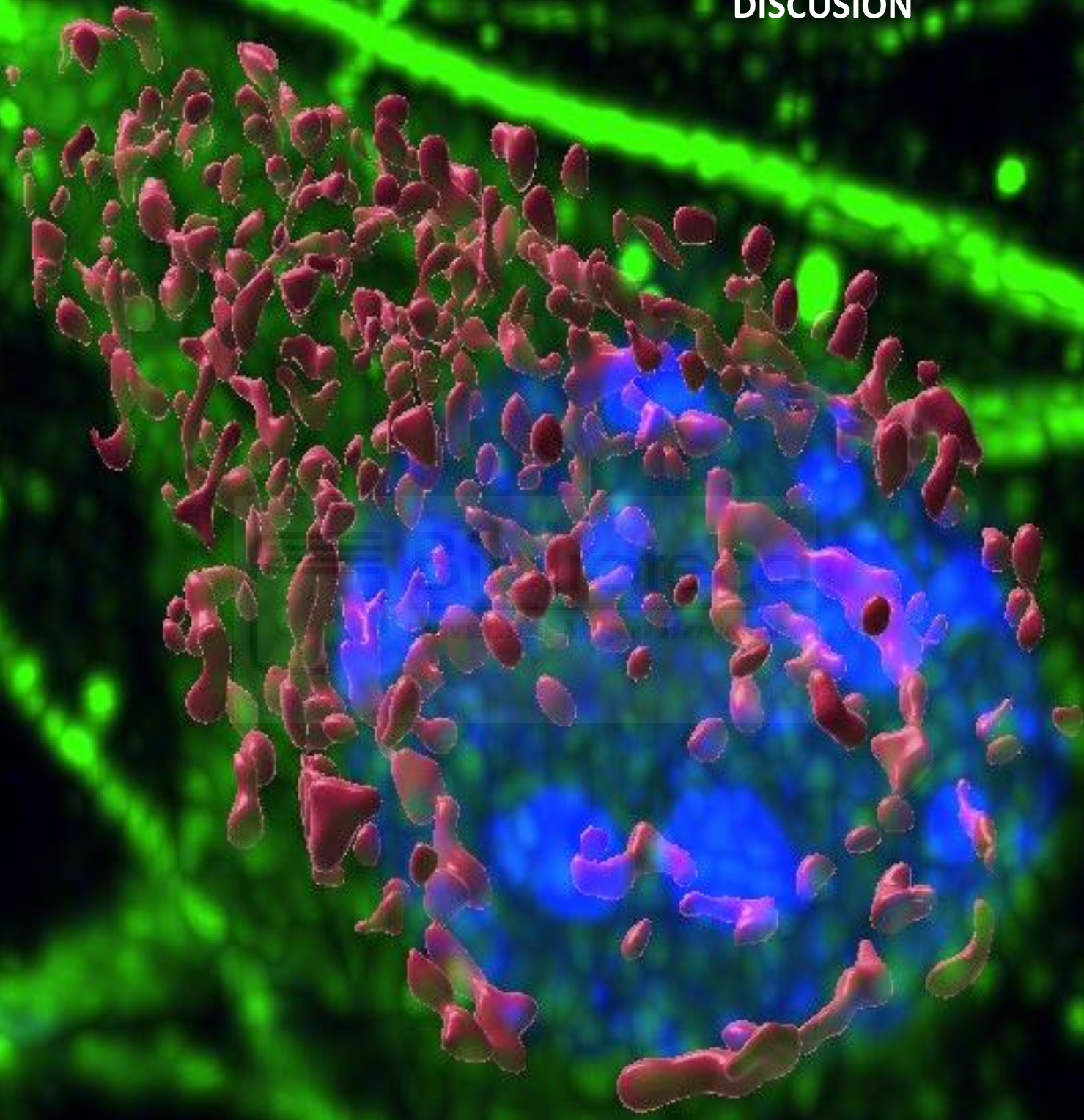


**A****B**

**Figura 26.** Longitud de la neurita. Imagen representativa de cada grupo (A). Porcentaje de cambio de la longitud media de las neuritas (B), n=8-23 neuronas/grupo; ANOVA de dos vías, prueba de comparación múltiple de Fisher LSD: \*p<0.05 diferencias significativas con respecto al grupo de control; &&&p<0.001 diferencias significativas con respecto al grupo aTLR9; ##p<0.01 diferencias significativas con respecto al grupo LPS. Las barras representan la media del cambio relativo en porcentaje respecto al grupo control y el error estándar (E.E.M).



## DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis ponen de manifiesto como la activación farmacológica del receptor tipo Toll 9 consigue bloquear los efectos de la neuroinflamación inducida por el Lipopolisacárido bacteriano. Además, expone como la expresión de diversos genes pueden ayudar a la resolución del daño causado por el LPS, que se manifestaría con menor daño mitocondrial y estrés oxidativo.

A continuación, se abordarán los resultados obtenidos en dos apartados. El primer apartado se caracterizará por la implicación de la administración de un agonista del TLR9 en un modelo animal de depresión inducido por una neuroinflamación periférica. Dónde se expondrá: 1) El pretratamiento bloquea el desarrollo de las alteraciones conductuales. 2) La estimulación del TLR9 no bloquea la producción de citoquinas proinflamatorias inducidas por LPS. 3) El pretratamiento con ODN 1826 previo al LPS ayuda a la resolución del daño. 4) Los ratones tratados con ODN1826 muestran un aumento de la respuesta antiinflamatoria tras la administración de LPS. 5) El LPS afecta de manera diferente a las proteínas que conforman la barrera hematoencefálica en machos y hembras. 6) La administración de ODN 1826 reduce el complejo mitocondrial I ante un insulto con LPS. 7) La estimulación del receptor tipo Toll 9 reduce la producción de estrés oxidativo. Y un segundo apartado, dónde se discutirá el efecto de la estimulación de TLR9 previo a un daño inducido por LPS en modelos in vitro neuronales. El cual incluye: 1) La activación del receptor tipo Toll 9 bloquea la producción de especies reactivas de oxígeno. 2) La activación del TLR9 induce mecanismos mitoprotectores en las neuronas. 3) La administración de ODN 1826 protege del daño neuronal.

Con ello, esta tesis da respuesta al papel que juega la pre-activación del TLR9 en procesos que cursan con neuroinflamación, con la esperanza que sirva para desarrollar nuevas herramientas farmacológicas que puedan ser incorporadas en el arsenal terapéutico, para tratar los cuadros depresivos especialmente aquellos que resisten a la terapia convencional. Además, este estudio garantiza que el diseño de futuras terapias, a través de este mecanismo, puedan ser eficaces independientemente del género. Ya

que, el género femenino presenta mayores tasas de alteraciones emocionales y una baja representación en los estudios.

## 5.1. PRIMERA PARTE

En este primer apartado se discuten los resultados obtenidos del pretratamiento con ODN 1826, por vía intranasal, previo a la administración de LPS en un modelo animal. Se evalúa la respuesta conductual con pruebas de comportamiento emocional ampliamente validados, las posibles alteraciones neuroquímicas asociadas en la región del hipocampo, así como también las posibles diferencias dependiente del sexo.

### 5.1.1. La estimulación del TLR9 bloquea el desarrollo de alteraciones conductuales causadas por el LPS

La administración del LPS provoca un aumento del tiempo de inmovilidad en el test de suspensión por la cola, acorde con la literatura previa, sugiriendo la aparición del fenotipo depresivo inducido por una neuroinflamación (**Figura 11A**). (Chow et al., 1999; Figueroa-Hall et al., 2020; Frenois et al., 2007; Ge et al., 2015; O'Connor et al., 2009; Sulakhiya et al., 2016; Zhang et al., 2022).

Curiosamente los machos y las hembras muestran un patrón diferente en los tiempos de inmovilidad en función del tiempo, y esto podría sugerir que la manera de afrontar la desesperanza inducida por LPS es sexo dependiente. Estos resultados, se alinea con los experimentos realizados por Dockman (Dockman et al., 2022). Este estudio, también, observó un mayor tiempo de inmovilidad en la prueba de depresión, donde el patrón característico de las hembras (Figura 11C) sugiere una mayor susceptibilidad a la administración de LPS en comparación con sus homólogos masculinos (Figura 11B). Por lo cual, futuros estudios deberían abordar estos dimorfismos sexuales. A pesar de ello, se observa que el efecto global del LPS es consistente tanto en machos como en hembras.

Los roedores tratados previamente con ODN 1826 presentan un tiempo de inmovilidad normalizado respecto al grupo control, tanto en machos como en hembras. Por lo tanto, estos datos sugieren que la activación del TLR9 tendría un efecto antidepresivo preventivo independientemente del sexo. Además, este efecto preventivo podría tener una duración prolongada, tal como sugieren datos preliminares (**Anexo – I**), dónde ratones macho fueron tratados con ODN 1826 o vehículo, y al cabo de dos meses se administró LPS, mostrando un claro efecto protector a largo plazo.

Por otro lado, a las 72 horas de la administración de LPS, los roedores tratados con el agonista TLR9 muestran un bloqueo de los efectos ansiogénicos inducidos por el LPS (**Figura 12A**). En este sentido, las hembras del grupo LPS muestran una mayor sensibilidad a las 72 horas (-50%) en comparación con los machos (-30%) del grupo LPS, conjuntamente con una reducción de las transiciones en las hembras del grupo LPS, lo que podría sugerir un menor interés exploratorio. Este hecho, sugiere una mayor vulnerabilidad de las hembras a los efectos del LPS.

El efecto ansiogénico iría en la misma línea del artículo publicado por Zimmerman, dónde sugiere que la activación del TLR9 puede inducir efectos ansiolíticos en ratones estresados por el olor de depredadores (Zimmerman et al., 2012). Sin embargo, Zimmerman puso de manifiesto que la administración periférica repetida de los oligonucleótidos activadores moderados de NFκB, como mEN101 y su homólogo humano BL-7040, son los responsables de este efecto ansiolítico. En contraste, la administración repetida de ODN1826 a 50 mg/Kg mostraba un efecto ansiogénico. Recientemente, Tripathi ha mostrado como la administración intraperitoneal de 30μg de ADN mitocondrial, activador del TLR9, puede producir déficits sociales (Tripathi et al., 2023).

Por tanto, estos efectos contradictorios, de la activación del TLR9, podrían estar influenciados por la dosis, la ruta de administración y la pauta posológica. Se ha descrito que los oligonucleótidos antisentidos no presentan una gran capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (Kilanowska & Studzińska, 2020), aunque algunos estudios

han demostrado que la administración intraperitoneal de CpG-C puede ser detectada en el parénquima cerebral (Benbenishty et al., 2019). Sin embargo, con la administración intranasal se puede evitar parte de ese bloque por la barrera hematoencefálica y obtenemos efectos localizados en el cerebro (Marcello & Chiono, 2023), con lo que podríamos utilizar menores dosis efectivas, lo cual favorecería una menor aparición de reacciones adversas por efectos periféricos y/o el empleo de dosis más elevadas. Por tanto, Nuestro modelo resalta que una dosis localizada, y transitoria de 120 µg antes de un estímulo inflamatorio periférico, podría ejercer un efecto protector, y duradero, en el desarrollo de rasgos depresivos y ansiosos en un modelo agudo de neuroinflamación independientemente del sexo.

#### **5.1.2. La estimulación del TLR9 no bloquea la producción de citoquinas proinflamatorias inducida por LPS**

En cuanto a la expresión de citoquinas proinflamatorias, se puede observar que no existe un bloqueo de la producción de ARN mensajero de las principales citoquinas proinflamatorias inducido por el LPS, cuando se administra el agonista TLR9 previo al LPS (**Figura 13**). Sin embargo, otros compuestos, como la Ketamina, que han mostrado efecto antidepresivo en un modelo similar con LPS tampoco han conseguido bloquear la expresión génica de estas citoquinas (Walker et al., 2013). Por tanto, el efecto ansiolítico y antidepresivo que pudiéramos estar observando, no se relacionaría directamente con la expresión de ARN mensajero citoquinas proinflamatorias.

Adicionalmente, se puede observar ciertas diferencias en el patrón de expresión entre machos y hembras. Esto se puede apreciar en diferentes artículos, dónde existe un dimorfismo sexual tejido y tiempo específico ante estímulos inflamatorios (Dockman et al., 2022; M. A. Erickson & Banks, 2011; Murtaj et al., 2019; Rossetti et al., 2019).

Es importante señalar, como existe un incremento importante de la IL-6 en la fase de la tormenta de citoquinas en los roedores del grupo aTLR9/LPS (**Figura 13C**). Algunos

estudios han relacionado la señalización de IL-6 con declive cognitivo (Lyra e Silva et al., 2021), además de una reducción de la materia gris (Marsland et al., 2008). Sin embargo, algunos estudios sugieren que la citoquina IL-6 podría estar implicada en el viraje de los macrófagos hacia un fenotipo antiinflamatorio M2 (Braune et al., 2017; Y. Jin et al., 2022; Sanmarco et al., 2017). Por lo tanto, con los datos conductuales disponibles, es posible plantear la hipótesis que el aumento de IL-6 en la fase temprana del LPS (**6 horas**), respecto a la fase tardía (**24 horas**), podría ser una respuesta protectora que favorece la recuperación del daño tisular inducido por los efectos del LPS (Johnson et al., 2020; Lin et al., 2003).

Por otro lado, Stevens describió el efecto neuroprotector en un modelo de isquemia cerebral pretratado 72 horas antes con ODN 1826. En dicho modelo, observó que los ratones carentes de TNF- $\alpha$  no se beneficiaban del efecto protector del agonista TLR9 (Selles et al., 2017; Stevens et al., 2008). Por lo que, en este estudio en particular, se deduce que la señalización de TNF- $\alpha$  es indispensable para obtener los efectos beneficiosos del agonista TLR9. En nuestro estudio, no lo podemos deducir ya que se necesitarían hacer más experimentos de validación específicamente dirigidos a la manipulación farmacológica o genética de TNF- $\alpha$ , pero sugiere que la señalización de TNF- $\alpha$  es importante para la resolución del daño causada por LPS. Por otro lado, en neuronas, otros autores han sugerido vías moleculares alternativas (Shintani et al., 2014) no dependientes de TNF- $\alpha$ , por lo que otros mecanismos podrían estar también implicados y se deberían explorar en futuras investigaciones.

### **5.1.3. El pretratamiento con ODN 1826 previo al LPS ayuda a la resolución del daño**

Uno de los cambios más llamativos que se observa, es el acusado aumento en la expresión de MCP-1 en los roedores del grupo aTLR9/LPS (**Figura 14B**). Estudios previos han reportado la importancia de MCP-1 en la progresión de la neuroinflamación. Thompson observó como los ratones carentes de MCP-1 tenían una respuesta inflamatoria cerebral reducida, a pesar de tener una respuesta periférica aumentada

(Thompson et al., 2008). Otro estudio mostró como la neuroinflamación crónica, derivada de la respuesta del organismo a un cuerpo extraño, estaba disminuida en los ratones MCP-1 Knock-Out o aquellos tratados con inhibidores de MCP-1 (Sawyer et al., 2014).

Sin embargo, la actividad de MCP-1 se ha relacionado con la actividad reparadora de IL-6 (Hosaka et al., 2017). Adicionalmente, otro estudio demostró que MCP-1 redujo de manera dosis dependiente el daño neuronal atribuible al NMDA, o al glutamato, y previene la pérdida de los niveles de ATP (Madrigal et al., 2009).

Cabe señalar, que estudios recientes han descubierto como MCP-1 induce la expresión de la proteína inducible de MCP-1(MCPIP1), la cual se ha visto implicada en la acción neuroprotectora de la minociclina, en un modelo de isquemia/reperfusión cerebral (Z. Jin et al., 2015). Además, se ha asociado con el incremento de la IL-10, y por tanto, de un efecto antiinflamatorio (Takada et al., 2010), que en nuestro modelo ayudaría a reducir el exceso de inflamación mediada por el LPS.

Por otro lado, es plausible que las neuronas del hipocampo puedan estar incrementando la producción de MCP-1 como una señal de alerta del daño que están experimentando (Flügel et al., 2001). Este interesante mecanismo se observa cuando existe una estimulación cerebral de TLR9, y que se ve potenciado cuando existe un daño. El aumento de MCP-1 debido a la estimulación de TLR9 ha sido descrita por Lee en cultivos celulares de macrófagos (J.-G. Lee et al., 2008), pero su implicación en el desarrollo de rasgos depresivos no había sido descrita hasta la fecha.

Algunos estudios han puesto de manifiesto la capacidad de IL-4 de inducir un fenotipo M2 de la microglía y los macrófagos (Celik et al., s. f.; X. Liu et al., 2016). Además de, inducir la liberación de IL-6 por parte del fenotipo M2, y por tanto de su acción reparadora (Casella et al., 2016). En relación a la expresión génica de IL-4 (**Figura 14A**), no vemos ningún cambio significativo en esta ventana temporal, en los machos. En las

hembras existe un aumento a las 6 horas en el grupo aTLR9/LPS en las hembras, que podría indicar un efecto protector por parte del ODN 1826.

Sin embargo, estos datos son insuficientes para darnos una respuesta clara en nuestro modelo en relación a los machos, pero sugieren que podría haber diferencias que podrían ser detectadas en otra ventana temporal.

En cuanto a la expresión de IBA-1 (**Figura 14C**), un marcador tradicionalmente empleado para evaluar la microglía y tradicionalmente asociado a estados neuroinflamatorios (D. Ito et al., 2001). Se observa una disminución en la expresión génica a las 6 horas en los roedores tratados con LPS. Este hallazgo aparentemente sorprendente, podría estar indicando como la microglía está reorganizando su arquitectura, adquiriendo una morfología ameboides. Esta hipótesis, iría en la línea de lo observado por Silverman, donde encontró resultados similares, a las 4 horas de la administración de LPS, en ratones machos de la cepa Balb/c mediante técnicas de inmunohistoquímica y expresión génica (Silverman et al., 2015). Esta morfología activada podría estar involucrada en la liberación de mediadores proinflamatorios para reparar el tejido (Woodburn et al., 2021). Por otro lado, el subsecuente aumento de la expresión de IBA1 en los grupos que se les administró LPS, podría estar indicando esta activación de la microglía (D. Ito et al., 2001). No obstante, Shi encontró unos resultados inconsistentes en los datos observados en técnicas inmunohistoquímicas y la expresión de ARNm, como técnica para detectar la activación de la microglía (Shi et al., 2021).

Por lo que, este resultado aislado no nos permitiría evaluar el estado de la microglía a las 24 horas de la administración del LPS. Pero si un indicio de la reorganización estructural, y, por tanto, un cambio en la actividad de la microglía.

Por último, la metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9) es una enzima presente en el cerebro y expresada por varios tipos de células, incluyendo neuronas, células gliales y leucocitos. La cantidad de MMP-9 en el cerebro es inicialmente baja, pero puede



aumentar de manera significativa en términos de actividad enzimática, cantidad de proteínas y expresión génica en respuesta a diversos estímulos, tales como la actividad sináptica, la inflamación y las lesiones (Reinhard et al., 2015; Vafadari et al., 2016). La diferencia de aumento en la expresión de MMP-9 del grupo aTLR9/LPS respecto al LPS (**Figura 14D**) es consistente a las 24 horas tanto en machos como en hembras. Tradicionalmente se ha asociado el aumento de expresión de MMP-9 a enfermedades neuropsiquiátricas como la depresión (Li et al., 2022); existe una relación entre la ansiedad con un aumento de la expresión en la amígdala tras una administración crónica de LPS (Shishkina et al., 2020); o incluso algunos autores apuntan a su implicación en el daño neuronal (S.-R. Lee et al., 2004) y la destrucción de la barrera hematoencefálica (Yang et al., 2007).

Sin embargo, otros estudios apuntan a que podría estar relacionado con procesos de aprendizaje y memoria, como la remodelación sináptica (Michaluk et al., 2011), *Long-Term Potentiation* (LTP) (Nagy et al., 2006; X. Wang et al., 2008). Además, se ha descrito como la regulación al alza de la expresión de MMP9, después de una lesión, desempeña un papel importante en la regeneración de los nervios periféricos (Lu et al., 2022). En nuestro modelo, este aumento de la expresión podría corresponder con un papel regenerativo tras una primera fase de daño, ya que el grupo de roedores aTLR9 no muestra ningún aumento ni rasgos ansioso-depresivos.

El conjunto de estos datos sugiere que el pretratamiento con ODN 1826 previo a la administración de LPS está potenciando diversos mecanismos que ayudarían a reducir el exceso de inflamación y promover la recuperación tisular. Este efecto es observable tanto en machos como en hembras, por lo que dichos mecanismos serían independientes del sexo.

#### 5.1.4. Los ratones tratados con ODN1826 muestran un aumento de la respuesta antiinflamatoria tras la administración de LPS

La actividad de las citoquinas antiinflamatorias es de vital importancia para contrarrestar los efectos de un exceso de actividad inflamatoria, ya que desempeñan un papel crucial en la regulación y equilibrio del sistema inmunológico, ayudando a prevenir daños tisulares y mantener la homeostasis del organismo. En concreto, se ha demostrado que la producción de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 e IL-11 pueden reducir el daño inducido por el LPS (Sheridan et al., 1999; Sun et al., 2023). En concreto IL-10 es capaz de restaurar, las alteraciones inducidas por LPS, en la plasticidad sináptica (Lenz et al., 2020).

En nuestro modelo se observa un aumento significativo de IL-10 a las 6 y 24h (**Figura 15A**) en los roedores del grupo aTLR9/LPS respecto al grupo LPS. Entre los efectos antiinflamatorios de IL-10, está la supresión del clivaje de IL-1 $\beta$  por la caspasa-1, y su consecuente liberación en forma activa (Gao et al., 2020; Lynch et al., 2004). Por tanto, a pesar que el grupo aTLR9/LPS presenta un aumento en la expresión de IL-1 $\beta$ , se puede hipotetizar, que este aumento podría ayudar a impedir la maduración en su forma activa. Además, este bloqueo en la maduración, podría prevenir a la contribución de IL-1 $\beta$  en el desarrollo del fenotipo depresivo (Lawson et al., 2013; Norman et al., 2010). Además, IL-10 puede producir un viraje de los macrófagos a un fenotipo antiinflamatorio, que ayudaría a la resolución del daño (Deng et al., 2012) y previene la hiperactivación patológica de las microglías tras la administración de LPS (Shemer et al., 2020).

Sin embargo, también se observa un aumento en la expresión de IL-10 en las hembras del grupo LPS 6h respecto al grupo control. Estudios como el de Chanteux, ya puso de manifiesto como el LPS podría inducir la expresión de IL-10 (Chanteux et al., 2007). Este hallazgo no es sorprendente, pero si pone de manifiesto que este mecanismo de defensa no alcanza un umbral para poder revertir los efectos perjudiciales causados por LPS, y sí que lo haría en el grupo aTLR9/LPS.

Esto se puede observar en las correlaciones que se producen en la fase temprana de la estimulación con LPS, donde el grupo los roedores del grupo aTLR9/LPS presentan una fuerte correlación de IL-10 con IL-1  $\beta$ , MCP-1 e IL6 tanto en machos como en hembras (**Figura 16C, Figura 16D**). Mientras que en el grupo tratado con LPS no (**Figura 16A, Figura 16B**). Estas dejan de observarse a las 24h (**Figura 17**). Estos datos refuerzan la hipótesis de como MCP-1 e IL-6 podrían estar mediando una protección en las fases tempranas del daño producido por LPS.

Algo similar, se puede observar con la citoquina IL-11 (**Figura 15B**). Sin embargo, la inducción en la expresión es más relevante a las 6 horas de la administración del LPS, lo que pone de manifiesto su implicación en la respuesta temprana. A las 24h horas, vemos que esta expresión está normalizada respecto al control, incluso reducida en las hembras aTLR9/LPS. Teniendo en cuenta los resultados conductuales, se podría hipotetizar que el papel de esta citoquina es más relevante en las primeras horas tras la administración de LPS. Sin embargo, se necesitan más estudios que puedan revelar el papel de IL-11 en el desarrollo de la depresión inducida por LPS.

Por lo tanto, la estimulación del TLR9 previo a la administración de LPS potencia la expresión de ARN mensajero de IL-10 e IL-11. Específicamente IL-10 es un potente mediador antiinflamatorios (Iyer & Cheng, 2012), cuya citoquina vemos sobreexpresada con el pretratamiento y la posterior adición del LPS. Esto sugiere que la activación de TLR9 podría mediar la actividad de IL-10 para aliviar el daño producido por el LPS en el cerebro, acorde a otros estudios que apuntan hacia la actividad antiinflamatoria del TLR9 (Thomalla et al., 2019).

#### **5.1.5. El LPS afecta de manera diferente a las proteínas que conforman la barrera hematoencefálica en machos y hembras**

Las uniones estrechas, desempeñan un papel crucial en la función y regulación de la barrera hematoencefálica y en la integridad estructural de los tejidos cerebrales.

Las alteraciones en la permeabilidad de estas uniones pueden tener implicación en el desarrollo de procesos neuroinflamatorios (Förster, 2008). Un aumento en la permeabilidad de las uniones estrechas puede permitir la entrada de agentes inflamatorios, toxinas y células del sistema inmune al cerebro, desencadenando respuestas inflamatorias. Estas alteraciones de las uniones estrechas pueden estar mediadas por metaloproteasas de la matriz (Qin et al., 2015), especies reactivas de oxígeno (Kim et al., 2018), disfunción mitocondrial (Doll et al., 2015), entre otros factores (Varatharaj & Galea, 2017). Se ha observado que interleucinas como la IL-6 podrían estar participando en el desarrollo de la disrupción de la barrera hematoencefálica, y que además la IL-10 podría parcialmente revertir estas alteraciones (Barabási et al., 2023). Por tanto, en este estudio, ahondamos en la implicación que el LPS tiene sobre algunas proteínas de las uniones estrechas que conforman la barrera hematoencefálica (ZO-1 y Claudina-5), y como afecta el pretratamiento con un agonista de TLR9.

Algunos autores han demostrado, en modelos in vitro, como el LPS reduce ZO-1 de manera dosis dependiente (Qin et al., 2015; Zou et al., 2022) y Claudina 5 (L. Jin et al., 2013; Qin et al., 2015). En la expresión proteica de ZO-1 (**Figura 18A**) encontramos que las hembras del grupo LPS, 6 horas, tienen una reducción en la expresión proteica de esta proteína, mientras que las tratadas previamente con ODN1826 tienen una expresión normalizada respecto al control, e incluso aumentada en el grupo aTLR9. Curiosamente, vemos que a las 24h desaparece esa significación, pero mostrando una clara tendencia en las hembras LPS. Sin embargo, solamente se aprecia tendencia en los machos.

Este hallazgo en primer lugar pone de manifiesto que a través de la estimulación del TLR9 se puede modular la expresión proteica de ZO-1, pudiendo ser un factor protector. En segundo lugar, sugiere que las hembras podrían ser más susceptible a las alteraciones de ZO-1 que los machos, a igual dosis de LPS; por lo que, podría dar lugar a una mayor entrada de tóxicos, durante la tormenta de citoquinas, que pudieran ejercer un mayor efecto en las hembras. Por lo tanto, esta observación podría indicar el porqué se observa una mayor afectación en el fenotipo ansioso en las hembras del grupo LPS.

Por otro lado, en la expresión proteica de claudina 5 (**Figura 18B**) encontramos un dato sorprendente, y es que los machos tratados con LPS tienen una reducción de dicha proteína a las 24h. No se observan estas alteraciones en las hembras, esto puede ser debido a que la producción de claudin-5 responde a los estrógenos, con lo que estos resultados indican una posible protección dependiente del sexo (Burek et al., 2010). Por lo tanto, con el conjunto de los datos, las alteraciones observadas en claudina 5 en el hipocampo, por sí solas, no podrían explicar el desarrollo del fenotipo ansioso-depresivo ni la protección conferida por el pretratamiento con el agonista TLR9.

En definitiva, vemos que en gran medida, las afectaciones inducidas por el LPS en las proteínas que forman las uniones estrechas son dependientes del sexo, y puede dar pista de su implicación en el desarrollo de las enfermedades mentales (Dion-Albert et al., 2022; Weber & Clyne, 2021). Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos datos se han obtenido de tejido de hipocampo, y que quizá, se podría ver un efecto más evidente, en la protección conferida por el ODN 1826, en otras regiones cerebrales u otros modelos más específicos.

#### 5.1.6. **La administración de ODN 1826 reduce el complejo mitocondrial I ante un insulto con LPS**

Como se ha comentado antes, disfunciones en la mitocondria podrían ser un factor que altera las proteínas de las uniones estrechas. Además, se ha descrito que las alteraciones mitocondriales son un factor determinante en el desarrollo de enfermedades neuropsiquiátricas (Morris & Berk, 2015; Olkhova et al., 2023; Pei & Wallace, 2018). En este contexto, se ha visto como la administración de LPS contribuye a la disrupción de las proteínas que conforman la cadena de transporte de electrones (Doll et al., 2015). En nuestro modelo, observamos alteraciones en todos los complejos y en todos los grupos tratados tanto con LPS como con ODN 1826, en algunos podrían depender del sexo (**Figura 19**). Esto resalta el dimorfismo sexual en las alteraciones metabólicas y enfatiza la importancia de investigar en este campo para diseñar estrategias específicas que puedan influir en el desarrollo de diversas patologías (Ventura-Clapier et al., 2017).

La fosforilación oxidativa, un proceso fundamental en la producción de energía celular, involucra una serie de proteínas altamente especializadas en las mitocondrias. En el centro de este proceso se encuentran las enzimas que conforman la cadena de transporte de electrones, incluyendo el complejo I (NADH deshidrogenasa), el complejo II (succinato deshidrogenasa), el complejo III (citocromo c reductasa), y el complejo IV (citocromo c oxidasa). Estos complejos operan de manera cooperativa para transferir electrones a lo largo de la cadena, lo que resulta en el transporte de protones a través de la membrana mitocondrial interna. El complejo V (ATP sintasa), aprovecha este gradiente de protones generado para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Deshpande & Mohiuddin, 2023). Además de generar ATP, las mitocondrias producen especies reactivas de oxígeno (ROS), que actúan como moléculas señalizadoras en niveles bajos, pero pueden volverse tóxicas en niveles elevados.

Curiosamente, se observa una reducción común en el complejo mitocondrial I, a las 24 horas, en el grupo  $\alpha$ TLR9/LPS (**Figura 19A**). Es conocido que el complejo mitocondrial I es uno de los principales productores de especies reactivas de oxígeno, asociado a liberación de citocromo c al citoplasma, llevando a la apoptosis celular (Garrido et al., 2006; Hernansanz-Agustín & Enríquez, 2021; Kushnareva et al., 2002). En la literatura, se ha descrito como la reducción del complejo mitocondrial I está asociado a enfermedades neurodegenerativas, así como el envejecimiento (Pollard et al., 2016). Por otro lado, en enfermedades psiquiátricas se ha visto esta reducción de la actividad mitocondrial del complejo I. Además, se ha asociado el uso de la medicación antipsicótica con una mayor reducción de la actividad del complejo mitocondrial I (Rollins et al., 2018). Por tanto, en la literatura, este descenso está implicado en procesos que cursan con neuroinflamación y enfermedades mentales.

Algunos principios activos, como la metformina, han demostrado tener actividad inhibidora del complejo mitocondrial I (Fontaine, 2018; Luengo et al., 2014; Wheaton et al., 2014). Cabe destacar que la metformina ha demostrado tener un efecto antidepresivo en modelos de neuroinflamación causada por LPS (J. Chen et al., 2020).

Curiosamente, un estudio halló que los pacientes con depresión mayor, que respondían a la terapia antidepresiva, tenían una reducción en la actividad del complejo I en las células mononucleares de la sangre periférica (Fernström et al., 2021).

Por tanto, la preestimulación con ODN 1826 previo a la administración de LPS podría estimular mecanismos protectores a través de la reducción del complejo mitocondrial I. Reduciendo la producción de especies reactivas de oxígeno, y cambiando la proporción NADH/NAD<sup>+</sup> y por tanto a un cambio en el estado redox y la producción de ATP. Dónde Shintani describió cómo las alteraciones en la síntesis de ATP mediante el uso de CpG ODN pueden proteger a las células no inmunes del estrés (Selles et al., 2017; Shintani et al., 2014) Adicionalmente, la reducción del Complejo I es análogo al que mostró Ito en neuronas IPS de pacientes, dónde con la administración de ketamina disminuía la actividad del complejo I de manera dosis dependiente (H. Ito et al., 2015), por lo que se deduce que, este hecho, tendría un efecto beneficioso en nuestro modelo modificando el estado redox y la producción de ATP.

Por lo tanto, esta tesis, pone de manifiesto este mecanismo protector mitocondrial, común en machos y hembras, y sugiere una posible diana terapéutica para tratar de manera aguda procesos neuroinflamatorios.

#### **5.1.7. La estimulación del receptor tipo Toll 9 reduce la producción de estrés oxidativo**

Para demostrar que la reducción del complejo mitocondrial I está relacionada con un mecanismo de protección, se midió los aductos de malonaldehído (MDA) en el hipocampo. El MDA es un metabolito generado como consecuencia de la peroxidación lipídica, y constituye un biomarcador de estrés oxidativo. Su incremento ha sido constatado en diversas enfermedades neuropsiquiátricas (Greilberger et al., 2008; Kuloglu et al., 2003; Mohammadi et al., 2021).

En machos, a las 6 y 24, se observa cómo se genera más estrés oxidativo en el grupo LPS, pero este está normalizado respecto al control en el grupo aTLR9/LPS, y reducido en los roedores del grupo aTLR9 (**Figura 20**). Por tanto, en los machos se puede decir que el pretratamiento evita y reduce *per se* la generación de estrés oxidativo en el hipocampo.

Sin embargo, este efecto no se puede apreciar en las hembras. Lo cual concuerda con los hallazgos de Mello, que vio como había una influencia de sexo en la generación de MDA inducido por LPS; mientras que los machos producían más MDA en el hipocampo, las hembras lo hacían en el hipotálamo, no encontrando aumento en la corteza prefrontal (Mello et al., 2018). En la misma línea, Ehsanifar encontró que las hembras no presentaban un aumento de MDA en el hipocampo después de la exposición a nanopartículas de diésel, mientras que los machos sí que lo experimentaban (Ehsanifar et al., 2021).

A pesar del dimorfismo sexual, la reducción de los aductos de MDA detectados iría parejo con los hallazgos obtenidos en la reducción del complejo mitocondrial I, en machos y en hembras. Por tanto, estos datos sugieren que al activar el TLR9 se podría estar potenciando mecanismos reparadores mitocondriales que prevendrían el daño mitocondrial y estrés oxidativo, y que posiblemente este mediado por el complejo mitocondrial I.

#### **5.1.8. Interpretación Integral de Patrones de Grupo a Través de Visualización Multidimensional**

Los algoritmos de reducción dimensional, como la técnica no lineal *Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction* (UMAP), ayuda a identificar patrones complejos y relaciones no lineales entre los datos. Esta técnica puede revelar agrupaciones y relaciones que podrían no ser evidentes en una representación más simple.



Al reducir los datos de la expresión de genes y proteínas, se observa cómo se generan 3 grandes clústeres, mediante la posterior aplicación del algoritmo k-medias (**Figura 21**). Dentro de estos grandes grupos podemos destacar la segregación de los ratones tratados con LPS, tanto a las 6 horas como a las 24h, así como el grupo de controles y los animales tratados con ODN 1826. Mientras que en el tercer grupo no podemos observar diferencias entre tratamiento o sexo. Los grupos de 6 y 24 horas muestran una clara segregación entre machos y hembras, y grupo LPS y aTLR9/LPS.

De este modo, se derivan dos observaciones clave: en primer lugar, a pesar de compartir medias grupales similares, los machos y las hembras muestran perfiles diferentes ante un estímulo inflamatorio (Klein & Flanagan, 2016; Martínez de Toda et al., 2023; Sabeih et al., 2021); en segundo lugar, la administración previa de ODN 1826 da lugar a una agrupación en subclústeres de los roedores tratados con LPS, aunque no surte ningún efecto en los animales tratados con vehículo. Adicionalmente, estas observaciones irían en una línea similar a lo observado en la conducta, donde el pretratamiento con ODN 1826 bloquea los efectos conductuales del LPS.

En termino generales, los machos y las hembras tienen unos patrones de expresión similares dentro de cada grupo, pero con notables diferencias. Esto, es especialmente visible en los gráficos de radar (**Figura 21**), donde, además, se observa de manera gráfica las diferencias entre los tratamientos. Cabe resaltar, las alteraciones que se producen en el eje de los complejos mitocondriales a las 6 horas en los grupos con LPS. Existiendo un aumento en el eje de IL-10 a MCP-1 en los roedores aTLR9/LPS, que se relacionaría con la actividad reparadora.

Esto, iría en la línea de los factores que contribuyen a la varianza. Al observar los coeficientes de ponderación de un análisis de componentes principales (**Tabla 6**). Donde los factores MCP-1 e IL-10 serían las principales variables que contribuirían de manera positiva, y el eje de los complejos mitocondriales de manera negativa, en la primera dimensión; Es interesante, como en la segunda dimensión un factor positivo como el

MMP-9 tendría un gran peso, mientras que de manera negativa se apuntaría al MDA y el complejo I. Reforzando nuestra hipótesis que estas piezas son clave en la prevención del desarrollo del fenotipo depresivo.

El resultado gráfico de las primeras 3 dimensiones con más peso (**Figura 23**), muestra de manera similar, al método UMAP, la separación entre grupo. El algoritmo UMAP es superior en la segregación de los datos, mejorando la visualización e identificación de los clústeres (McInnes et al., 2020; Yang et al., 2021). Sin embargo, no es posible obtener el peso de cada variable como ocurre con el PCA. La combinación de estas técnicas resalta los principales factores que, como se ha mencionado, resultarían determinantes en la explicación del efecto antidepresivo observado durante la conducta, considerando los datos de los que disponemos.

Por lo tanto, La protección otorgada por la estimulación del TLR9 en un modelo de depresión inducida por una neuroinflamación podría ser debida:

- A un aumento de la respuesta antiinflamatoria y de reparación del daño, especialmente importante en la primera fase del modelo
- A una reducción del estrés oxidativo causado por alteraciones mitocondriales.

## **5.2. SEGUNDA PARTE**

Para profundizar en la hipótesis que la estimulación del TLR9 tiene previo a la administración de LPS puede tener un efecto protector sobre la mitocondria, y por tanto sobre las neuronas de hipocampus, se llevaron a cabo una serie de experimentos utilizando modelos in vitro. Estos experimentos involucraron tanto líneas celulares como cultivos primarios obtenidos del hipocampo de ratones. Los principales resultados se detallan a continuación.

### 5.2.1. La estimulación del receptor tipo Toll 9 bloquea la producción de especies reactivas de oxígeno

Investigaciones anteriores han evidenciado el deterioro, del sistema nervioso central, debido al estrés oxidativo inducido por el LPS (Del Angel-Meza et al., 2011; Ho et al., 2015). El estrés oxidativo, podría ocasionar daño y muerte neuronal, siendo especialmente relevante durante el envejecimiento o en las enfermedades neurodegenerativas (X. Wang & Michaelis, 2010). En este sentido, es relevante destacar que la generación de especies reactivas de oxígeno, ha sido objeto de investigación en relación con una amplia gama de afecciones emocionales. Estos compuestos altamente reactivos pueden desempeñar un papel crítico en la neuroquímica cerebral y se han vinculado con condiciones que van desde la ansiedad y la depresión hasta la esquizofrenia o trastorno bipolar (Bouayed et al., 2009; Salim, 2014).

Los resultados de este estudio, muestran como la estimulación del TLR9 protege de la generación de especies reactivas de oxígeno inducido por LPS, en células SH-SY5Y diferenciadas a tipo neuronal (**Figura 24**). Por lo tanto, este hallazgo se alinea con la disminución del estrés oxidativo observado en el modelo animal. La disminución del estrés oxidativo, que guarda relación con trastornos neuropsiquiátricos (Gawryluk et al., 2011), podría ser responsable, en parte, de la reducción en los síntomas de ansiedad y depresión (Ji et al., 2023). Adicionalmente a este estudio, la activación de NF $\kappa$ B, como se ha observado en células de sarcoma, produciría una disminución de las especies reactivas de oxígeno inducido por TNF- $\alpha$  (Djavaheri-Mergny et al., 2004). La activación de NF $\kappa$ B en neuronas de hipocampo, puede proteger a las neuronas del estrés oxidativo y la apoptosis (Mattson et al., 1997). En consecuencia, estos hallazgos ofrecen una posible explicación de por qué los roedores del grupo  $\alpha$ TLR9/LPS no muestran el fenotipo inducido por el LPS, a pesar de tener una expresión aumentada de TNF- $\alpha$ .

### 5.2.2. La activación del TLR9 induce mecanismos mitoprotectores en las neuronas

La disfunción mitocondrial podría desempeñar un papel clave en el desarrollo de estados depresivos (Allen et al., 2018; Bansal & Kuhad, 2016) y otras enfermedades neuropsiquiátricas (Angelova & Abramov, 2018). Una de las causas de la generación de especies reactivas de oxígeno es el hinchamiento mitocondrial (Peng & Jou, 2004). Este hinchamiento de las mitocondrias conlleva un aumento en la permeabilidad de la membrana, lo que provoca la liberación de mediadores proapoptóticos al citosol, como el citocromo c, y conduce a la muerte celular (Petronilli et al., 2001).

Uno de los principales desafíos de las técnicas de microscopía confocal para analizar la morfología mitocondrial neuronal es el alto número de mitocondrias por célula, así como la necesidad de llevar a cabo una clasificación manual. Recientemente Fogo y colaboradores demostraron como se podría eliminar esa limitación mediante técnicas de aprendizaje automático (Fogo et al., 2021). Para ello, anotaron manualmente, y entrenaron de manera supervisada el algoritmo *Random Forest* para clasificar nuevas mitocondrias. Siguiendo una aproximación similar, procedimos a modelizar en 3D las imágenes obtenidas por microscopía confocal (**Figura 25B**), seguido de una reducción dimensional de los datos morfológicos y clasificación no supervisada mediante el algoritmo K-medias (**Figura 25A**). Posteriormente, inspeccionamos de manera visual los centrómeros de cada clúster, donde observamos las morfologías propuestas por Fogo (**Figura 25C**). Mediante esta metodología hemos sido capaces de clasificar miles de mitocondrias de manera no supervisada, evitando cualquier tipo de sesgo, y con un alto número de células por experimento.

El principal hallazgo es que la administración del agonista reduce la proporción del tipo morfológico del tipo hinchado en el grupo aTLR9. adicionalmente, evita el hinchamiento y por tanto el daño mitocondrial y la generación de ROS (Kalogeris et al., 2014) causada por la administración del LPS, en el grupo aTLR9/LPS.

Por otro lado, se puede observar una marcada disminución en la presencia de mitocondrias de tipo punteado mediante la acción del agonista TLR9. Algunos estudios han insinuado una posible relación de este tipo específico de mitocondrias con patologías como el trastorno bipolar (Cataldo et al., 2010). En nuestro modelo, no se aprecian alteraciones en el grupo LPS en lo que respecta a los otros tipos morfológicos. Por lo tanto, la reducción en la cantidad de mitocondrias punteadas, acompañada del aumento en las no ramificadas, por parte del grupo TLR9 podría indicar la inducción de un cambio en la actividad de la fosforilación oxidativa (Mishra & Chan, 2016). Tal como sugiere los cambios en la expresión de los complejos mitocondriales en el modelo animal. Sin embargo, hace faltan más estudios orientados a esclarecer nuestros hallazgos. Los cuales, deberían de utilizar criterios de clasificación similares para establecer una relación causal directa entre el metabolismo y la morfología mitocondrial.

Por tanto, mediante esta novedosa metodología podemos observar que el pretratamiento con ODN 1826, previo a la administración de LPS, protege a las mitocondrias neuronales de su hinchamiento y la subsecuente posible pérdida de funcionalidad. Lo cual, podría explicar la reducción del estrés oxidativo tanto en el modelo animal como en el modelo in vitro.

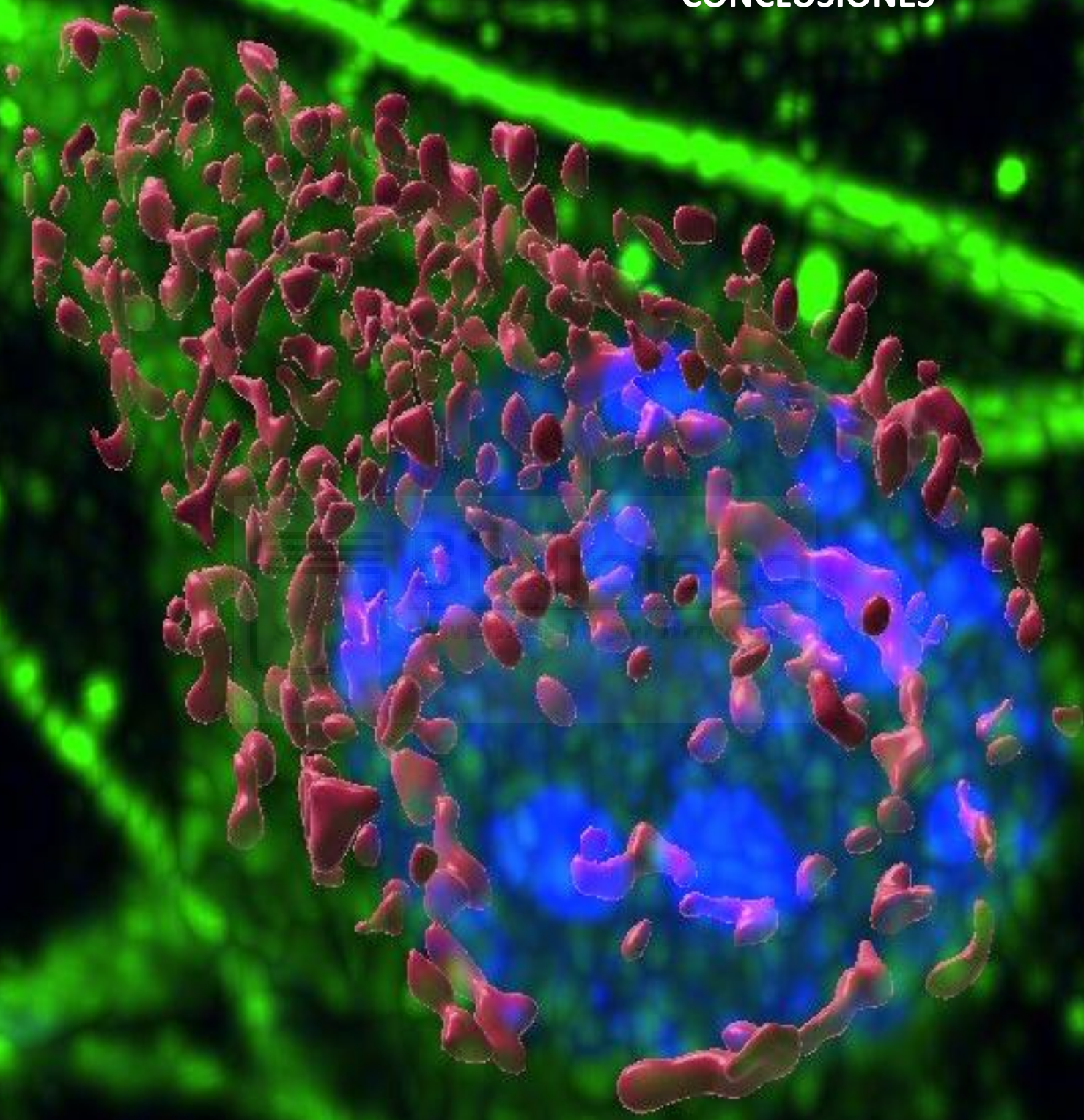
### 5.2.3. La administración de ODN 1826 protege del daño neuronal

Para evaluar la posible capacidad que el efecto sobre la morfología tuviese algún tipo de impacto sobre la salud neuronal. Se procedió a medir la longitud media de las neuritas por neurona (**Figura 26A**). Aquí se observa como el daño inducido por el LPS en las neuronas hipocampales (Zeng et al., 2021) es suprimido cuando se trata previamente con ODN 1826 (**Figura 26B**). Por otro lado, vemos como el grupo aTLR9 tiene aumentado la longitud de la neurita, por lo que los podría tener un papel beneficioso en las funciones cognitivas.

Por tanto, el tratamiento previo previene el daño inducido por LPS sobre las neuronas, por lo que se sugiere que el ODN 1826 podría tener un efecto neuroprotector.



## CONCLUSIONES



1. El tratamiento con ODN 1826 previo a la administración de lipopolisacárido bacteriano proporciona protección frente al desarrollo de los rasgos ansioso-depresivos característicos de este modelo.
2. El pretratamiento promueve la reparación del daño causada por el LPS, caracterizado por una estimulación de las vías antiinflamatorias.
3. El pretratamiento promueve cambios morfológicos y metabólicos mitocondriales que protegen de la generación de especies reactivas de oxígeno y del estrés oxidativo.
4. La modulación del TLR9 se podría postular como una nueva diana terapéutica para tratar la depresión, especialmente la asociada a procesos inflamatorios.





## REFERENCIAS

- Allen, J., Romay-Tallon, R., Brymer, K. J., Caruncho, H. J., & Kalynchuk, L. E. (2018). Mitochondria and Mood: Mitochondrial Dysfunction as a Key Player in the Manifestation of Depression. *Frontiers in Neuroscience*, *12*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2018.00386>
- Almutabagani, L. F., Almanqour, R. A., Alsabhan, J. F., Alhossan, A. M., Alamin, M. A., Alrajeh, H. M., Alonazi, A. S., El-Malky, A. M., & Alrasheed, N. M. (2023). Inflammation and Treatment-Resistant Depression from Clinical to Animal Study: A Possible Link? *Neurology International*, *15*(1), 100-120. <https://doi.org/10.3390/neurolint15010009>
- Anderson, K. V., Jürgens, G., & Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: Genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*, *42*(3), 779-789. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90274-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90274-0)
- Angelova, P. R., & Abramov, A. Y. (2018). Role of mitochondrial ROS in the brain: From physiology to neurodegeneration. *FEBS Letters*, *592*(5), 692-702. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12964>
- Bansal, Y., & Kuhad, A. (2016). Mitochondrial Dysfunction in Depression. *Current Neuropharmacology*, *14*(6), 610-618. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666160229114755>
- Barabási, B., Barna, L., Santa-Maria, A. R., Harazin, A., Molnár, R., Kincses, A., Vigh, J. P., Dukay, B., Sántha, M., Tóth, M. E., Walter, F. R., Deli, M. A., & Hoyk, Z. (2023). Role of interleukin-6 and interleukin-10 in morphological and functional changes of the blood–brain barrier in hypertriglyceridemia. *Fluids and Barriers of the CNS*, *20*(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12987-023-00418-3>
- Barak, B., Feldman, N., & Okun, E. (2014). Toll-like receptors as developmental tools that regulate neurogenesis during development: An update. *Frontiers in Neuroscience*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00272>
- Bauer, M. E., & Teixeira, A. L. (2019). Inflammation in psychiatric disorders: What comes first? *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1437*(1), 57-67. <https://doi.org/10.1111/nyas.13712>
- Bauer, M., Severus, E., Köhler, S., Whybrow, P. C., Angst, J., & Möller, H.-J. (2015). World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for Biological Treatment of Unipolar Depressive Disorders. Part 2: Maintenance Treatment of Major Depressive Disorder-Update 2015. *The World Journal of Biological Psychiatry*, *16*(2), 76-95. <https://doi.org/10.3109/15622975.2014.1001786>
- Benbenishty, A., Gadrich, M., Cottarelli, A., Lubart, A., Kain, D., Amer, M., Shaashua, L., Glasner, A., Erez, N., Agalliu, D., Mayo, L., Ben-Eliyahu, S., & Blinder, P. (2019). Prophylactic TLR9 stimulation reduces brain metastasis through microglia activation. *PLoS Biology*, *17*(3), e2006859. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006859>
- Boku, S., Nakagawa, S., Toda, H., & Hishimoto, A. (2018). Neural basis of major depressive disorder: Beyond monoamine hypothesis. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, *72*(1), 3-12. <https://doi.org/10.1111/pcn.12604>
- Bouayed, J., Rammal, H., & Soulimani, R. (2009). Oxidative stress and anxiety: Relationship and cellular pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2*(2), 63. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.2.7944>

- Braune, J., Weyer, U., Hobusch, C., Mauer, J., Brüning, J. C., Bechmann, I., & Gericke, M. (2017). IL-6 Regulates M2 Polarization and Local Proliferation of Adipose Tissue Macrophages in Obesity. *The Journal of Immunology*, *198*(7), 2927-2934. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600476>
- Burek, M., Arias-Loza, P. A., Roewer, N., & Förster, C. Y. (2010). Claudin-5 as a novel estrogen target in vascular endothelium. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *30*(2), 298-304. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.197582>
- Cao, P., Chen, C., Liu, A., Shan, Q., Zhu, X., Jia, C., Peng, X., Zhang, M., Farzinpour, Z., Zhou, W., Wang, H., Zhou, J.-N., Song, X., Wang, L., Tao, W., Zheng, C., Zhang, Y., Ding, Y.-Q., Jin, Y., ... Zhang, Z. (2021). Early-life inflammation promotes depressive symptoms in adolescence via microglial engulfment of dendritic spines. *Neuron*, *109*(16), 2573-2589.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.012>
- Capuzzi, E., Caldiroli, A., Capellazzi, M., Tagliabue, I., Marcatili, M., Colmegna, F., Clerici, M., Buoli, M., & Dakanalis, A. (2021). Long-Term Efficacy of Intranasal Esketamine in Treatment-Resistant Major Depression: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(17), 9338. <https://doi.org/10.3390/ijms22179338>
- Casella, G., Garzetti, L., Gatta, A. T., Finardi, A., Maiorino, C., Ruffini, F., Martino, G., Muzio, L., & Furlan, R. (2016). IL4 induces IL6-producing M2 macrophages associated to inhibition of neuroinflammation in vitro and in vivo. *Journal of Neuroinflammation*, *13*(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0596-5>
- Cataldo, A. M., McPhie, D. L., Lange, N. T., Punzell, S., Elmiligy, S., Ye, N. Z., Froimowitz, M. P., Hassinger, L. C., Menesale, E. B., Sargent, L. W., Logan, D. J., Carpenter, A. E., & Cohen, B. M. (2010). Abnormalities in Mitochondrial Structure in Cells from Patients with Bipolar Disorder. *The American Journal of Pathology*, *177*(2), 575-585. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.081068>
- Celik, M. Ö., Labuz, D., Keye, J., Glauben, R., & Machelska, H. (s. f.). IL-4 induces M2 macrophages to produce sustained analgesia via opioids. *JCI Insight*, *5*(4), e133093. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.133093>
- Chanteux, H., Guisset, A. C., Pilette, C., & Sibille, Y. (2007). LPS induces IL-10 production by human alveolar macrophages via MAPKinases- and Sp1-dependent mechanisms. *Respiratory Research*, *8*(1), 71. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-8-71>
- Chen, G. Y., & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*, *10*(12), 826-837. <https://doi.org/10.1038/nri2873>
- Chen, J., Zhou, T., Guo, A.-M., Chen, W.-B., Lin, D., Liu, Z.-Y., & Fei, E.-K. (2020). Metformin Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behaviors and Abnormal Glutamatergic Transmission. *Biology*, *9*(11), 359. <https://doi.org/10.3390/biology9110359>
- Chen, M. C., Hamilton, J. P., & Gotlib, I. H. (2010). Decreased Hippocampal Volume in Healthy Girls at Risk of Depression. *Archives of General Psychiatry*, *67*(3), 270-276. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.202>
- Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J., & Gusovsky, F. (1999). Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction\*. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(16), 10689-10692. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.16.10689>

Colasanto, M., Madigan, S., & Korczak, D. J. (2020). Depression and inflammation among children and adolescents: A meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 277, 940-948. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.09.025>

Crawley, J., & Goodwin, F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 13(2), 167-170. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90067-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90067-2)

Cryan, J. F., Mombereau, C., & Vassout, A. (2005). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 571-625. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.009>

Cuijpers, P., Stringaris, A., & Wolpert, M. (2020). Treatment outcomes for depression: Challenges and opportunities. *The Lancet Psychiatry*, 7(11), 925-927. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(20\)30036-5](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(20)30036-5)

Dalod, M. (2007). Studies of SARM1 Uncover Similarities Between Immune and Neuronal Responses to Danger. *Science's STKE*, 2007(417), pe73-pe73. <https://doi.org/10.1126/stke.4172007pe73>

Daly, E. J., Trivedi, M. H., Janik, A., Li, H., Zhang, Y., Li, X., Lane, R., Lim, P., Duca, A. R., Hough, D., Thase, M. E., Zajecka, J., Winokur, A., Divacka, I., Fagiolini, A., Cubała, W. J., Bitter, I., Blier, P., Shelton, R. C., ... Singh, J. B. (2019). Efficacy of Esketamine Nasal Spray Plus Oral Antidepressant Treatment for Relapse Prevention in Patients With Treatment-Resistant Depression: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry*, 76(9), 893-903. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2019.1189>

De Berardis, D., Campanella, D., Gambi, F., La Rovere, R., Carano, A., Conti, C. M., Sivestrini, C., Serroni, N., Piersanti, D., Di Giuseppe, B., Moschetta, F. S., Cotellessa, C., Fulcheri, M., Salerno, R. M., & Ferro, F. M. (2006). The role of C-reactive protein in mood disorders. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 19(4), 721-725. <https://doi.org/10.1177/039463200601900402>

Del Angel-Meza, A. R., Dávalos-Marín, A. J., Ontiveros-Martinez, L. L., Ortiz, G. G., Beas-Zarate, C., Chaparro-Huerta, V., Torres-Mendoza, B. M., & Bitzer-Quintero, O. K. (2011). Protective effects of tryptophan on neuro-inflammation in rats after administering lipopolysaccharide. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 65(3), 215-219. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2011.02.008>

Deshpande, O. A., & Mohiuddin, S. S. (2023). Biochemistry, Oxidative Phosphorylation. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553192/>

Dion-Albert, L., Bandeira Binder, L., Daigle, B., Hong-Minh, A., Lebel, M., & Menard, C. (2022). Sex differences in the blood-brain barrier: Implications for mental health. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 65, 100989. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2022.100989>

Djavaheri-Mergny, M., Javelaud, D., Wietzerbin, J., & Besançon, F. (2004). NF- $\kappa$ B activation prevents apoptotic oxidative stress via an increase of both thioredoxin and MnSOD levels in TNF $\alpha$ -treated Ewing sarcoma cells. *FEBS Letters*, 578(1-2), 111-115. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.082>

- Dockman, R. L., Carpenter, J. M., Diaz, A. N., Benbow, R. A., & Filipov, N. M. (2022). Sex differences in behavior, response to LPS, and glucose homeostasis in middle-aged mice. *Behavioural Brain Research*, *418*, 113628. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113628>
- Doll, D. N., Hu, H., Sun, J., Lewis, S. E., Simpkins, J. W., & Ren, X. (2015). Mitochondrial Crisis in Cerebrovascular Endothelial Cells Opens the Blood–Brain Barrier. *Stroke*, *46*(6), 1681-1689. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.009099>
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., & Lanctôt, K. L. (2010). A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. *Biological Psychiatry*, *67*(5), 446-457. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.033>
- Driessen, E., & Hollon, S. D. (2010). Cognitive Behavioral Therapy for Mood Disorders: Efficacy, Moderators and Mediators. *Psychiatric Clinics of North America*, *33*(3), 537-555. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2010.04.005>
- Ehsanifar, M., Montazeri, Z., Taheri, M. A., Rafati, M., Behjati, M., & Karimian, M. (2021). Hippocampal inflammation and oxidative stress following exposure to diesel exhaust nanoparticles in male and female mice. *Neurochemistry International*, *145*, 104989. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.104989>
- Enache, D., Pariante, C. M., & Mondelli, V. (2019). Markers of central inflammation in major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis of studies examining cerebrospinal fluid, positron emission tomography and post-mortem brain tissue. *Brain, Behavior, and Immunity*, *81*, 24-40. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.06.015>
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., Gallego, C., & Comella, J. X. (2000). Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells. *Journal of Neurochemistry*, *75*(3), 991-1003. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750991.x>
- Erickson, E. K., Grantham, E. K., Warden, A. S., & Harris, R. A. (2019). Neuroimmune signaling in alcohol use disorder. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *177*, 34-60. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.12.007>
- Erickson, M. A., & Banks, W. A. (2011). Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: Multiplex quantification with path analysis. *Brain, Behavior, and Immunity*, *25*(8), 1637-1648. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.06.006>
- Fanselow, M. S. (2000). Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behavioural Brain Research*, *110*(1), 73-81. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00186-2)
- Femenia, T., Qian, Y., Arentsen, T., Forssberg, H., & Diaz Heijtz, R. (2018). Toll-like receptor-4 regulates anxiety-like behavior and DARPP-32 phosphorylation. *Brain, Behavior, and Immunity*, *69*, 273-282. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.022>
- Fernström, J., Mellon, S. H., McGill, M. A., Picard, M., Reus, V. I., Hough, C. M., Lin, J., Epel, E. S., Wolkowitz, O. M., & Lindqvist, D. (2021). Blood-based mitochondrial respiratory chain function in major depression. *Translational Psychiatry*, *11*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01723-x>

- Figley, M. D., Gu, W., Nanson, J. D., Shi, Y., Sasaki, Y., Cunnea, K., Malde, A. K., Jia, X., Luo, Z., Saikot, F. K., Mosaiab, T., Masic, V., Holt, S., Hartley-Tassell, L., McGuinness, H. Y., Manik, M. K., Bosanac, T., Landsberg, M. J., Kerry, P. S., ... Ve, T. (2021). SARM1 is a Metabolic Sensor Activated by an Increased NMN/NAD<sup>+</sup> Ratio to Trigger Axon Degeneration. *Neuron*, *109*(7), 1118-1136.e11. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.02.009>
- Figueroa-Hall, L. K., Paulus, M. P., & Savitz, J. (2020). Toll-Like Receptor Signaling in Depression. *Psychoneuroendocrinology*, *121*, 104843. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104843>
- Florez, J., Armijo, J. A., & Mediavilla, Á. (2013). *Farmacología humana (6a. Ed.)*. Elsevier Health Sciences Spain - T.
- Flügel, A., Hager, G., Horvat, A., Spitzer, C., Singer, G. M. A., Graeber, M. B., Kreutzberg, G. W., & Schwaiger, F.-W. (2001). Neuronal MCP-1 Expression in Response to Remote Nerve Injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *21*(1), 69-76. <https://doi.org/10.1097/00004647-200101000-00009>
- Fogo, G. M., Anzell, A. R., Maheras, K. J., Raghunayakula, S., Wider, J. M., Emaus, K. J., Bryson, T. D., Bukowski, M. J., Neumar, R. W., Przyklenk, K., & Sanderson, T. H. (2021). Machine learning-based classification of mitochondrial morphology in primary neurons and brain. *Scientific Reports*, *11*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84528-8>
- Fontaine, E. (2018). Metformin-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Facts, Uncertainties, and Consequences. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 753. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00753>
- Förster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochemistry and Cell Biology*, *130*(1), 55-70. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0424-9>
- Franklin, T. C., Xu, C., & Duman, R. S. (2018). Depression and sterile inflammation: Essential role of danger associated molecular patterns. *Brain, Behavior, and Immunity*, *72*, 2-13. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.025>
- Frenois, F., Moreau, M., O'Connor, J., Lawson, M., Micon, C., Lestage, J., Kelley, K. W., Dantzer, R., & Castanon, N. (2007). Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology*, *32*(5), 516-531. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.03.005>
- Gao, Y., Tu, D., Yang, R., Chu, C.-H., Hong, J.-S., & Gao, H.-M. (2020). Through Reducing ROS Production, IL-10 Suppresses Caspase-1-Dependent IL-1 $\beta$  Maturation, thereby Preventing Chronic Neuroinflammation and Neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(2), 465. <https://doi.org/10.3390/ijms21020465>
- Gárate, I., García-Bueno, B., Madrigal, J. L., Bravo, L., Berrocoso, E., Caso, J. R., Micó, J. A., & Leza, J. C. (2011). Origin and consequences of brain Toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. *Journal of Neuroinflammation*, *8*(1), 151. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-151>
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, *13*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401950>

Gawryluk, J. W., Wang, J.-F., Andrezza, A. C., Shao, L., & Young, L. T. (2011). Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *14*(1), 123-130. <https://doi.org/10.1017/S1461145710000805>

Gazzaniga, M. S. (2004). *The Cognitive Neurosciences*. MIT Press.

Ge, L., Liu, L., Liu, H., Liu, S., Xue, H., Wang, X., Yuan, L., Wang, Z., & Liu, D. (2015). Resveratrol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior, neuroinflammatory response, and CREB/BDNF signaling in mice. *European Journal of Pharmacology*, *768*, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.10.026>

Gibney, S. M., McGuinness, B., Prendergast, C., Harkin, A., & Connor, T. J. (2013). Poly I:C-induced activation of the immune response is accompanied by depression and anxiety-like behaviours, kynurenine pathway activation and reduced BDNF expression. *Brain, Behavior, and Immunity*, *28*, 170-181. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.11.010>

GOLDBERG, D. (2011). The heterogeneity of "major depression". *World Psychiatry*, *10*(3), 226-228.

Gorina, R., Font-Nieves, M., Márquez-Kisinousky, L., Santalucia, T., & Planas, A. M. (2011). Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NF $\kappa$ B signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia*, *59*(2), 242-255. <https://doi.org/10.1002/glia.21094>

Greilberger, J., Koidl, C., Greilberger, M., Lamprecht, M., Schroecksadel, K., Leblhuber, F., Fuchs, D., & Oettl, K. (2008). Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Free Radical Research*, *42*(7), 633-638. <https://doi.org/10.1080/10715760802255764>

Gultepe, E., & Makrehchi, M. (2018). Improving clustering performance using independent component analysis and unsupervised feature learning. *Human-Centric Computing and Information Sciences*, *8*(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13673-018-0148-3>

Haapakoski, R., Mathieu, J., Ebmeier, K. P., Alenius, H., & Kivimäki, M. (2015). Cumulative meta-analysis of interleukins 6 and 1 $\beta$ , tumour necrosis factor  $\alpha$  and C-reactive protein in patients with major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, *49*, 206-215. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.06.001>

Haroon, E., Daguanno, A. W., Woolwine, B. J., Goldsmith, D. R., Baer, W. M., Wommack, E. C., Felger, J. C., & Miller, A. H. (2018). Antidepressant treatment resistance is associated with increased inflammatory markers in patients with major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology*, *95*, 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.05.026>

Hernansanz-Agustín, P., & Enríquez, J. A. (2021). Generation of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. *Antioxidants*, *10*(3), 415. <https://doi.org/10.3390/antiox10030415>

Ho, Y.-H., Lin, Y.-T., Wu, C.-W. J., Chao, Y.-M., Chang, A. Y. W., & Chan, J. Y. H. (2015). Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. *Journal of Biomedical Science*, *22*(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0157-8>

- Hosaka, K., Rojas, K., Fazal, H. Z., Schneider, M. B., Shores, J., Federico, V., McCord, M., Lin, L., & Hoh, B. (2017). Monocyte Chemotactic Protein-1-Interleukin-6-Osteopontin Pathway of Intra-Aneurysmal Tissue Healing. *Stroke*, *48*(4), 1052-1060. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.015590>
- Howren, M. B., Lamkin, D. M., & Suls, J. (2009). Associations of Depression With C-Reactive Protein, IL-1, and IL-6: A Meta-Analysis. *Psychosomatic Medicine*, *71*(2), 171. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3181907c1b>
- Hozumi, Y., Wang, R., Yin, C., & Wei, G.-W. (2021). UMAP-assisted K-means clustering of large-scale SARS-CoV-2 mutation datasets. *Computers in Biology and Medicine*, *131*, 104264. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104264>
- Hsueh, H., Kastin, A. J., Mishra, P. K., & Pan, W. (2012). C-Reactive Protein Increases BBB Permeability: Implications for Obesity and Neuroinflammation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *30*(5), 1109-1119. <https://doi.org/10.1159/000343302>
- Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). (2019). *Global Burden of Disease Visualisations: Compare*. <https://www.thelancet.com/lancet/visualisations/gbd-compare>
- Ito, D., Tanaka, K., Suzuki, S., Dembo, T., & Fukuuchi, Y. (2001). Enhanced Expression of Iba1, Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1, After Transient Focal Cerebral Ischemia In Rat Brain. *Stroke*, *32*(5), 1208-1215. <https://doi.org/10.1161/01.STR.32.5.1208>
- Ito, H., Uchida, T., & Makita, K. (2015). Ketamine Causes Mitochondrial Dysfunction in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons. *PLoS ONE*, *10*(5), e0128445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128445>
- Iyer, S. S., & Cheng, G. (2012). Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Critical reviews in immunology*, *32*(1), 23-63.
- Jarnicki, A. G., Conroy, H., Brereton, C., Donnelly, G., Toomey, D., Walsh, K., Sweeney, C., Leavy, O., Fletcher, J., Lavelle, E. C., Dunne, P., & Mills, K. H. G. (2008). Attenuating regulatory T cell induction by TLR agonists through inhibition of p38 MAPK signaling in dendritic cells enhances their efficacy as vaccine adjuvants and cancer immunotherapeutics. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *180*(6), 3797-3806. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.3797>
- Ji, N., Lei, M., Chen, Y., Tian, S., Li, C., & Zhang, B. (2023). How Oxidative Stress Induces Depression? *ASN Neuro*, *15*, 17590914231181037. <https://doi.org/10.1177/17590914231181037>
- Jin, L., Nation, R. L., Li, J., & Nicolazzo, J. A. (2013). Species-Dependent Blood-Brain Barrier Disruption of Lipopolysaccharide: Amelioration by Colistin In Vitro and In Vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(9), 4336-4342. <https://doi.org/10.1128/aac.00765-13>
- Jin, Y., Kang, Y., Wang, M., Wu, B., Su, B., Yin, H., Tang, Y., Li, Q., Wei, W., Mei, Q., Hu, G., Lukacs-Kornek, V., Li, J., Wu, K., Yuan, X., & Wang, W. (2022). Targeting polarized phenotype of microglia via IL6/JAK2/STAT3 signaling to reduce NSCLC brain metastasis. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1), 52. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00872-9>
- Jin, Z., Liang, J., Wang, J., & Kolattukudy, P. E. (2015). MCP-induced protein 1 mediates the minocycline-induced neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury in vitro and in vivo. *Journal of Neuroinflammation*, *12*(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0264-1>



- Johnson, B. Z., Stevenson, A. W., Prêle, C. M., Fear, M. W., & Wood, F. M. (2020). The Role of IL-6 in Skin Fibrosis and Cutaneous Wound Healing. *Biomedicines*, 8(5), 101. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8050101>
- Jung, D. Y., Lee, H., Jung, B.-Y., Ock, J., Lee, M.-S., Lee, W.-H., & Suk, K. (2005). TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: A critical role of IFN-beta as a decision maker. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(10), 6467-6476. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6467>
- Jung, H., Lee, D., You, H., Lee, M., Kim, H., Cheong, E., & Um, J. W. (2023). LPS induces microglial activation and GABAergic synaptic deficits in the hippocampus accompanied by prolonged cognitive impairment. *Scientific Reports*, 13, 6547. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32798-9>
- Kalogeris, T., Bao, Y., & Korthuis, R. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biology*, 2, 702-714. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.05.006>
- Kaul, D., Habbel, P., Derkow, K., Krüger, C., Franzoni, E., Wulczyn, F. G., Bereswill, S., Nitsch, R., Schott, E., Veh, R., Naumann, T., & Lehnardt, S. (2012). Expression of Toll-Like Receptors in the Developing Brain. *PLOS ONE*, 7(5), e37767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037767>
- Kawai, T., & Akira, S. (2007). TLR signaling. *Seminars in Immunology*, 19(1), 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.12.004>
- Kilanowska, A., & Studzińska, S. (2020). In vivo and in vitro studies of antisense oligonucleotides – a review. *RSC Advances*, 10(57), 34501-34516. <https://doi.org/10.1039/D0RA04978F>
- Kim, K. A., Jung, J. H., Kang, I. G., Choi, Y. S., & Kim, S. T. (2018). ROS Is Involved in Disruption of Tight Junctions of Human Nasal Epithelial Cells Induced by HRV16. *The Laryngoscope*, 128(12), E393-E401. <https://doi.org/10.1002/lary.27510>
- Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 16(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>
- Kuloglu, M., Atmaca, M., Tezcan, E., Ustundag, B., & Bulut, S. (2003). Antioxidant Enzyme and Malondialdehyde Levels in Patients with Panic Disorder. *Neuropsychobiology*, 46(4), 186-189. <https://doi.org/10.1159/000067810>
- Kushnareva, Y., Murphy, A. N., & Andreyev, A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: Modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochemical Journal*, 368(Pt 2), 545-553. <https://doi.org/10.1042/BJ20021121>
- Lawson, M. A., McCusker, R. H., & Kelley, K. W. (2013). Interleukin-1 beta converting enzyme is necessary for development of depression-like behavior following intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide to mice. *Journal of Neuroinflammation*, 10(1), 833. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-54>
- Lee, J.-G., Lee, S.-H., Park, D.-W., Lee, S.-H., Yoon, H.-S., Chin, B.-R., Kim, J.-H., Kim, J.-R., & Baek, S.-H. (2008). Toll-like receptor 9-stimulated monocyte chemoattractant protein-1 is mediated via JNK-cytosolic phospholipase A2-ROS signaling. *Cellular Signalling*, 20(1), 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.09.003>

- Lee, S.-R., Tsuji, K., Lee, S.-R., & Lo, E. H. (2004). Role of Matrix Metalloproteinases in Delayed Neuronal Damage after Transient Global Cerebral Ischemia. *The Journal of Neuroscience*, *24*(3), 671-678. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4243-03.2004>
- Leifer, C. A., Kennedy, M. N., Mazzoni, A., Lee, C., Kruhlak, M. J., & Segal, D. M. (2004). TLR9 Is Localized in the Endoplasmic Reticulum Prior to Stimulation. *The Journal of Immunology*, *173*(2), 1179-1183. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.1179>
- Lenz, M., Eichler, A., Kruse, P., Strehl, A., Rodriguez-Rozada, S., Goren, I., Yogev, N., Frank, S., Waisman, A., Deller, T., Jung, S., Maggio, N., & Vlachos, A. (2020). Interleukin 10 Restores Lipopolysaccharide-Induced Alterations in Synaptic Plasticity Probed by Repetitive Magnetic Stimulation. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.614509>
- Li, H., Sheng, Z., Khan, S., Zhang, R., Liu, Y., Zhang, Y., Yong, V. W., & Xue, M. (2022). Matrix Metalloproteinase-9 as an Important Contributor to the Pathophysiology of Depression. *Frontiers in Neurology*, *13*, 861843. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.861843>
- Lin, Z.-Q., Kondo, T., Ishida, Y., Takayasu, T., & Mukaida, N. (2003). Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *Journal of Leukocyte Biology*, *73*(6), 713-721. <https://doi.org/10.1189/jlb.0802397>
- Liu, W., Ge, T., Leng, Y., Pan, Z., Fan, J., Yang, W., & Cui, R. (2017). The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural Plasticity*, *2017*, 6871089. <https://doi.org/10.1155/2017/6871089>
- Liu, X., Liu, J., Zhao, S., Zhang, H., Cai, W., Cai, M., Ji, X., Leak, R. K., Gao, Y., Chen, J., & Hu, X. (2016). Interleukin-4 Is Essential for Microglia/Macrophage M2 Polarization and Long-Term Recovery After Cerebral Ischemia. *Stroke*, *47*(2), 498-504. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.012079>
- Liu, Y., Ho, R. C.-M., & Mak, A. (2012). Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: A meta-analysis and meta-regression. *Journal of Affective Disorders*, *139*(3), 230-239. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.08.003>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, *25*(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loftus, R. M., & Finlay, D. K. (2016). Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator\*. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.693903>
- Lu, P., Wang, G., Lu, X., Qiao, P., Jin, Y., Yu, J., Chen, Q., & Wang, H. (2022). Elevated matrix metalloproteinase 9 supports peripheral nerve regeneration via promoting Schwann cell migration. *Experimental Neurology*, *352*, 114020. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114020>
- Luengo, A., Sullivan, L. B., & Heiden, M. G. V. (2014). Understanding the complex-ity of metformin action: Limiting mitochondrial respiration to improve cancer therapy. *BMC Biology*, *12*(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0082-4>

- Luo, J., Xu, Z., Noordam, R., van Heemst, D., & Li-Gao, R. (2022). Depression and Inflammatory Bowel Disease: A Bidirectional Two-sample Mendelian Randomization Study. *Journal of Crohn's & Colitis*, 16(4), 633-642. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjab191>
- Lynch, A. M., Walsh, C., Delaney, A., Nolan, Y., Campbell, V. A., & Lynch, M. A. (2004). Lipopolysaccharide-induced increase in signalling in hippocampus is abrogated by IL-10—A role for IL-1 $\beta$ ? IL-10 antagonizes LPS-induced changes. *Journal of Neurochemistry*, 88(3), 635-646. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02157.x>
- Lyra e Silva, N. M., Gonçalves, R. A., Pascoal, T. A., Lima-Filho, R. A. S., Resende, E. de P. F., Vieira, E. L. M., Teixeira, A. L., de Souza, L. C., Peny, J. A., Fortuna, J. T. S., Furigo, I. C., Hashiguchi, D., Miya-Coreixas, V. S., Clarke, J. R., Abisambra, J. F., Longo, B. M., Donato, J., Fraser, P. E., Rosa-Neto, P., ... De Felice, F. G. (2021). Pro-inflammatory interleukin-6 signaling links cognitive impairments and peripheral metabolic alterations in Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01349-z>
- MacQueen, G. M., Campbell, S., McEwen, B. S., Macdonald, K., Amano, S., Joffe, R. T., Nahmias, C., & Young, L. T. (2003). Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), 1387-1392. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337481100>
- Madrugal, J. L. M., Leza, J. C., Polak, P., Kalinin, S., & Feinstein, D. L. (2009). Astrocyte-Derived MCP-1 Mediates Neuroprotective Effects of Noradrenaline. *The Journal of Neuroscience*, 29(1), 263-267. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4926-08.2009>
- Marcello, E., & Chiono, V. (2023). Biomaterials-Enhanced Intranasal Delivery of Drugs as a Direct Route for Brain Targeting. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ijms24043390>
- Marsland, A. L., Gianaros, P. J., Abramowitch, S. M., Manuck, S. B., & Hariri, A. R. (2008). Interleukin-6 Covaries Inversely with Hippocampal Grey Matter Volume in Middle-Aged Adults. *Biological Psychiatry*, 64(6), 484-490. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.04.016>
- Martínez de Toda, I., González-Sánchez, M., Díaz-Del Cerro, E., Valera, G., Carracedo, J., & Guerra-Pérez, N. (2023). Sex differences in markers of oxidation and inflammation. Implications for ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 211, 111797. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2023.111797>
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
- Masanetz, R. K., Winkler, J., Winner, B., Günther, C., & Süß, P. (2022). The Gut–Immune–Brain Axis: An Important Route for Neuropsychiatric Morbidity in Inflammatory Bowel Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11111. <https://doi.org/10.3390/ijms231911111>
- Mattson, M. P., Goodman, Y., Luo, H., Fu, W., & Furukawa, K. (1997). Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: Evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *Journal of Neuroscience Research*, 49(6), 681-697. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19970915\)49:6<681::AID-JNR3>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19970915)49:6<681::AID-JNR3>3.0.CO;2-3)

McInnes, L., Healy, J., & Melville, J. (2020). *UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction* (arXiv:1802.03426). arXiv. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1802.03426>

Mello, B. S. F., Chaves Filho, A. J. M., Custódio, C. S., Cordeiro, R. C., Miyajima, F., de Sousa, F. C. F., Vasconcelos, S. M. M., de Lucena, D. F., & Macedo, D. (2018). Sex influences in behavior and brain inflammatory and oxidative alterations in mice submitted to lipopolysaccharide-induced inflammatory model of depression. *Journal of Neuroimmunology*, *320*, 133-142. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.04.009>

Michaluk, P., Wawrzyniak, M., Alot, P., Szczot, M., Wyrembek, P., Mercik, K., Medvedev, N., Wilczek, E., De Roo, M., Zuschratter, W., Muller, D., Wilczynski, G. M., Mozrzymas, J. W., Stewart, M. G., Kaczmarek, L., & Wlodarczyk, J. (2011). Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology. *Journal of Cell Science*, *124*(Pt 19), 3369-3380. <https://doi.org/10.1242/jcs.090852>

Mishra, P., & Chan, D. C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *The Journal of Cell Biology*, *212*(4), 379-387. <https://doi.org/10.1083/jcb.201511036>

Mohammadi, A. H., Balandeh, E., & Milajerdi, A. (2021). Malondialdehyde concentrations in obsessive-compulsive disorder: A systematic review and meta-analysis. *Annals of General Psychiatry*, *20*(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s12991-021-00354-2>

**Morcuende, A.**, García-Gutiérrez, M. S., Tambaro, S., Nieto, E., Manzanares, J., & Femenia, T. (2022). Immunomodulatory Role of CB2 Receptors in Emotional and Cognitive Disorders. *Frontiers in Psychiatry*, *13*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2022.866052>

**Morcuende, A.**, Navarrete, F., Nieto, E., Manzanares, J., & Femenía, T. (2021). Inflammatory Biomarkers in Addictive Disorders. *Biomolecules*, *11*(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/biom11121824>

Moreau, M., André, C., O'Connor, J. C., Dumich, S. A., Woods, J. A., Kelley, K. W., Dantzer, R., Lestage, J., & Castanon, N. (2008). Inoculation of Bacillus Calmette-Guerin to mice induces an acute episode of sickness behavior followed by chronic depressive-like behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, *22*(7), 1087-1095. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.04.001>

Morisalo, D., & Anderson, K. V. (1995). SIGNALING PATHWAYS THAT ESTABLISH THE DORSAL-VENTRAL PATTERN OF THE DROSOPHILA EMBRYO. *Annual Review of Genetics*, *29*(1), 371-399. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.002103>

Morris, G., & Berk, M. (2015). The many roads to mitochondrial dysfunction in neuroimmune and neuropsychiatric disorders. *BMC Medicine*, *13*(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0310-y>

Mukherjee, P., Winkler, C. W., Taylor, K. G., Woods, T. A., Nair, V., Khan, B. A., & Peterson, K. E. (2015). SARM1, not MyD88, mediates TLR7/TLR9-induced apoptosis in neurons. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *195*(10), 4913-4921. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500953>

Murtaj, V., Belloli, S., Di Grigoli, G., Pannese, M., Ballarini, E., Rodriguez-Menendez, V., Marmiroli, P., Cappelli, A., Masiello, V., Monterisi, C., Bellelli, G., Panina-Bordignon, P., & Moresco, R. M. (2019). Age and Sex Influence the Neuro-inflammatory Response to a Peripheral

Acute LPS Challenge. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2019.00299>

Nagy, V., Bozdagi, O., Matynia, A., Balcerzyk, M., Okulski, P., Dzwonek, J., Costa, R. M., Silva, A. J., Kaczmarek, L., & Huntley, G. W. (2006). Matrix Metalloproteinase-9 Is Required for Hippocampal Late-Phase Long-Term Potentiation and Memory. *Journal of Neuroscience*, 26(7), 1923-1934. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4359-05.2006>

Najjar, S., Pearlman, D. M., Alper, K., Najjar, A., & Devinsky, O. (2013). Neuroinflammation and psychiatric illness. *Journal of Neuroinflammation*, 10(1), 816. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-43>

Ng, C. Y. H., Tay, S. H., McIntyre, R. S., Ho, R., Tam, W. W. S., & Ho, C. S. H. (2022). Elucidating a bidirectional association between rheumatoid arthritis and depression: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 311, 407-415. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2022.05.108>

Niklasson, F., & Agren, H. (1984). Brain energy metabolism and blood-brain barrier permeability in depressive patients: Analyses of creatine, creatinine, urate, and albumin in CSF and blood. *Biological Psychiatry*, 19(8), 1183-1206.

Norman, G. J., Karelina, K., Zhang, N., Walton, J. C., Morris, J. S., & Devries, A. C. (2010). Stress and IL-1 $\beta$  contribute to the development of depressive-like behavior following peripheral nerve injury. *Molecular Psychiatry*, 15(4), 404-414. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.91>

O'Connor, J. C., Lawson, M. A., André, C., Moreau, M., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K. W., & Dantzer, R. (2009). Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Molecular Psychiatry*, 14(5), 511-522. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002148>

Okun, E., Griffioen, K. J., & Mattson, M. P. (2011). Toll-like receptor Signaling in Neural Plasticity and Disease. *Trends in neurosciences*, 34(5), 269-281. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.005>

Olkhova, E. A., Smith, L. A., Bradshaw, C., Gorman, G. S., Erskine, D., & Ng, Y. S. (2023). Neurological Phenotypes in Mouse Models of Mitochondrial Disease and Relevance to Human Neuropathology. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms24119698>

Painsipp, E., Köfer, M. J., Sinner, F., & Holzer, P. (2011). Prolonged Depression-Like Behavior Caused by Immune Challenge: Influence of Mouse Strain and Social Environment. *PLOS ONE*, 6(6), e20719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020719>

Palazidou, E. (2012). The neurobiology of depression. *British Medical Bulletin*, 101(1), 127-145. <https://doi.org/10.1093/bmb/lds004>

Pasare, C., & Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5609), 1033-1036. <https://doi.org/10.1126/science.1078231>

Pei, L., & Wallace, D. C. (2018). Mitochondrial Etiology of Neuropsychiatric Disorders. *Biological psychiatry*, 83(9), 722-730. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.11.018>

- Peng, T.-I., & Jou, M.-J. (2004). Mitochondrial swelling and generation of reactive oxygen species induced by photoirradiation are heterogeneously distributed. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1011, 112-122. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-41088-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-662-41088-2_12)
- Petronilli, V., Penzo, D., Scorrano, L., Bernardi, P., & Lisa, F. D. (2001). The Mitochondrial Permeability Transition, Release of Cytochrome c and Cell Death: CORRELATION WITH THE DURATION OF PORE OPENINGS IN SITU\*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 12030-12034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010604200>
- Pollard, A. K., Craig, E. L., & Chakrabarti, L. (2016). Mitochondrial Complex 1 Activity Measured by Spectrophotometry Is Reduced across All Brain Regions in Ageing and More Specifically in Neurodegeneration. *PLoS One*, 11(6), e0157405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157405>
- Qin, L., Huang, W., Mo, X., Chen, Y., & Wu, X. (2015). LPS Induces Occludin Dysregulation in Cerebral Microvascular Endothelial Cells via MAPK Signaling and Augmenting MMP-2 Levels. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 120641. <https://doi.org/10.1155/2015/120641>
- Reinhard, S. M., Razak, K., & Ethell, I. M. (2015). A delicate balance: Role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 280. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00280>
- Remus, J. L., & Dantzer, R. (2016). Inflammation Models of Depression in Rodents: Relevance to Psychotropic Drug Discovery. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 19(9), pyw028. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw028>
- Rietdijk, C. D., Van Wezel, R. J. A., Garsen, J., & Kraneveld, A. D. (2016). Neuronal toll-like receptors and neuro-immunity in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and stroke. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 3(2), 27. <https://doi.org/10.20517/2347-8659.2015.28>
- Rizvi, S., & Khan, A. M. (2019). Use of Transcranial Magnetic Stimulation for Depression. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.4736>
- Rollins, B. L., Morgan, L., Hjelm, B. E., Sequeira, A., Schatzberg, A. F., Barchas, J. D., Lee, F. S., Myers, R. M., Watson, S. J., Akil, H., Potkin, S. G., Bunney, W. E., & Vawter, M. P. (2018). Mitochondrial Complex I Deficiency in Schizophrenia and Bipolar Disorder and Medication Influence. *Molecular Neuropsychiatry*, 3(3), 157-169. <https://doi.org/10.1159/000484348>
- Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., & Schwartz, M. (2007). Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nature Cell Biology*, 9(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/ncb1629>
- Roohi, E., Jaafari, N., & Hashemian, F. (2021). On inflammatory hypothesis of depression: What is the role of IL-6 in the middle of the chaos? *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02100-7>
- Ross, E. L., Zivin, K., & Maixner, D. F. (2018). Cost-effectiveness of Electroconvulsive Therapy vs Pharmacotherapy/Psychotherapy for Treatment-Resistant Depression in the United States. *JAMA Psychiatry*, 75(7), 713-722. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2018.0768>
- Rossetti, A. C., Paladini, M. S., Trepci, A., Mallien, A., Riva, M. A., Gass, P., & Molteni, R. (2019). Differential Neuroinflammatory Response in Male and Female Mice: A Role for BDNF. *Frontiers*

Sabeh, R. E., Bonnet, M., Corf, K. L., Lang, K., Kfoury, A., Badran, B., Hussein, N., Virard, F., Treilleux, I., Romancer, M. L., Lebecque, S., Manie, S., Coste, I., & Renno, T. (2021). A Gender-Dependent Molecular Switch of Inflammation via MyD88/Estrogen Receptor-Alpha Interaction. *Journal of Inflammation Research*, 14, 2149-2156. <https://doi.org/10.2147/JIR.S306805>

Salim, S. (2014). Oxidative Stress and Psychological Disorders. *Current Neuropharmacology*, 12(2), 140. <https://doi.org/10.2174/1570159X11666131120230309>

Sanmarco, L. M., Ponce, N. E., Visconti, L. M., Eberhardt, N., Theumer, M. G., Minguez, Á. R., & Aoki, M. P. (2017). IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(4), 857-869. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.006>

Sawyer, A. J., Tian, W., Saucier-Sawyer, J. K., Rizk, P. J., Saltzman, W. M., Bellamkonda, R. V., & Kyriakides, T. R. (2014). The effect of inflammatory cell-derived MCP-1 loss on neuronal survival during chronic neuroinflammation. *Biomaterials*, 35(25), 6698-6706. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.05.008>

Scholtzova, H., Do, E., Dhakal, S., Sun, Y., Liu, S., Mehta, P. D., & Wisniewski, T. (2017). Innate Immunity Stimulation via Toll-Like Receptor 9 Ameliorates Vascular Amyloid Pathology in Tg-SwDI Mice with Associated Cognitive Benefits. *The Journal of Neuroscience*, 37(4), 936-959. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1967-16.2016>

Selles, M. C., Fortuna, J. T. S., & Santos, L. E. (2017). Immunomodulation via Toll-like Receptor 9: An Adjunct Therapy Strategy against Alzheimer's Disease? *Journal of Neuroscience*, 37(19), 4864-4867. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0579-17.2017>

Shadrina, M., Bondarenko, E. A., & Slominsky, P. A. (2018). Genetics Factors in Major Depression Disease. *Frontiers in Psychiatry*, 9, 334. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00334>

Sheridan, B. C., Dinarello, C. A., Meldrum, D. R., Fullerton, D. A., Selzman, C. H., & McIntyre, R. C. (1999). Interleukin-11 attenuates pulmonary inflammation and vasomotor dysfunction in endotoxin-induced lung injury. *The American Journal of Physiology*, 277(5), L861-867. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.277.5.L861>

Shi, F.-J., Xie, H., Zhang, C.-Y., Qin, H.-F., Zeng, X.-W., Lou, H., Zhang, L., Xu, G.-T., Zhang, J.-F., & Xu, G.-X. (2021). Is Iba-1 protein expression a sensitive marker for microglia activation in experimental diabetic retinopathy? *International Journal of Ophthalmology*, 14(2), 200-208. <https://doi.org/10.18240/ijo.2021.02.04>

Shintani, Y., Drexler, H. C., Kioka, H., Terracciano, C. M., Coppen, S. R., Imamura, H., Akao, M., Nakai, J., Wheeler, A. P., Higo, S., Nakayama, H., Takashima, S., Yashiro, K., & Suzuki, K. (2014). Toll-like receptor 9 protects non-immune cells from stress by modulating mitochondrial ATP synthesis through the inhibition of SERCA2. *EMBO reports*, 15(4), 438-445. <https://doi.org/10.1002/embr.201337945>

Shintani, Y., Kapoor, A., Kaneko, M., Smolenski, R. T., D'Acquisto, F., Coppen, S. R., Harada-Shoji, N., Lee, H. J., Thiernemann, C., Takashima, S., Yashiro, K., & Suzuki, K. (2013). TLR9 mediates cellular protection by modulating energy metabolism in cardiomyocytes and neurons.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(13), 5109-5114. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219243110>

Shishkina, G. T., Bannova, A. V., Komysheva, N. P., & Dygalo, N. N. (2020). Anxiogenic-like effect of chronic lipopolysaccharide is associated with increased expression of matrix metalloproteinase 9 in the rat amygdala. *Stress*, 23(6), 708-714. <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1793943>

Silverman, H. A., Dancho, M., Regnier-Golanov, A., Nasim, M., Ochani, M., Olofsson, P. S., Ahmed, M., Miller, E. J., Chavan, S. S., Golanov, E., Metz, C. N., Tracey, K. J., & Pavlov, V. A. (2015). Brain Region-Specific Alterations in the Gene Expression of Cytokines, Immune Cell Markers and Cholinergic System Components during Peripheral Endotoxin-Induced Inflammation. *Molecular Medicine*, 20(1), 601-611. <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00147>

Song, Y., Shou, L. M., Ai, L.-Y., Bei, Y., & Chen, M.-T. (2019). Mini-Review: The Non-Immune Functions of Toll-Like Receptors. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 29(1), 37-45. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2018027399>

Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367-370. <https://doi.org/10.1007/BF00428203>

Stevens, S. L., Ciesielski, T. M. P., Marsh, B. J., Yang, T., Homen, D. S., Boule, J.-L., Lessov, N. S., Simon, R. P., & Stenzel-Poore, M. P. (2008). Toll-like receptor 9: A new target of ischemic preconditioning in the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(5), 1040-1047. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600606>

Sulakhiya, K., Keshavlal, G. P., Bezbaruah, B. B., Dwivedi, S., Gurjar, S. S., Munde, N., Jangra, A., Lahkar, M., & Gogoi, R. (2016). Lipopolysaccharide induced anxiety- and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin. *Neuroscience Letters*, 611, 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.11.031>

Sumner, J. A., Chen, Q., Roberts, A. L., Winning, A., Rimm, E. B., Gilsanz, P., Glymour, M. M., Tworoger, S. S., Koenen, K. C., & Kubzansky, L. D. (2018). Posttraumatic Stress Disorder Onset and Inflammatory and Endothelial Function Biomarkers in Women. *Brain, behavior, and immunity*, 69, 203-209. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.013>

Sun, Z., Chen, A., Fang, H., Sun, D., Huang, M., Cheng, E., Luo, M., Zhang, X., Fang, H., & Qian, G. (2023). B cell-derived IL-10 promotes the resolution of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Cell Death & Disease*, 14(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05954-2>

Takada, Y., Hisamatsu, T., Kamada, N., Kitazume, M. T., Honda, H., Oshima, Y., Saito, R., Takayama, T., Kobayashi, T., Chinen, H., Mikami, Y., Kanai, T., Okamoto, S., & Hibi, T. (2010). Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(5), 2671-2676. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804012>

Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 53(2), 1181-1194. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>



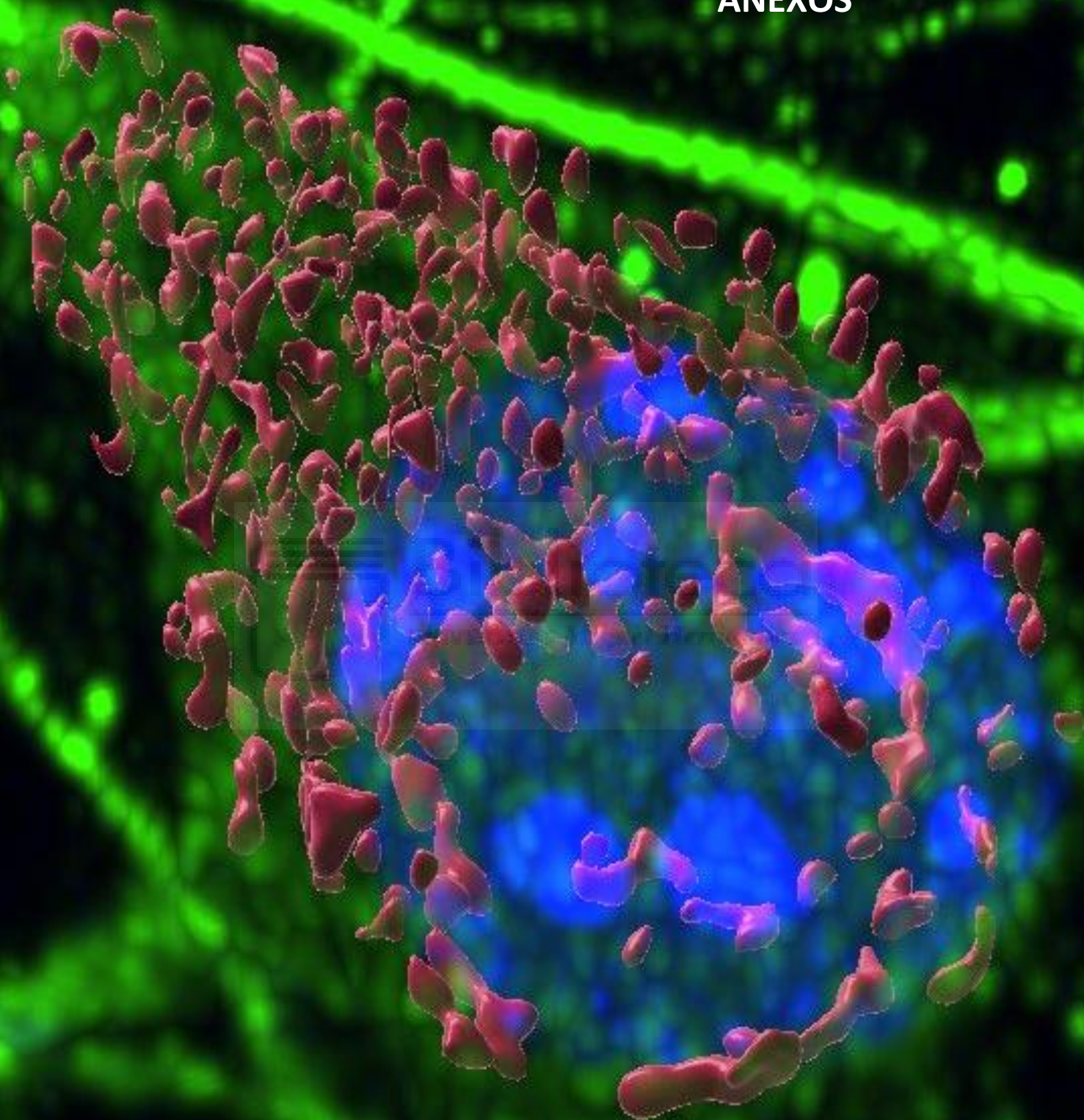
- Thomalla, M., Schmid, A., Neumann, E., Pfefferle, P. I., Müller-Ladner, U., Schäffler, A., & Karrasch, T. (2019). Evidence of an anti-inflammatory toll-like receptor 9 (TLR 9) pathway in adipocytes. *The Journal of Endocrinology*, *240*(2), 325-343. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0326>
- Thompson, W. L., Karpus, W. J., & Van Eldik, L. J. (2008). MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult. *Journal of Neuroinflammation*, *5*(1), 35. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-35>
- Trifu, S., Sevcenco, A., Stănescu, M., Drăgoi, A., & Cristea, M. (2021). Efficacy of electroconvulsive therapy as a potential first-choice treatment in treatment-resistant depression (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, *22*(5), 1281. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10716>
- Tripathi, A., Bartosh, A., Whitehead, C., & Pillai, A. (2023). Activation of cell-free mtDNA-TLR9 signaling mediates chronic stress-induced social behavior deficits. *Molecular Psychiatry*, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02189-7>
- Vafadari, B., Salamian, A., & Kaczmarek, L. (2016). MMP-9 in translation: From molecule to brain physiology, pathology, and therapy. *Journal of Neurochemistry*, *139*(S2), 91-114. <https://doi.org/10.1111/jnc.13415>
- Valkanova, V., Ebmeier, K. P., & Allan, C. L. (2013). CRP, IL-6 and depression: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Journal of Affective Disorders*, *150*(3), 736-744. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.06.004>
- Varatharaj, A., & Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, *60*, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010>
- Ventura-Clapier, R., Moulin, M., Piquereau, J., Lemaire, C., Mericskay, M., Veksler, V., & Garnier, A. (2017). Mitochondria: A central target for sex differences in pathologies. *Clinical Science*, *131*(9), 803-822. <https://doi.org/10.1042/CS20160485>
- Videbech, P., & Ravnkilde, B. (2004). Hippocampal Volume and Depression: A Meta-Analysis of MRI Studies. *American Journal of Psychiatry*, *161*(11), 1957-1966. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.11.1957>
- Walker, A. K., Budac, D. P., Bisulco, S., Lee, A. W., Smith, R. A., Beenders, B., Kelley, K. W., & Dantzer, R. (2013). NMDA Receptor Blockade by Ketamine Abrogates Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior in C57BL/6J Mice. *Neuropsychopharmacology*, *38*(9), 1609-1616. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.71>
- Wang, X., Bozdagi, O., Nikitczuk, J. S., Zhai, Z. W., Zhou, Q., & Huntley, G. W. (2008). Extracellular proteolysis by matrix metalloproteinase-9 drives dendritic spine enlargement and long-term potentiation coordinately. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(49), 19520-19525. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807248105>
- Wang, X., & Michaelis, E. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *2*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2010.00012>

- Wang, Y., Zhang, Y., Hu, W., Xie, S., Gong, C.-X., Iqbal, K., & Liu, F. (2015). Rapid alteration of protein phosphorylation during postmortem: Implication in the study of protein phosphorylation. *Scientific Reports*, *5*, 15709. <https://doi.org/10.1038/srep15709>
- Weber, C. M., & Clyne, A. M. (2021). Sex differences in the blood–brain barrier and neurodegenerative diseases. *APL Bioengineering*, *5*(1), 011509. <https://doi.org/10.1063/5.0035610>
- Wheaton, W. W., Weinberg, S. E., Hamanaka, R. B., Soberanes, S., Sullivan, L. B., Anso, E., Glasauer, A., Dufour, E., Mutlu, G. M., Budigner, G. S., & Chandel, N. S. (2014). Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *eLife*, *3*, e02242. <https://doi.org/10.7554/eLife.02242>
- Woodburn, S. C., Bollinger, J. L., & Wohleb, E. S. (2021). The semantics of microglia activation: Neuroinflammation, homeostasis, and stress. *Journal of Neuroinflammation*, *18*(1), 258. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02309-6>
- World Health Organization (WHO). (2022). *Mental disorders*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>
- World Health Organization (WHO). (2023). *Depressive disorder (depression)*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- Yang, Y., Estrada, E. Y., Thompson, J. F., Liu, W., & Rosenberg, G. A. (2007). Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *27*(4), 697-709. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600375>
- Yang, Y., Sun, H., Zhang, Y., Zhang, T., Gong, J., Wei, Y., Duan, Y.-G., Shu, M., Yang, Y., Wu, D., & Yu, D. (2021). Dimensionality reduction by UMAP reinforces sample heterogeneity analysis in bulk transcriptomic data. *Cell Reports*, *36*(4), 109442. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109442>
- Zeng, W., Zhang, C., Long, Q., & Li, Y. (2021). Dexmedetomidine Alleviates LPS-Induced Neuronal Dysfunction by Modulating the AKT/GSK-3 $\beta$ /CRMP-2 Pathway in Hippocampal Neurons. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *17*, 671-680. <https://doi.org/10.2147/NDT.S297365>
- Zhang, J., Xue, B., Jing, B., Tian, H., Zhang, N., Li, M., Lu, L., Chen, L., Diao, H., Chen, Y., Wang, M., & Li, X. (2022). LPS activates neuroinflammatory pathways to induce depression in Parkinson's disease-like condition. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 961817. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.961817>
- Zimmerman, G., Shaltiel, G., Barbash, S., Cohen, J., Gasho, C. J., Shenhar-Tsarfaty, S., Shalev, H., Berliner, S. A., Shelef, I., Shoham, S., Friedman, A., Cohen, H., & Soreq, H. (2012). Post-traumatic anxiety associates with failure of the innate immune receptor TLR9 to evade the pro-inflammatory NF $\kappa$ B pathway. *Translational Psychiatry*, *2*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.4>
- Zmora, N., Bashardes, S., Levy, M., & Elinav, E. (2017). The Role of the Immune System in Metabolic Health and Disease. *Cell Metabolism*, *25*(3), 506-521. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.02.006>

Zou, P., Yang, F., Ding, Y., Zhang, D., Liu, Y., Zhang, J., Wu, D., & Wang, Y. (2022). Lipopolysaccharide downregulates the expression of ZO-1 protein through the Akt pathway. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 774. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07752-1>

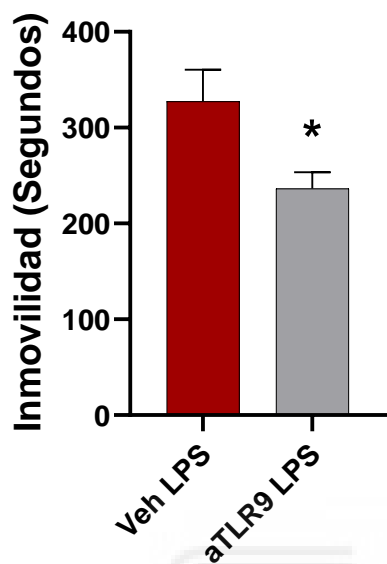


# ANEXOS



## ANEXO I – efecto aTLR9 a largo plazo

### Efecto permanente aTLR9



**Anexo II.** Tiempos de inmovilidad Test de suspensión por la cola (10 minutos). Ratones machos de 5-6 meses de edad tratados con agonista y administrados a los dos meses con LPS. n=8 por grupo. T-test no pareado  $p = 0,0363$  t, dft=2,334, df=13

# ANEXO II – Artículo 1

## Inflammatory biomarkers in addictive disorders

Álvaro Morcuende<sup>1</sup>, Francisco Navarrete<sup>1,2</sup>, Elena Nieto<sup>1</sup>, Jorge Manzanares<sup>1,2</sup> and Teresa Femenía<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Avda. de Ramón y Cajal s/n, San Juan de Alicante, 03550 Alicante, Spain

<sup>2</sup> Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS), Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III, MICINN and FEDER, Madrid, Spain

\* Correspondence: tfemenia@umh.es; Tel.: +34 965919553

**Abstract:** Substance use disorders are a group of diseases associated with social, professional, and family impairment and represent a high socio-economic impact on the countries' health systems. These disorders present a very complex diagnosis and treatment due to the lack of suitable biomarkers supporting the correct diagnosis and classification and the difficulty in selecting effective therapies. Over the last few years, several studies pointed out that these addictive disorders are associated with systemic and central nervous system inflammation that could play a relevant role in the onset and progression of these diseases. Therefore, identifying different immune system components as biomarkers of such addictive disorders could be a crucial step to promote appropriate diagnosis and treatment. Thus, this work aims to provide an overview of the immune system alterations that may be biomarkers of various addictive disorders.

### Citation:

Academic Editor:

Received: date

Accepted: date

Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** Inflammation; addiction; cannabinoid; alcohol; opioid; biomarker; diagnostic.

### 1. Introduction

Inflammation is a physiological process that helps to repair tissue damage or resolve an infection. However, abnormal responses or chronic inflammation can be pathological. Neuroinflammatory processes are widely implicated in many psychiatric diseases, including major depression, anxiety disorders, schizophrenia, or substance use disorder (SUD). Peripheral inflammatory states can contribute to neuroinflammation through several alterations in various organs and tissues. Among the most notable alterations is the disruption of the blood-brain barrier, which facilitates the infiltration of inflammatory mediators into the central nervous system and, alterations in the intestinal permeability associated with changes in the composition of the gut microbiota.

Consequently, an increase in microbiota products and derivatives [1] may play a relevant role in activating the innate immune system, triggering a systemic inflammatory reaction followed by an adaptive immune response [2]. One of the main routes of starting the innate immune system is through the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) signaling pathway. This pathway promotes the release of proinflammatory cytokines such as Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), influencing neurobiological processes that occur in the development of addiction [3]. Cytokines are small proteins with a specific effect on the interactions and communications between cells. Some of them, such as IL-6 or IL-10 and INF- $\gamma$ , may carry mixed actions with pro- or anti-inflammatory actions depending on the specific situation [4,5].

In addition to inflammatory cytokines, different elements are released into the extracellular space in damage and are recognized by the innate immune system components. These elements are called "Damage associated Molecular Patterns" (DAMPs) and are recognized by specific receptors, known as Pattern Recognition Receptors (PRR), composed of several families of receptors. Within the PRRs, Toll-Like Receptors (TLRs) or NOD-Like Receptors (NLRs) can be highlighted. These receptors recognize DAMPs and Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) or products associated with oxidative stress such as reactive oxygen species (ROS). Once these PRRs are activated, a signaling cascade is initiated that releases inflammatory mediators through pathways such as NF- $\kappa$ B [6-8].

Lately, several studies have focused on determining the association between inflammation and SUD, which has given rise to many findings in this regard. However, it is still unclear how the immune system and inflammatory mediators may associate with the vulnerability for the development of SUD, its progression, and whether immunotherapy may be an excellent approach to tackle these disorders.

It has been shown how different cell types can synthesize proinflammatory cytokines, both neuronal and glial, and can substantially affect brain physiology, such as IL-6 or IL-1 $\beta$  in Long Term Potentiation (LTP), memory, and synaptic plasticity [9,10]. These neuroadaptive changes also occur in substance use disorders, where alterations in the innate immune system associated with areas of the mesolimbic system and processes involved in addictive behaviors have been seen [3,11,12]. On the other hand, among TLRs, where 13 were described in mice and only 10 in humans [8], the most studied receptor was TLR4. This receptor has been involved in behavioral deficits due to alcohol consumption [13], alterations in synaptic

plasticity, and opioid drug reinforcement [14]. However, the growing interest in the innate immune system highlights the involvement of other receptors, such as TLR3, TLR7, NLR3 in the case of alcohol [15] [16,17]. Furthermore, these mechanisms are postulated as potential therapeutic targets for substance use disorder [12].

The diagnosis and prognosis of SUD are limited by the lack of specific biomarkers, being the clinical diagnosis based on addiction scales and questionnaires the primary classification tool. This is a significant disadvantage compared to other pathologies, where patients with very heterogeneous clinical features are classified under the umbrella of a single diagnosis. Therefore, to improve the therapeutic process, identifying more specific and sensitive markers, particularly biomarkers that have good reproducibility, a good signal-to-noise ratio, and, very importantly, reflect the dynamism and clinical progression of the disease are needed [18]. The purpose of this review is to evaluate the role of the immune system in substance use disorders, focused on substances that act as nervous system depressants, to assess its potential use as a biomarker, and to guide future research (Figure 1).

[Figure 1 – Graphical abstract]

## **1. Cannabinoids**

Cannabis, such as hashish or marijuana, is the most commonly used illicit drug worldwide. Available data suggest that the prevalence and incidence of its consumption will keep rising over the following years, thus representing a serious public health problem [19]. Approximately 24% of patients initiating treatment for substance abuse have a diagnosis of cannabis use disorder (CUD) [20]. According to the last World Drug Report [21], two hundred million people used marijuana (cannabis) in 2019. Importantly, this report also alerts about the worrying reduction in the perception of risk associated with cannabis use among adolescents and the 4-fold increase in the cannabis herb potency (the content of Delta9-Tetrahydrocannabinol (THC)). An evaluation of the global disease burden indicates that CUD encompassing intoxication, withdrawal syndrome, and dependence criteria, accounted for 2 million disability-adjusted life years (DALYs) globally in 2010 [22].

### **1.1 Endocannabinoid-mediated regulation of the immune system**

The involvement of the endocannabinoid system in the regulation of the immune system was first described when a peripheral receptor for cannabinoids (cannabinoid 2 receptor



(CB2r)) was identified and characterized in macrophages found in the marginal zone of the spleen [23]. Human cannabinoid receptors and their gene transcripts were also identified in blood samples from regular human volunteers who reported no prior use of marijuana [24]. Several reports using endocannabinoids, natural cannabinoids, and synthetic cannabinoids revealed a significant role of these compounds on inflammation and immunomodulation [25-27]. Several reports have accounted for the anti-inflammatory properties of THC and other cannabinoids through multiple immune-related mechanisms such as the suppression of TNF- $\alpha$  and other cytokines such as IL-6, IFN- $\gamma$ , and IL-12 [28-30]. Thus, accumulated evidence points out that cannabis extracts could modulate immune function, an essential factor to be considered both from the recreational and therapeutic point of view associated with the use of cannabis and its derivatives. The following sections compile the studies that have evaluated the changes occurring in different immune system targets after cannabis use, which could be useful as potential biomarkers (Table 1).

[Table 1. Main findings achieved from animal and clinical studies evaluating changes of inflammatory biomarkers after exposure to cannabinoids.]

## **1.2 Consequences of cannabis use on inflammatory biomarkers**

In recent years an increasing number of animal and clinical studies evaluated how the immune system is modified in response to exposure to cannabis or specific cannabinoid compounds. These investigations facilitated changes in different inflammatory biomarkers, mainly cytokines and acute-phase proteins, which may provide valuable information about the immediate or long-term consequences of prolonged cannabis use on the immune system.

Among the first studies that evaluated the effect of cannabis on inflammatory parameters were those focused on the pulmonary system. Baldwin and cols. analyzed alveolar macrophages *in vitro* from marijuana smokers and showed a lower production of TNF- $\alpha$ , IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after LPS-induced stimulation [31]. Similarly, another study performed with airway mucosal biopsies also concluded that regular smoking of marijuana was associated with significant pulmonary inflammation, particularly when combined with tobacco [32]. In addition, gene expression analyses performed in the airway epithelium of cannabis users revealed that IL-6 and several toll-like receptors (TLR2, TLR5, TLR6, TLR9), involved in the initiation of

the inflammatory cascade, were significantly upregulated compared to controls [33].

The effects of cannabis consumption on immune function have been evaluated in different populations of cannabis users, revealing reduced serum levels of IL-6 [34-36], TNF- $\alpha$  [35,37], and IL-2 [38]. Accordingly, animal studies also showed a significant reduction of IL-2 and IFN- $\gamma$  levels [39]. Moreover, in peritoneal macrophages stimulated with LPS extracted from adolescent and adult mice, the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  was reduced while IL-10 increased. Animals treated during the adolescent period produced the opposite effects on the inflammatory biomarkers during adulthood [40]. Interestingly, subsequent studies following the same experimental design in mice and evaluating changes in the levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-10 in the hypothalamus and hippocampus, revealed a very similar profile to that reported in the periphery [41]. Thus, it appears that early-life exposure to cannabis produces a long-lasting and persistent neuroinflammatory state. Indeed, another study performing a 10-day treatment with THC showed increased levels of TNF- $\alpha$ , inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase 2 (COX-2) while reduced IL-10 in the adult prefrontal cortex (PFC) of rats [42].

Some authors found no differences between cannabis users and corresponding controls. For instance, IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  were non-significantly different between controls and marijuana users, and even a mild elevation of IL-6 and TNF- $\alpha$  was found [43]. Indeed, increased levels of total oxidant status, oxidative stress, and IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  were encountered in patients with CUD [44]. In addition, the effect of cannabis use on the plasma levels of the chemokine CCL11 was explored in subjects using cannabis at present (current use), subjects who had not consumed cannabis for two months or more (past use), and their corresponding controls (never use). CCL11 is involved in adult neurogenesis, cognitive functions, and aging processes. In this preliminary study, current cannabis use was associated with significantly higher CCL11 levels, whereas no changes were detected between past users and control patients [45].

#### *C-reactive protein (CRP)*

CRP is an acute-phase reactant protein generated in response to the release of cytokines into the bloodstream. CRP serves as a marker of systemic inflammation associated with the progression of several chronic diseases, including cardiovascular disease (CVD), metabolic disease, and diabetes, as well as mortality. Interestingly, CRP has been recently used to examine the relationship between marijuana use and inflammation, though mixed literature is available. One of the first studies analyzed data from the National Health and

Nutrition Examination Survey (NHANES) indicating that lower CRP levels (< 0.5 mg/dL) were found in past marijuana users compared to current and never-users [46]. These results were intriguing since lower inflammation values were present among former cannabis smokers but not among active smokers. For that reason, more recent NHANES data was employed to obtain that current marijuana users demonstrated lower CRP levels than never-users over one year, failing to fully replicate the previous results but suggesting an anti-inflammatory effect of marijuana [47].

Despite the anti-inflammatory properties attributed to marijuana use, several authors have found no robust predictive relationship with lower CRP levels [48-50]. Recent marijuana use was associated with lower CRP levels, but this effect was explained by gender, body mass index (BMI), and anti-inflammatory medication use [51]. Similarly, a recent report also described lower biomarkers of systemic inflammation, including high-sensitivity CRP, IL-6, and fibrinogen among patients who self-reported cannabis use in the past 30 days. However, these findings were not statistically significant after adjusting with multivariable models [52].

Costello et al. found a proinflammatory effect of marijuana on CRP in adolescents. In addition, higher CRP levels predicted cannabis use, abuse, or dependence [53]. Indeed, maternal CRP levels appear to be predictive for using cannabis during adolescence [54]. Additional studies have also described that long-term cannabis use is associated with increased levels of CRP, suggesting a potential proinflammatory profile. A cross-sectional study with 24 long-term cannabis users detected higher circulating CRP levels that were associated with more significant 18-kDa translocator protein (TSPO) brain levels analyzed by positron emission tomography (PET) [55]. The mitochondrial TSPO protein is highly expressed in glial cells. It is commonly used as a biomarker to image neuroinflammation as its expression is upregulated in reactive microglia and astrocyte cells in CNS diseases. However, neuronal activity can modify TSPO levels suggesting that non-inflammatory interpretations should be considered in some physiological or pathological contexts [56]. Interestingly, Lisano and cols. found higher CRP levels in cannabis users, placing them at moderate risk for CVD development [57,58].

Continued marijuana use (i.e., past 30 days) may confer a more potent anti-inflammatory effect than more remote use (i.e., past 12-months). Future studies assessing the influence of the timing of marijuana use on CRP may be critical to informing our understanding of the length of time in which marijuana use affects CRP levels.

## 2. Alcohol Use Disorder

Alcohol consumption is a central disabling element worldwide and a risk factor for developing cancer and increasing all-cause mortality rates [59]. There are no specific biomarkers to Diagnose Alcohol Use Disorder (AUD) or estimate the degree of consumption. According to the “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th edition (DSM-V) [60]. At least two of the 11 items listed in the manual are needed to establish the diagnosis. Like other substance use disorders, this latest version includes both alcohol abuse and alcohol dependence.

Regarding the risk involved in consumption, various strategies have been developed without much prognostic sensitivity, such as evaluating the consumption of standard units. At this point, an approximate criterion of ranges can be applied that vary, for a low risk of consumption, between 20-40 g per day (<200 g per week) for men and 10-30 g per day (<140 g per week) for women [61]. This criterion varies between countries and the patient’s gender, so it is not uncommon to see diverse values depending on the source consulted. In addition, due to the importance of burden at a global dimension, the World Health Organization has developed another tool, widely used in clinical practice, such as the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT). This scale evaluates consumption, providing values of the low, medium, moderate, moderate risk, high risk, and probable addiction according to the score obtained [62].

These assessments help predict one of the direct consequences of excessive alcohol consumption, such as the development of alcoholic liver disease, alcoholic fatty liver disease, cirrhosis, hepatitis, or alcoholic hepatic encephalopathy. However, they would not provide information for estimating a substance use disorder. This damage may be evaluated by using serum biochemical tests. Other tests nonspecific of AUD can be used to estimate and relate liver damage to excessive alcohol consumption, for example, AST: ALT ratio, elevated GGT or mean corpuscular volume (MCV) [63], together with validated tools for stratifying liver damage, such as the Child-Pugh [64].

In conjunction with validated tools for stratifying liver damage, alcohol consumption leads to alterations in the immune system in phases of liver damage and sporadic consumption, so there is a complex and dynamic relationship between inflammation and alcohol consumption. Therefore, due to the impact of alcohol consumption in society and the lack of biomarkers, we highlight a series of immune alterations observed in different studies during acute or chronic drinking

and withdrawal to guide the development of more specific biomarkers of AUD based on inflammatory markers. Moreover, in this section, we also evaluate the association of alcohol liver disease with inflammation.

## 2.1 Acute Drinking

[Table 2. Alcohol Use Disorder. Acute Drinking.]

The National Institute considers binge drinking on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) as consuming 4/5 or more alcoholic beverages in less than two hours. This type of consumption occurs mainly in adolescents and young patients. In a significant number of cases, emergency medical teams must be involved, and an essential factor that deteriorates interpersonal relationships, which has a significant negative impact on the psychosocial development of these adolescents and young people. Therefore, occasional but excessive consumption represents a significant risk to physical and mental health [65].

As for how this consumption affects the immune system, several studies have shown that binge consumption produces endotoxemia [66,67], leading to increased intestinal permeability. Endotoxins are Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) that can trigger an innate inflammatory response with the consequent release of proinflammatory cytokines through binding to Pattern Recognition Receptors (PRR), as occurs with the bacterial lipopolysaccharide LPS through Toll-Like Receptor 4 (TLR4) [68]. Furthermore, it has been seen that, at the intestinal level, acute alcohol consumption can increase the *E. coli*/Lactobacilli ratio [67], which may also increase the permeability of the intestinal barrier [69].

Cytokines such as IL-8 increase in the plasma in healthy individuals after binge drinking [70]. Furthermore, a transient rise in neutrophils or peripheral blood mononuclear cells was also reported [71,72]. On the other hand, a decrease in microRNA, which are small fragments of about 25 nucleotides of noncoding RNA, was also found. These miRNA can act as post-transcriptional regulators of different pathways of the immune system [73]. In particular, miRNA-223 decreased in alcoholics with recent excessive drinking serum [71], which is highly expressed in neutrophils and inhibits the expression of IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA through the IKK $\alpha$  pathway [74]. In addition, another miRNA such as mir-146a-5p, mir-21-5, and mir-182-5p was altered after acute excessive alcohol consumption and in a sex-dependent manner in females, both human and mice [75].

Interestingly, these findings point out that acute alcohol consumption modulates the inflammatory response, independent of liver damage by chronic consumption. Overall, these alterations could be helpful as a measure of the vulnerability to develop chronic alcohol disorder, relapse in alcoholic patients, and detect binge drinking consumptions (Table 2).

## 2.2 Chronic Drinking

[Table 3. Alcohol Use Disorder. Chronic Drinking.]

Chronic alcohol consumption has become a significant problem in society, representing one of the significant burdens on health and social systems [76]. Moreover, alcohol use disorder dramatically impacts patients' social, employment, and family life. AUD is with more significant comorbidity of psychiatric pathologies or increased risk of metabolic diseases [77].

Therefore, it is not surprising that alcohol consumption is associated with a systemic inflammation measurable in different organs and tissues, as in peripheral blood. A decrease in magnesium levels was found in patients with a high consumption than those with moderate consumption [78]. Low magnesium levels are associated with cell damage and cell death and damage-associated molecular patterns or DAMPS [79], activating an immune-inflammatory response. Besides, anti-acetaldehyde antibodies can be detected in serum [80]. This adaptive response could be produced by peripheral dendritic cells (D.C.) involved in the innate response [81]. A study by Laso et al. reported how D.C.s released IL1 $\beta$ , IL6, IL12, and TNF $\alpha$  in chronic alcoholic patients without liver disease [82]; Furthermore, post-mortem studies revealed that alcoholic patients with alcoholic ketoacidosis had elevated C-reactive protein (CRP), IL-6 IL-10 in femoral venous blood [83]. Chronic alcohol consumption increases intestinal permeability with a subsequent entry of pathogens into the bloodstream, increasing endotoxemia which may precede the development and progression to alcoholic liver disease [84].

Moreover, chronic alcohol consumption in animal models revealed a decrease of miR181b-3p in the liver. Importantly, miR181b-3p binds to importin  $\alpha$ 5 and regulates TLR4 pathway signaling resulting in increased signaling of the NF- $\kappa$ B inflammatory pathway [85]. Moreover, an increase in miR-155 was found at the central level [86], which regulates the adaptor protein MyD88 of the NF- $\kappa$ B signaling pathway [87]. Several alterations in the immune system were described in the brain, such as infiltration of leukocytes and microglia

activation in the cortex [17]. Similarly, in post-mortem brain samples, another study reported increased IBA1 and Glut5 microglia positive cells in the cingulate cortex, while Glut5 positive microglial cells were also found in the midbrain VTA regions [88]. Furthermore, another study showed elevated protein levels of TLR7, high mobility group box-1 HMGB1, and CD11b in the hippocampus of alcoholic patients, highlighting the relation of TLR7 gene expression with years of alcohol consumption [16].

Changes in gene and protein expression in different brain areas were found in several markers of neuroinflammation, including proinflammatory cytokines. The most studied were TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , or MCP-1. However, other cytokines or chemokines such as CXCL10, CX3CL1, CXCL2, IL-12, IL-18, IL-33 increased in animal models and humans [15,17,86,88-90]: while CCL4 expression was reduced [17]. Regarding other components of the immune system, an increase in TLR3 mRNA expression was detected 24 hours after the last alcohol consumption in the nucleus accumbens while decreased in the amygdala together with TLR4.

Some contradictory results were found in a series of neuroimaging studies. While rat and non-human primate studies increased TSPO binding activity [91,92], human studies show a reduction [91,93,94]. These differences could be because human studies were conducted with addicts of several years in withdrawal, at different time points starting from 2 days post-withdrawal up to a month. Other factors such as the consumption of other drugs may interfere with the results observed [95].

Altogether, these findings suggest a generalized inflammation after chronic alcohol consumption in both, periphery and brain (Table 3).

### 2.3 Withdrawal

[Table 4. Alcohol Use Disorder. Alcohol Withdrawal.]

In the alcohol withdrawal phase, a decrease in proinflammatory cytokines, together with an increase of anti-inflammatory ones, was found after a few days of the cessation of consumption [70]. Furthermore, in patients with Alcoholic Liver Disease, CCL18 expression was increased after one week in adipose tissue [96]. This chemokine induces an M2 macrophage phenotype [97] related to an anti-inflammatory response [98]. Therefore, these findings suggest that the inflammatory effect of alcohol begins to revert rapidly when alcohol consumption stops.

These changes were also found up to one month after the cessation of alcohol consumption [99]. Consistently with previous findings, Advanced glycation end products (AGE) remain elevated one month after termination of consumption [100] and well as decreases in Clara Cell secretory protein (CC16) [99], a protein with anti-inflammatory properties, postulated as a biomarker in several lung diseases [101]. Therefore, improving inflammatory parameters may provide a basis for detecting relapses in patients undergoing alcohol withdrawal in the short-medium term. However, it would be necessary to investigate the potential of inflammatory biomarkers in more prolonged detoxification and predict patients susceptible to delirium tremens due to alcohol withdrawal, which could compromise their lives (Table 4).

## 2.4 Alcoholic Liver Disease

[Table 5. Alcohol Use Disorder. Alcohol Liver Disease.]

One of the most visible consequences of chronic, long-term consumption of large amounts of alcohol is the progression to liver disease (ALD). The disease progresses from initial stages with fatty liver, which in many cases is reversible, to liver inflammation, and finally loss of function due to liver fibrosis or cirrhosis.

Alterations in the levels of TNF- $\alpha$  and HSP70 [102] were found in HSP70 from the early stages of AML. It is a well-known DAMP associated with low-grade inflammation. This low-grade inflammation can be measured by High-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), with a lower threshold than conventional CRP. Furthermore, the values of hsCRP correlate positively with markers of hepatic dysfunction [103].

Additionally, in an animal model of binge and escalating alcohol exposure, levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , together with IL-10, were increased [104]. At the same time, IL-10 decreased after 12 weeks, indicating an imbalance in the level of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines that concurred with the appearance of liver fibrosis.

A study with patients positively correlated the values of soluble suppression of tumorigenesis-2 (sST2) with IL-6, IL-1 $\beta$ , the severity of the Child-Pugh scale, and the Maddrey test score used to discriminate the severity of alcoholic hepatitis. Interestingly, this study did not show an elevation in IL-33 levels [105]; IL-33 is the ligand of ST2. It should be noted that the measurement of sST2 is postulated as a prognostic biomarker in heart failure [106].

As for the progression of fibrosis already established and other types of biomarkers that could assess prognosis, an increase of



YKL40 was found, a molecule involved in the maturation of monocytes to macrophages linked to inflammation and fibrosis development [107]. In addition, in terms of survival rates, a decrease in Treg lymphocytes and an increase in Th17 lymphocytes were observed in non-surviving patients after admission for alcoholic liver disease. In the same study, an increase in IL-17a, IL-1 $\beta$ , and IL-6 was found, increasing IL-6 being a diagnostic and prognostic biomarker to the fatal ALD [108]. Accordingly, patients with a level of IL-6 $\geq$ 38.66 pg/ml [109] at hospital admission had significantly elevated mortality than those with low levels. Also, IFN- $\gamma$  with antifibrotic effects decreased in patients with higher long-term mortality in AAH [110].

Furthermore, in the liver of a mouse animal model of ALD, there was an increase of gene expression of pattern recognition receptors such as TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, and TLR9 [111]. An increase of microglia in the subventricular zone (SVZ), the superior frontal gyrus (SFG), and increased levels of IL-6 in the pericallosal gyrus (PCG) [112] were found in post-mortem samples of alcoholic patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy.

On the other hand, some studies suggested that the severity of acute alcoholic hepatitis can be assessed with the sCD163 protein [113], associated with the activation of macrophages and the titer of antibodies against p. gingivalis 33277 and w38 [114], suggesting an increase in endotoxemia.

Therefore, in liver disease, due to prolonged and heavy alcohol consumption, potential biomarkers that assess and reflect the dynamism and progression of the disease based on inflammatory markers are observed and may establish the basis for future research (Table 5).

### 3. Opioid use disorder

Opioid use disorder is a social warming epidemic that affects more than 16 million people and causes more than 120,000 deaths per year worldwide [115]. Diagnosis is based on the American Psychiatric Association's DSM-5. It includes, among others, an intense craving for opioids, continued opioid use despite associated social, physical, or psychological problems, the presence of tolerance, and the presence of withdrawal. Heroin represents the classical opioid of abuse, but other opioids derived from medical use include morphine, codeine, fentanyl, and synthetic opioids such as tramadol and oxycodone [115].

Opioids can interfere with the immune system by participating in immune cell function and modulating innate and acquired immune responses [116]. One of the significant concerns

related to chronic opioid use is the development of immunosuppression, thereby increasing the risk of chronic disease and infection [116]. Indeed, recent data suggest that the effect on immune function is much more complicated. Opioids act as biological response modifiers, and their actions are highly contextual, plastic, adaptable, and influenced by other processes or pathophysiological conditions. In particular, emerging growing evidence points to neuroinflammation as crucial for the addictive process [117]. To clarify the role of inflammation on opioid addiction and the potential use of inflammatory biomarkers in this disorder, we mainly focused on reports investigating the effects of opioids in chronic exposure and the context of addiction. We discarded reports related to inflammation-modulatory roles of opioids in pain or analgesia and other conditions.

### 3.1 Acute opioid administration

[Table 6. Opioid Use Disorder. Acute administration.]

Acute opioid administration has been related to several immune alterations. However, its relation to the future development of addiction and the time-course modifications that occur with prolonged administration have been sparsely investigated. Interestingly, in this context, an essential role for the anti-inflammatory cytokine IL-10 has been described. Morphine administration activated glia in the rat nucleus accumbens (NAc), concomitant with an increase in CRP, IFN- $\gamma$ , CXCL9, CCL11, CCL12, CCL25, CCL17, CCL4, CCR4, and IL-10 expression and a decrease in CX3CL1 (fraktaline) [118]. Neonatal handling and pharmacological inhibition of glia in adulthood induced by ibudilast significantly increased baseline expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the NAc. This action attenuated morphine-induced glial activation, cytokine/chemokine expression and prevented future morphine addiction in adulthood after morphine exposure. This supports the fact that IL-10 may be precisely related to this mechanism and therefore be used as a potential marker in animal studies or post-mortem brains. In line with this, it was found that IL-10 mRNA expression within the NAcc negatively correlated with increased risk of drug-induced reinstatement of Conditioned Place Preferences (CPP), suggesting a protective role for this specific cytokine against morphine-induced glial reactivity and drug-induced reinstatement of morphine CPP.

Moreover, the authors did not find a peripheral immune activation, as levels of peripheral IL-1 $\beta$  were not affected,

whereas IL-10 significantly increased in the periphery. However, in contrast to CNS, handled rats showed decreased peripheral IL-10 levels [118]. Similarly, acute morphine administration did not change serum IL-1 $\beta$ , IL-6, unlike 6 days of morphine administration [119]. In contrast to chronic administration, acute morphine administration also increased IL-1 $\beta$  levels in several brain regions, including the striatum, hippocampus, and TNF $\alpha$  in the cortex [120]. Interestingly, chronic pain is accompanied by a proinflammatory profile. Several results point out that these patients have an increased risk of developing opioid addiction [121]. Notably, basal differences in immune mediators related to the concomitant pathology and individuals may play an essential role in the development of addiction, which should be considered. Overall, these data suggest that acute opioid administration has different immunomodulatory effects in the periphery and CNS, influencing future addictive behavior. However, there is still a lack of information regarding how acute opioid use and its interaction with the immune system relates to addictive behavior development (Table 6).

### 3.2 Chronic opioid administration

[Table 7. Opioid Use Disorder. Chronic administration.]

Chronic use of opioids produces dependence, tolerance, and addiction, mediated by immune dysregulation (Table 7). Chronic opioid administration upregulates peripheral IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , CRP, and IL-17A [119,122,123]. Moreover, opioid exposure in the prenatal period can impact the peripheral inflammatory profile after birth, as shown by increased serum levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , and CXCL1, with IL-1 $\beta$  remaining increased over a month. Moreover, isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) increased basal TNF $\alpha$  release as well as increased LPS-induced TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  release, showing that prenatal opioid exposure can reprogram the immune system to sustained peripheral activation and reactivity [124]. In the central nervous system, several studies demonstrated that microglial activation occurs in the context of opioid addiction [125,126], and recent evidence suggests that activated glia, including astrocyte and microglia, play an essential role in opioid addiction. For example, it has been shown that astrocyte is involved in dependence induced by repeated morphine treatment [127] and microglia in the NAc in the acquisition and maintenance, although not expression, of morphine-induced reward in the CPP [128]. Consistently, glial inhibitors decrease opioid addiction and physical

dependence [118,128,129]. Transcriptomics and metabolomics analysis related chronic opioid exposure with upregulation of inflammatory pathways in the brain [130,131], further demonstrating the involvement of inflammation in opioid addiction.

The release of proinflammatory cytokines in the CNS was associated with addictive behavior. In particular, in the NAc, a significant upregulation of IL-6, TNF $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  [119,132], and IL-6 and IL-1 $\beta$  in mPFC [119] were found. Moreover, TLR2 and TLR4 expression are increased after chronic opioid administration in the NAc in rodents [132,133], whereas NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$ , and IL-6 are upregulated in whole-brain homogenate after chronic tramadol exposure [122]. Accordingly, other studies found that chronic morphine administration induces the expression of the chemokine CCL5 in the cortex and striatum [120] and CXCL12 in VTA, which has been related to the acquisition and maintenance of morphine-induced conditioned place preference (CPP) [134]. However, some contradictory results have also reported that chronic morphine administration did not increase mRNA levels of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the cortex, striatum, and hippocampus, whereas IL-1 $\beta$  was downregulated in the cortex [120]. Additionally, an essential role of IL-10 has been further demonstrated by Lacagnina et al. This author showed that intracranial administration of IL-10 into the NAc reduces remifentanyl self-administration by suppressing proinflammatory cytokine and chemokine gene expression [133].

Human studies also revealed several immunological alterations in the context of Opioid Use Disorder (OUD). Opioid addicts have increased plasma levels of sCD40L, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , IL-8, and CRP, complement factor C3 and C4 [135-138]. Interestingly, increased levels of TNF $\alpha$  and IL-8 were positively correlated with years of using heroin [138].

On the other hand, total antioxidant capacity (TAC) was positively and significantly correlated to nitric oxide production in opium smokers, again suggesting a regulatory response occurring in opium addicts to control the inflammation [137]. Additional reports have described increased inflammation in opioid addicts, together with increased white blood cell count, neutrophil count, and neutrophil percentage, while lymphocyte percentage and basophils count were significantly low [139]. Heroin abusers show adaptive immunity alterations as seen by chronic B cell activation and increased total B cells [136]. Moreover, peripheral blood leukocytes (PBL) in heroin addicts showed enhanced spontaneous production of IL-6, whereas

stimulation of PBL with con-A increased IL-10 release and proliferative activity compared to controls [140]

Identifying inflammatory biomarkers of opioid addiction in the human brain is less advanced, but recent reports are bringing out the importance of immune response dysregulation. For example, a profound inflammatory profile is found in the heroin-related human post-mortem brain, as shown by increased expression of IL-15, CD68, TNF- $\alpha$ , IL-6, COX-2, and HSP-70, especially in the brainstem [141]. Consistently, a recent report revealed that, in post-mortem samples of midbrain from opioid-induced death patients, the most dysregulated gene module was firebrick3, highly enriched in inflammatory and immunomodulatory genes [142]. Additionally, a large transcriptomic study in post-mortem brains of OUD patients further revealed the importance of neuroinflammation in this disorder. They focused on the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) and nucleus accumbens (NAc). They found that the top activated upstream regulators in DLPFC were TNF, IL1 $\beta$ , and NF- $\kappa$ B in the DLPFC, whereas IL1 $\beta$  was one of the top-activated upstream regulators in NAc. Moreover, this study revealed direct links between neuroinflammation, risky behavior, and OUD, suggesting that neuroinflammatory pathways may ultimately drive drug-seeking in OUD [143]. In addition, a recent report identified IL4 and PECAM1 as potential biomarkers for opioid use disorder [144].

### 3.3 Opioid withdrawal

[Table 8. Opioid Use Disorder. Opioid Withdrawal.]

Data obtained from rodents suggest an increase in inflammatory mediators in the brain during the withdrawal period, associated with the severity of withdrawal behavior. For example, a recent report measured gene expression in astrocytes, microglia, and neurons in the central amygdala (CeA) of control, morphine-dependent, and withdrawal rats. They found inflammatory genes, such as Cxcr1, Tlr2, Tnf, and Tnfrsf1a, to be upregulated in the morphine group. However, chronic morphine exposure did not substantially influence the transcriptional state, but morphine withdrawal did. In particular, a significant upregulation of neuroinflammatory genes, notably Tnf, occurred in the withdrawal condition in all three cell types, with astrocytes showing the most profound shift [145]. Another study found an up-regulation of inflammatory cytokines and microglia proliferation in withdrawal conditions compared to morphine-dependent conditions. In particular, withdrawal increases IL-1 $\beta$  in the

hippocampus and striatum and TNF- $\alpha$  in the striatum, reducing CCL5 in the frontal cortex. In contrast with morphine-dependent conditions, no changes were observed [120]. Interestingly, increased hippocampal levels of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  were linked to the severity of withdrawal behavior. These changes were also associated with cortisol levels related to stress and anxiety during withdrawal [146]. Furthermore, another study consistently found elevated hippocampal IL-1 $\beta$  expression associated with withdrawal behavior severity [147]. Besides, morphine withdrawal induces TNF $\alpha$  release and neuronal TNF-receptor 1 activation, which were involved in behavioral modifications during withdrawal [148]. Additionally, the treatment with venlafaxine inhibited withdrawal behavior and inhibited the up-regulation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 induced by withdrawal. Interestingly, venlafaxine failed to affect the brain with the increased concentrations of IL-10, suggesting that withdrawal is dependent on proinflammatory cytokines [149]. The involvement of neuroinflammation arises because the glial inhibitor ibudilast inhibits withdrawal behavior [150].

In patients, data from withdrawal periods were collected in the context of methadone-maintenance therapy (MMT), where several studies show association with changes in the inflammatory profile. Opioid addicts under MMT significantly increased plasma IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8 compared to healthy subjects. Interestingly, TNF $\alpha$  was not increased, but both TNF $\alpha$  and IL-6 levels were significantly correlated with the daily methadone dosage administered and IL-1 $\beta$  with the duration of methadone maintenance treatment [151]. Several studies have shown that MMT significantly reduces plasma levels of TNF- $\alpha$ , CRP, IL-6, and TGF- $\beta$ 1 [135] [152]. Additionally, MMT significantly increased cognitive abilities in opioid addicts associated with changes in inflammatory markers. For instance, TNF- $\alpha$  levels negatively correlate with the visual memory index and IL-6 levels with the verbal memory index [152]. Another study consistently found that CRP and TGF- $\beta$ 1 decreased during MMT, although in this case, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , and IL-6 did not change.

Interestingly, the authors found a significantly positive correlation between plasma IL-6 levels and MMT outcomes, including the severity of heroin addiction and patient adherence to MMT [153]. Another study used dextromethorphan (D.M.) as co-adjuvant therapy of MMT and found that TNF $\alpha$ , IL-8, and opioid dependence significantly decreased after 12 weeks of MMT-DM but not in MMT-Placebo patients. Moreover, methadone required dose increased in MMT-Placebo and decreased in MMT-DM, suggesting that patients become tolerant to methadone when

used alone. The persistence of those cytokines may be associated with the maintained dependence and development of tolerance [138]. Accordingly, a subsequent study of the effects of D.M. found a higher reduction in TNF $\alpha$ , but not in IL-8, IL-6, and CRP, in MMT-DM compared to MMT-Placebo. Moreover, dextromethorphan decreased the rate of treatment withdrawal [154]. Additionally, MMT patients with comorbid pain show elevated IFN- $\gamma$  and higher rates of continued opioid abuse [155]. Opioid addicts under MMT also maintained enhanced IL-6 release by Peripheral Blood Leukocytes. In contrast, the increased production of IL-2, IFN $\gamma$ , and IL-10 after stimulation was normalized by MMT [140]. These data suggest that several immunological alterations accompany opioid addiction and that neuroinflammation plays an important role in opioid dependence and relapse. Notably, a different immunological profile occurs during acute and chronic opioid intake and withdrawal periods and in the periphery versus CNS. Available data suggest that IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  have an essential role in the brain in regulating withdrawal behavior, thus prompting relapse. Moreover, peripheral levels of TNF $\alpha$  and IL-6 may serve as good predictors for MMT outcomes, although more research is needed. Interventions targeting inflammation arise as potential treatments for opioid addiction (Table 8).

## Conclusions

As discussed in the review, several cytokines, acute-phase proteins, and other immune system mediators reflect how substance use produces both peripheral and central inflammatory alterations. There are no good psychiatric biomarkers to support the diagnosis and treatment of substance use disorders. The immune system offers dynamism and complexity, which could reflect the different phases of substance abuse. There is currently a lack of knowledge about the precise alterations at each phase. Therefore, new studies should elucidate the complexity of these variations to be used in routine clinical practice. Further translational studies are needed to avoid biases associated with poly-consumption or the existence of dual pathology.

In conclusion, the use of inflammatory biomarkers in addiction disorders is a promising strategy to reflect the complexity of addictive processes.

## 7. Limitations of the Review

Nonetheless, the results included in the present review should be interpreted with caution due to some limitations. The selected articles were Open Access or covered by CSIC or UMH

institutions. Therefore, some articles met our selection criteria, but we were unable to access the full version of the article, and these articles were not included as a result. In addition, several of the studies that were reviewed did not take into account differences in gender, age, or associated comorbidities. Finally, there is no specific information on the duration, magnitude, and drug consumption patterns in many experimental paradigms. Thus, future studies taking all of these variables into consideration are necessary in order to extract more precise information.

#### **Figure legends:**

**Figure 1 – Graphical abstract.** Substance use disorders are associated with alterations in various immune markers. These alterations can be measured and associated with the different stages of the addictive process, providing promising biomarkers to aid in diagnosing and treating this set of psychiatric diseases.

**Author Contributions:** AM and TF designed, coordinated, and reviewed the sections and contents of the review manuscript. AM oversaw the organization to distribute the writing tasks among the authors and participated in article writing. AM, FN, and EN performed the literature searches. AM, FN, EN, JM, and TF participated in the manuscript writing. All the authors critically reviewed and approved the final version of the manuscript.

**Funding:** The preparation of the manuscript was supported by “Instituto de Salud Carlos III, Fondos FEDER, Red de Trastornos Adictivos” (RTA, RD16/0017/0014 to J.M.), “Ministerio de Sanidad, Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas” (PNSD, 2019I012 to J.M.), and “Ministerio de Ciencia e Innovación programa Ramón y Cajal” (RYC201722666 to T.F).

#### **Acknowledgments**

We thank Sergio Javaloy for his excellent assistance in the graphical design.

#### **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest.



## References

- 1 Churchward MA, Michaud ER, Todd KG. Supporting microglial niches for therapeutic benefit in psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **2019**, *94*, 109648, doi:10.1016/j.pnpbp.2019.109648.
- 2 Jones KA, Thomsen C. The role of the innate immune system in psychiatric disorders. *Mol Cell Neurosci*. **2013**, *53*, 52-62, doi:10.1016/j.mcn.2012.10.002.
- 3 Nennig SE, Schank JR. The Role of NFkB in Drug Addiction: Beyond Inflammation. *Alcohol Alcohol*. **2017**, *52*, 172-79, doi:10.1093/alcalc/agw098.
- 4 Yang XP, Albrecht U, Zakowski V, Sobota RM, Haussinger D, Heinrich PC, et al. Dual function of interleukin-1beta for the regulation of interleukin-6-induced suppressor of cytokine signaling 3 expression. *J Biol Chem*. **2004**, *279*, 45279-89, doi:10.1074/jbc.M313072200.
- 5 Wilke CM, Wei S, Wang L, Kryczek I, Kao J, Zou W. Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon-gamma. *Cancer Immunol Immunother*. **2011**, *60*, 1529-41, doi:10.1007/s00262-011-1104-5.
- 6 Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. **2010**, *10*, 826-37, doi:10.1038/nri2873.
- 7 Franklin TC, Xu C, Duman RS. Depression and sterile inflammation: Essential role of danger associated molecular patterns. *Brain Behav Immun*. **2018**, *72*, 2-13, doi:10.1016/j.bbi.2017.10.025.
- 8 Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol*. **2015**, *33*, 257-90, doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112240.
- 9 Tancredi V, D'Antuono M, Cafe C, Giovedi S, Bue MC, D'Arcangelo G, et al. The inhibitory effects of interleukin-6 on synaptic plasticity in the rat hippocampus are associated with an inhibition of mitogen-activated protein kinase ERK. *J Neurochem*. **2000**, *75*, 634-43, doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0750634.x.
- 10 Schneider H, Pitossi F, Balschun D, Wagner A, del Rey A, Besedovsky HO. A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1998**, *95*, 7778-83, doi:10.1073/pnas.95.13.7778.
- 11 Crews FT, Walter TJ, Coleman LG, Jr., Vetreno RP. Toll-like receptor signaling and stages of addiction. *Psychopharmacology (Berl)*. **2017**, *234*, 1483-98, doi:10.1007/s00213-017-4560-6.
- 12 Namba MD, Leyrer-Jackson JM, Nagy EK, Olive MF, Neisewander JL. Neuroimmune Mechanisms as Novel Treatment Targets for Substance Use Disorders and Associated Comorbidities. *Front Neurosci*. **2021**, *15*, 650785, doi:10.3389/fnins.2021.650785.
- 13 Pascual M, Balino P, Alfonso-Loeches S, Aragon CM, Guerri C. Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. *Brain Behav Immun*. **2011**, *25 Suppl 1*, S80-91, doi:10.1016/j.bbi.2011.02.012.
- 14 Hutchinson MR, Northcutt AL, Hiranita T, Wang X, Lewis SS, Thomas J, et al. Opioid activation of toll-like receptor 4 contributes to drug reinforcement. *J Neurosci*. **2012**, *32*, 11187-200, doi:10.1523/JNEUROSCI.0684-12.2012.
- 15 McCarthy GM, Warden AS, Bridges CR, Blednov YA, Harris RA. Chronic ethanol consumption: role of TLR3/TRIF-dependent signaling. *Addict Biol*. **2018**, *23*, 889-903, doi:10.1111/adb.12539.
- 16 Coleman LG, Jr., Zou J, Crews FT. Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7. *J Neuroinflammation*. **2017**, *14*, 22, doi:10.1186/s12974-017-0799-4.

- 17 Alfonso-Loeches S, Urena-Peralta J, Morillo-Bargues MJ, Gomez-Pinedo U, Guerri C. Ethanol-Induced TLR4/NLRP3 Neuroinflammatory Response in Microglial Cells Promotes Leukocyte Infiltration Across the BBB. *Neurochem Res.* **2016**, *41*, 193-209, doi:10.1007/s11064-015-1760-5.
- 18 Garcia-Gutierrez MS, Navarrete F, Sala F, Gasparyan A, Austrich-Olivares A, Manzanares J. Biomarkers in Psychiatry: Concept, Definition, Types and Relevance to the Clinical Reality. *Front Psychiatry.* **2020**, *11*, 432, doi:10.3389/fpsy.2020.00432.
- 19 Volkow ND, Baler RD, Compton WM, Weiss SR. Adverse health effects of marijuana use. *The New England journal of medicine.* **2014**, *370*, 2219-27, doi:10.1056/NEJMra1402309.
- 20 Danovitch I, Gorelick DA. State of the art treatments for cannabis dependence. *The Psychiatric clinics of North America.* **2012**, *35*, 309-26, doi:10.1016/j.psc.2012.03.003.
- 21 UNODC. World Drug Report. **2021**,
- 22 Degenhardt L, Ferrari AJ, Calabria B, Hall WD, Norman RE, McGrath J, et al. The global epidemiology and contribution of cannabis use and dependence to the global burden of disease: results from the GBD 2010 study. *PloS one.* **2013**, *8*, e76635, doi:10.1371/journal.pone.0076635.
- 23 Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* **1993**, *365*, 61-5, doi:10.1038/365061a0.
- 24 Onaivi ES, Chaudhuri G, Abaci AS, Parker M, Manier DH, Martin PR, et al. Expression of cannabinoid receptors and their gene transcripts in human blood cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **1999**, *23*, 1063-77, doi:10.1016/s0278-5846(99)00052-4.
- 25 Almogi-Hazan O, Or R. Cannabis, the Endocannabinoid System and Immunity-the Journey from the Bedside to the Bench and Back. *Int J Mol Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21124448.
- 26 Lima MG, Tardelli VS, Brietzke E, Fidalgo TM. Cannabis and Inflammatory Mediators. *Eur Addict Res.* **2021**, *27*, 16-24, doi:10.1159/000508840.
- 27 Miller HP, Bonawitz SC, Ostrovsky O. The effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on inflammation: A review. *Cell Immunol.* **2020**, *352*, 104111, doi:10.1016/j.cellimm.2020.104111.
- 28 Klein TW, Lane B, Newton CA, Friedman H. The cannabinoid system and cytokine network. *Proc Soc Exp Biol Med.* **2000**, *225*, 1-8, doi:10.1046/j.1525-1373.2000.22501.x.
- 29 Verhoeckx KC, Korthout HA, van Meeteren-Kreikamp AP, Ehlert KA, Wang M, van der Greef J, et al. Unheated Cannabis sativa extracts and its major compound THC-acid have potential immuno-modulating properties not mediated by CB1 and CB2 receptor coupled pathways. *Int Immunopharmacol.* **2006**, *6*, 656-65, doi:10.1016/j.intimp.2005.10.002.
- 30 Klein TW. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol.* **2005**, *5*, 400-11, doi:10.1038/nri1602.
- 31 Baldwin GC, Tashkin DP, Buckley DM, Park AN, Dubinett SM, Roth MD. Marijuana and cocaine impair alveolar macrophage function and cytokine production. *Am J Respir Crit Care Med.* **1997**, *156*, 1606-13, doi:10.1164/ajrccm.156.5.9704146.
- 32 Roth MD, Arora A, Barsky SH, Kleerup EC, Simmons M, Tashkin DP. Airway inflammation in young marijuana and tobacco smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* **1998**, *157*, 928-37, doi:10.1164/ajrccm.157.3.9701026.
- 33 Bailey KL, Wyatt TA, Katafiasz DM, Taylor KW, Heires AJ, Sisson JH, et al. Alcohol and cannabis use alter pulmonary innate immunity. *Alcohol.* **2019**, *80*, 131-38, doi:10.1016/j.alcohol.2018.11.002.
- 34 Keen L, 2nd, Pereira D, Latimer W. Self-reported lifetime marijuana use and interleukin-6 levels in middle-aged African Americans. *Drug Alcohol Depend.* **2014**, *140*, 156-60, doi:10.1016/j.drugalcdep.2014.04.011.

- 35 Ribeiro CB, Castro FOF, Dorneles GP, de Sousa Barros JB, Silva JM, Tavares C, et al. The concomitant use of cannabis and cocaine coexists with increased LPS levels and systemic inflammation in male drug users. *Cytokine*. **2021**, *141*, 155472, doi:10.1016/j.cyto.2021.155472.
- 36 Keen L, 2nd, Turner AD. Association between interleukin-6 and neurocognitive performance as a function of self-reported lifetime marijuana use in a community based sample of African American adults. *J Int Neuropsychol Soc*. **2014**, *20*, 773-83, doi:10.1017/S1355617714000691.
- 37 Keen L, 2nd, Turner AD. Differential effects of self-reported lifetime marijuana use on interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor in African American adults. *J Behav Med*. **2015**, *38*, 527-34, doi:10.1007/s10865-015-9625-6.
- 38 Pacifici R, Zuccaro P, Farre M, Poudevida S, Abanades S, Pichini S, et al. Combined immunomodulating properties of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and cannabis in humans. *Addiction*. **2007**, *102*, 931-6, doi:10.1111/j.1360-0443.2007.01805.x.
- 39 Massi P, Sacerdote P, Ponti W, Fuzio D, Manfredi B, Vigano D, et al. Immune function alterations in mice tolerant to delta9-tetrahydrocannabinol: functional and biochemical parameters. *J Neuroimmunol*. **1998**, *92*, 60-6, doi:10.1016/s0165-5728(98)00177-5.
- 40 Moretti S, Castelli M, Franchi S, Raggi MA, Mercolini L, Protti M, et al. Delta(9)-Tetrahydrocannabinol-induced anti-inflammatory responses in adolescent mice switch to proinflammatory in adulthood. *J Leukoc Biol*. **2014**, *96*, 523-34, doi:10.1189/jlb.3HI0713-406RR.
- 41 Moretti S, Franchi S, Castelli M, Amodeo G, Somaini L, Panerai A, et al. Exposure of Adolescent Mice to Delta-9-Tetrahydrocannabinol Induces Long-Lasting Modulation of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Hypothalamus and Hippocampus Similar to that Observed for Peripheral Macrophages. *J Neuroimmune Pharmacol*. **2015**, *10*, 371-9, doi:10.1007/s11481-015-9592-2.
- 42 Zamberletti E, Gabaglio M, Prini P, Rubino T, Parolaro D. Cortical neuroinflammation contributes to long-term cognitive dysfunctions following adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol treatment in female rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. **2015**, *25*, 2404-15, doi:10.1016/j.euroneuro.2015.09.021.
- 43 Cloak CC, Alicata D, Ernst TM, Chang L. Psychiatric Symptoms, Salivary Cortisol and Cytokine Levels in Young Marijuana Users. *J Neuroimmune Pharmacol*. **2015**, *10*, 380-90, doi:10.1007/s11481-015-9606-0.
- 44 Bayazit H, Selek S, Karababa IF, Cicek E, Aksoy N. Evaluation of Oxidant/Antioxidant Status and Cytokine Levels in Patients with Cannabis Use Disorder. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. **2017**, *15*, 237-42, doi:10.9758/cpn.2017.15.3.237.
- 45 Fernandez-Egea E, Scoriels L, Theegala S, Giro M, Ozanne SE, Burling K, et al. Cannabis use is associated with increased CCL11 plasma levels in young healthy volunteers. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **2013**, *46*, 25-8, doi:10.1016/j.pnpb.2013.06.011.
- 46 Rajavashisth TB, Shaheen M, Norris KC, Pan D, Sinha SK, Ortega J, et al. Decreased prevalence of diabetes in marijuana users: cross-sectional data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III. *BMJ Open*. **2012**, *2*, e000494, doi:10.1136/bmjopen-2011-000494.
- 47 Alshaarawy O, Anthony JC. Cannabis smoking and serum C-reactive protein: a quantile regressions approach based on NHANES 2005-2010. *Drug Alcohol Depend*. **2015**, *147*, 203-7, doi:10.1016/j.drugalcdep.2014.11.017.
- 48 Meier MH, Caspi A, Cerda M, Hancox RJ, Harrington H, Houts R, et al. Associations Between Cannabis Use and Physical Health Problems in Early Midlife: A Longitudinal Comparison of Persistent Cannabis vs Tobacco Users. *JAMA Psychiatry*. **2016**, *73*, 731-40, doi:10.1001/jamapsychiatry.2016.0637.

- 49 Ngueta G, Belanger RE, Laouan-Sidi EA, Lucas M. Cannabis use in relation to obesity and insulin resistance in the Inuit population. *Obesity (Silver Spring)*. **2015**, *23*, 290-5, doi:10.1002/oby.20973.
- 50 Alshaarawy O, Sidney S, Auer R, Green D, Soliman EZ, Goff DC, Jr., et al. Cannabis Use and Markers of Systemic Inflammation: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *Am J Med*. **2019**, *132*, 1327-34 e1, doi:10.1016/j.amjmed.2019.04.045.
- 51 Ferguson EG, Mannes ZL, Ennis N. Is marijuana use associated with lower inflammation? Results from waves III and IV of the national longitudinal study of adolescent to adult health. *Drug Alcohol Depend*. **2019**, *198*, 162-67, doi:10.1016/j.drugalcdep.2019.01.021.
- 52 Okafor CN, Li M, Paltzer J. Self-reported cannabis use and biomarkers of inflammation among adults in the United States. *Brain Behav Immun Health*. **2020**, *7*, doi:10.1016/j.bbih.2020.100109.
- 53 Costello EJ, Copeland WE, Shanahan L, Worthman CM, Angold A. C-reactive protein and substance use disorders in adolescence and early adulthood: a prospective analysis. *Drug Alcohol Depend*. **2013**, *133*, 712-7, doi:10.1016/j.drugalcdep.2013.08.027.
- 54 Ramsay H, Surcel HM, Bjornholm L, Kerkela M, Khandaker GM, Veijola J. Associations Between Maternal Prenatal C-Reactive Protein and Risk Factors for Psychosis in Adolescent Offspring: Findings From the Northern Finland Birth Cohort 1986. *Schizophr Bull*. **2021**, *47*, 766-75, doi:10.1093/schbul/sbaa152.
- 55 Da Silva T, Hafizi S, Watts JJ, Weickert CS, Meyer JH, Houle S, et al. In Vivo Imaging of Translocator Protein in Long-term Cannabis Users. *JAMA Psychiatry*. **2019**, *76*, 1305-13, doi:10.1001/jamapsychiatry.2019.2516.
- 56 Notter T, Schalbetter SM, Clifton NE, Mattei D, Richetto J, Thomas K, et al. Neuronal activity increases translocator protein (TSPO) levels. *Mol Psychiatry*. **2021**, *26*, 2025-37, doi:10.1038/s41380-020-0745-1.
- 57 Lisano JK, Smith JD, Mathias AB, Christensen M, Smoak P, Phillips KT, et al. Performance and Health-Related Characteristics of Physically Active Males Using Marijuana. *J Strength Cond Res*. **2019**, *33*, 1658-68, doi:10.1519/JSC.0000000000002238.
- 58 Lisano JK, Kisiolek JN, Smoak P, Phillips KT, Stewart LK. Chronic cannabis use and circulating biomarkers of neural health, stress, and inflammation in physically active individuals. *Appl Physiol Nutr Metab*. **2020**, *45*, 258-63, doi:10.1139/apnm-2019-0300.
- 59 Collaborators GBDA. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. **2018**, *392*, 1015-35, doi:10.1016/S0140-6736(18)31310-2.
- 60 American Psychiatric Association., American Psychiatric Association. DSM-5 Task Force. Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5. 5th ed. American Psychiatric Association: Washington, D.C.; 2013.
- 61 Connor JP, Haber PS, Hall WD. Alcohol use disorders. *The Lancet*. **2016**, *387*, 988-98, doi:10.1016/S0140-6736(15)00122-1.
- 62 Saunders JB, Aasland OG, Babor TF, de la Fuente JR, Grant M. Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption--II. *Addiction*. **1993**, *88*, 791-804, doi:10.1111/j.1360-0443.1993.tb02093.x.
- 63 Torruellas C, French SW, Medici V. Diagnosis of alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. **2014**, *20*, 11684-99, doi:10.3748/wjg.v20.i33.11684.
- 64 Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*. **1973**, *60*, 646-9, doi:10.1002/bjs.1800600817.
- 65 Chung T, Creswell KG, Bachrach R, Clark DB, Martin CS. Adolescent Binge Drinking. *Alcohol Res*. **2018**, *39*, 5-15, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30557142>

- 66 Bala S, Marcos M, Gattu A, Catalano D, Szabo G. Acute binge drinking increases serum endotoxin and bacterial DNA levels in healthy individuals. *PloS one*. **2014**, *9*, e96864, doi:10.1371/journal.pone.0096864.
- 67 Zhou C, Zhao J, Li J, Wang H, Tang C. Acute ethanol administration inhibits Toll-like receptor 4 signaling pathway in rat intestinal epithelia. *Alcohol*. **2013**, *47*, 231-9, doi:10.1016/j.alcohol.2013.01.003.
- 68 Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. **2010**, *140*, 805-20, doi:10.1016/j.cell.2010.01.022.
- 69 Amin PB, Diebel LN, Liberati DM. Dose-dependent effects of ethanol and E. coli on gut permeability and cytokine production. *J Surg Res*. **2009**, *157*, 187-92, doi:10.1016/j.jss.2008.10.028.
- 70 Gonzalez-Quintela A, Dominguez-Santalla MJ, Perez LF, Vidal C, Lojo S, Barrio E. Influence of acute alcohol intake and alcohol withdrawal on circulating levels of IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12. *Cytokine*. **2000**, *12*, 1437-40, doi:10.1006/cyto.2000.0715.
- 71 Li M, He Y, Zhou Z, Ramirez T, Gao Y, Gao Y, et al. MicroRNA-223 ameliorates alcoholic liver injury by inhibiting the IL-6-p47(phox)-oxidative stress pathway in neutrophils. *Gut*. **2017**, *66*, 705-15, doi:10.1136/gutjnl-2016-311861.
- 72 Afshar M, Richards S, Mann D, Cross A, Smith GB, Netzer G, et al. Acute immunomodulatory effects of binge alcohol ingestion. *Alcohol*. **2015**, *49*, 57-64, doi:10.1016/j.alcohol.2014.10.002.
- 73 Nejad C, Stunden HJ, Gantier MP. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. *FEBS J*. **2018**, *285*, 3695-716, doi:10.1111/febs.14482.
- 74 Matsui S, Ogata Y. Effects of miR-223 on expression of IL-1beta and IL-6 in human gingival fibroblasts. *J Oral Sci*. **2016**, *58*, 101-8, doi:10.2334/josnusd.58.101.
- 75 Ibanez F, Urena-Peralta JR, Costa-Alba P, Torres JL, Laso FJ, Marcos M, et al. Circulating MicroRNAs in Extracellular Vesicles as Potential Biomarkers of Alcohol-Induced Neuroinflammation in Adolescence: Gender Differences. *Int J Mol Sci*. **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21186730.
- 76 Glantz MD, Bharat C, Degenhardt L, Sampson NA, Scott KM, Lim CCW, et al. The epidemiology of alcohol use disorders cross-nationally: Findings from the World Mental Health Surveys. *Addict Behav*. **2020**, *102*, 106128, doi:10.1016/j.addbeh.2019.106128.
- 77 Vancampfort D, Hallgren M, Mugisha J, De Hert M, Probst M, Monsieur D, et al. The Prevalence of Metabolic Syndrome in Alcohol Use Disorders: A Systematic Review and Meta-analysis. *Alcohol Alcohol*. **2016**, *51*, 515-21, doi:10.1093/alcalc/agw040.
- 78 Vatsalya V, Gala KS, Mishra M, Schwandt ML, Umhau J, Cave MC, et al. Lower Serum Magnesium Concentrations are associated With Specific Heavy Drinking Markers, Pro-Inflammatory Response and Early-Stage Alcohol-associated Liver Injury section sign. *Alcohol Alcohol*. **2020**, *55*, 164-70, doi:10.1093/alcalc/agaa001.
- 79 Schaefer L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem*. **2014**, *289*, 35237-45, doi:10.1074/jbc.R114.619304.
- 80 Hietala J, Koivisto H, Latvala J, Anttila P, Niemela O. IgAs against acetaldehyde-modified red cell protein as a marker of ethanol consumption in male alcoholic subjects, moderate drinkers, and abstainers. *Alcohol Clin Exp Res*. **2006**, *30*, 1693-8, doi:10.1111/j.1530-0277.2006.00204.x.
- 81 Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*. **2006**, *311*, 17-58, doi:10.1007/3-540-32636-7\_2.
- 82 Laso FJ, Vaquero JM, Almeida J, Marcos M, Orfao A. Chronic alcohol consumption is associated with changes in the distribution, immunophenotype, and the inflammatory cytokine secretion profile of circulating dendritic cells. *Alcohol Clin Exp Res*. **2007**, *31*, 846-54, doi:10.1111/j.1530-0277.2007.00377.x.

- 83 Palmiere C, Augsburger M. The postmortem diagnosis of alcoholic ketoacidosis. *Alcohol Alcohol*. **2014**, *49*, 271-81, doi:10.1093/alcalc/agt177.
- 84 Keshavarzian A, Farhadi A, Forsyth CB, Rangan J, Jakate S, Shaikh M, et al. Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *J Hepatol*. **2009**, *50*, 538-47, doi:10.1016/j.jhep.2008.10.028.
- 85 Saikia P, Bellos D, McMullen MR, Pollard KA, de la Motte C, Nagy LE. MicroRNA 181b-3p and its target importin alpha5 regulate toll-like receptor 4 signaling in Kupffer cells and liver injury in mice in response to ethanol. *Hepatology*. **2017**, *66*, 602-15, doi:10.1002/hep.29144.
- 86 Lippai D, Bala S, Csak T, Kurt-Jones EA, Szabo G. Chronic alcohol-induced microRNA-155 contributes to neuroinflammation in a TLR4-dependent manner in mice. *PloS one*. **2013**, *8*, e70945, doi:10.1371/journal.pone.0070945.
- 87 Tang B, Xiao B, Liu Z, Li N, Zhu ED, Li BS, et al. Identification of MyD88 as a novel target of miR-155, involved in negative regulation of Helicobacter pylori-induced inflammation. *FEBS Lett*. **2010**, *584*, 1481-6, doi:10.1016/j.febslet.2010.02.063.
- 88 He J, Crews FT. Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Exp Neurol*. **2008**, *210*, 349-58, doi:10.1016/j.expneurol.2007.11.017.
- 89 Asatryan L, Khoja S, Rodgers KE, Alkana RL, Tsukamoto H, Davies DL. Chronic ethanol exposure combined with high fat diet up-regulates P2X7 receptors that parallels neuroinflammation and neuronal loss in C57BL/6J mice. *J Neuroimmunol*. **2015**, *285*, 169-79, doi:10.1016/j.jneuroim.2015.06.007.
- 90 Nkpaa KW, Adedara IA, Amadi BA, Wegwu MO, Farombi EO. Ethanol via Regulation of NF-kappaB/p53 Signaling Pathway Increases Manganese-Induced Inflammation and Apoptosis in Hypothalamus of Rats. *Biol Trace Elem Res*. **2019**, *190*, 101-08, doi:10.1007/s12011-018-1535-3.
- 91 Kim SW, Wiers CE, Tyler R, Shokri-Kojori E, Jang YJ, Zehra A, et al. Influence of alcoholism and cholesterol on TSPO binding in brain: PET [(11)C]PBR28 studies in humans and rodents. *Neuropsychopharmacology*. **2018**, *43*, 1832-39, doi:10.1038/s41386-018-0085-x.
- 92 Saba W, Goutal S, Auvity S, Kuhnast B, Coulon C, Kouyoumdjian V, et al. Imaging the neuroimmune response to alcohol exposure in adolescent baboons: a TSPO PET study using (18) F-DPA-714. *Addict Biol*. **2018**, *23*, 1000-09, doi:10.1111/adb.12548.
- 93 Hillmer AT, Sandiego CM, Hannestad J, Angarita GA, Kumar A, McGovern EM, et al. In vivo imaging of translocator protein, a marker of activated microglia, in alcohol dependence. *Mol Psychiatry*. **2017**, *22*, 1759-66, doi:10.1038/mp.2017.10.
- 94 Kalk NJ, Guo Q, Owen D, Cherian R, Erritzoe D, Gilmour A, et al. Decreased hippocampal translocator protein (18 kDa) expression in alcohol dependence: a [(11)C]PBR28 PET study. *Transl Psychiatry*. **2017**, *7*, e996, doi:10.1038/tp.2016.264.
- 95 Kohno M, Link J, Dennis LE, McCready H, Huckans M, Hoffman WF, et al. Neuroinflammation in addiction: A review of neuroimaging studies and potential immunotherapies. *Pharmacol Biochem Behav*. **2019**, *179*, 34-42, doi:10.1016/j.pbb.2019.01.007.
- 96 Voican CS, Njike-Nakseu M, Boujedidi H, Barri-Ova N, Bouchet-Delbos L, Agostini H, et al. Alcohol withdrawal alleviates adipose tissue inflammation in patients with alcoholic liver disease. *Liver Int*. **2015**, *35*, 967-78, doi:10.1111/liv.12575.
- 97 Schraufstatter IU, Zhao M, Khaldoyanidi SK, Discipio RG. The chemokine CCL18 causes maturation of cultured monocytes to macrophages in the M2 spectrum. *Immunology*. **2012**, *135*, 287-98, doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03541.x.
- 98 Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol*. **2020**, *877*, 173090, doi:10.1016/j.ejphar.2020.173090.

- 99 Maes M, Lin A, Bosmans E, Vandoolaeghe E, Bonaccorso S, Kenis G, et al. Serotonin-immune interactions in detoxified chronic alcoholic patients without apparent liver disease: activation of the inflammatory response system and lower plasma total tryptophan. *Psychiatry Res.* **1998**, *78*, 151-61, doi:10.1016/s0165-1781(98)00010-9.
- 100 Kalousova M, Zima T, Popov P, Spacek P, Braun M, Soukupova J, et al. Advanced glycation end-products in patients with chronic alcohol misuse. *Alcohol Alcohol.* **2004**, *39*, 316-20, doi:10.1093/alcalc/agh058.
- 101 Broeckaert F, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clin Exp Allergy.* **2000**, *30*, 469-75, doi:10.1046/j.1365-2222.2000.00760.x.
- 102 Qu BG, Wang H, Jia YG, Su JL, Wang ZD, Wang YF, et al. Changes in tumor necrosis factor-alpha, heat shock protein 70, malondialdehyde, and superoxide dismutase in patients with different severities of alcoholic fatty liver disease: a prospective observational study. *Medicine (Baltimore).* **2015**, *94*, e643, doi:10.1097/MD.0000000000000643.
- 103 Mortensen C, Andersen O, Krag A, Bendtsen F, Moller S. High-sensitivity C-reactive protein levels predict survival and are related to haemodynamics in alcoholic cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **2012**, *24*, 619-26, doi:10.1097/MEG.0b013e328351db6e.
- 104 Zhou JY, Jiang ZA, Zhao CY, Zhen Z, Wang W, Nanji AA. Long-term binge and escalating ethanol exposure causes necroinflammation and fibrosis in rat liver. *Alcohol Clin Exp Res.* **2013**, *37*, 213-22, doi:10.1111/j.1530-0277.2012.01936.x.
- 105 Sun Z, Chang B, Huang A, Hao S, Gao M, Sun Y, et al. Plasma levels of soluble ST2, but not IL-33, correlate with the severity of alcoholic liver disease. *J Cell Mol Med.* **2019**, *23*, 887-97, doi:10.1111/jcmm.13990.
- 106 Aimo A, Januzzi JL, Jr., Bayes-Genis A, Vergaro G, Sciarrone P, Passino C, et al. Clinical and Prognostic Significance of sST2 in Heart Failure: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol.* **2019**, *74*, 2193-203, doi:10.1016/j.jacc.2019.08.1039.
- 107 Tran A, Benzaken S, Saint-Paul MC, Guzman-Granier E, Hastier P, Pradier C, et al. Chondrex (YKL-40), a potential new serum fibrosis marker in patients with alcoholic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **2000**, *12*, 989-93, doi:10.1097/00042737-200012090-00004.
- 108 Kasztelan-Szczerbinska B, Surdacka A, Celinski K, Rolinski J, Zwolak A, Miacz S, et al. Prognostic Significance of the Systemic Inflammatory and Immune Balance in Alcoholic Liver Disease with a Focus on Gender-Related Differences. *PloS one.* **2015**, *10*, e0128347, doi:10.1371/journal.pone.0128347.
- 109 Rachakonda V, Gabbert C, Raina A, Li H, Malik S, DeLany JP, et al. Stratification of risk of death in severe acute alcoholic hepatitis using a panel of adipokines and cytokines. *Alcohol Clin Exp Res.* **2014**, *38*, 2712-21, doi:10.1111/acer.12558.
- 110 Gonzalez-Reimers E, Sanchez-Perez MJ, Santolaria-Fernandez F, Abreu-Gonzalez P, De la Vega-Prieto MJ, Vina-Rodriguez J, et al. Changes in cytokine levels during admission and mortality in acute alcoholic hepatitis. *Alcohol.* **2012**, *46*, 433-40, doi:10.1016/j.alcohol.2011.10.001.
- 111 Gustot T, Lemmers A, Moreno C, Nagy N, Quertinmont E, Nicaise C, et al. Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology.* **2006**, *43*, 989-1000, doi:10.1002/hep.21138.
- 112 Dennis CV, Sheahan PJ, Graeber MB, Sheedy DL, Kril JJ, Sutherland GT. Microglial proliferation in the brain of chronic alcoholics with hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* **2014**, *29*, 1027-39, doi:10.1007/s11011-013-9469-0.
- 113 Sandahl TD, Gronbaek H, Moller HJ, Stoy S, Thomsen KL, Dige AK, et al. Hepatic macrophage activation and the LPS pathway in patients with alcoholic hepatitis: a

- prospective cohort study. *The American journal of gastroenterology*. **2014**, *109*, 1749-56, doi:10.1038/ajg.2014.262.
- 114 Zhou Y, Vatsalya V, Gobejishvili L, Lamont RJ, McClain CJ, Feng W. Porphyromonas gingivalis as a Possible Risk Factor in the Development/Severity of Acute Alcoholic Hepatitis. *Hepato Comm*. **2019**, *3*, 293-304, doi:10.1002/hep4.1296.
- 115 Gupta. AMDNKJM. Opioid Use Disorder. 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553166/>. Accessed 07/17/2021.
- 116 Liang X, Liu R, Chen C, Ji F, Li T. Opioid System Modulates the Immune Function: A Review. *Transl Perioper Pain Med*. **2016**, *1*, 5-13, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26985446>
- 117 Hofford RS, Russo SJ, Kiraly DD. Neuroimmune mechanisms of psychostimulant and opioid use disorders. *Eur J Neurosci*. **2019**, *50*, 2562-73, doi:10.1111/ejn.14143.
- 118 Schwarz JM, Hutchinson MR, Bilbo SD. Early-life experience decreases drug-induced reinstatement of morphine CPP in adulthood via microglial-specific epigenetic programming of anti-inflammatory IL-10 expression. *J Neurosci*. **2011**, *31*, 17835-47, doi:10.1523/JNEUROSCI.3297-11.2011.
- 119 Chen SL, Tao PL, Chu CH, Chen SH, Wu HE, Tseng LF, et al. Low-dose memantine attenuated morphine addictive behavior through its anti-inflammation and neurotrophic effects in rats. *J Neuroimmune Pharmacol*. **2012**, *7*, 444-53, doi:10.1007/s11481-011-9337-9.
- 120 Campbell LA, Avdoshina V, Rozzi S, Mocchetti I. CCL5 and cytokine expression in the rat brain: differential modulation by chronic morphine and morphine withdrawal. *Brain Behav Immun*. **2013**, *34*, 130-40, doi:10.1016/j.bbi.2013.08.006.
- 121 Cahill CM, Taylor AM. Neuroinflammation-a co-occurring phenomenon linking chronic pain and opioid dependence. *Curr Opin Behav Sci*. **2017**, *13*, 171-77, doi:10.1016/j.cobeha.2016.12.003.
- 122 Mohamed HM, Mahmoud AM. Chronic exposure to the opioid tramadol induces oxidative damage, inflammation and apoptosis, and alters cerebral monoamine neurotransmitters in rats. *Biomed Pharmacother*. **2019**, *110*, 239-47, doi:10.1016/j.biopha.2018.11.141.
- 123 Barbosa J, Faria J, Garcez F, Leal S, Afonso LP, Nascimento AV, et al. Repeated Administration of Clinically Relevant Doses of the Prescription Opioids Tramadol and Tapentadol Causes Lung, Cardiac, and Brain Toxicity in Wistar Rats. *Pharmaceuticals (Basel)*. **2021**, *14*, doi:10.3390/ph14020097.
- 124 Jantzie LL, Maxwell JR, Newville JC, Yellowhair TR, Kitase Y, Madurai N, et al. Prenatal opioid exposure: The next neonatal neuroinflammatory disease. *Brain Behav Immun*. **2020**, *84*, 45-58, doi:10.1016/j.bbi.2019.11.007.
- 125 Catale C, Bussone S, Lo Iacono L, Carola V. Microglial alterations induced by psychoactive drugs: A possible mechanism in substance use disorder? *Semin Cell Dev Biol*. **2019**, *94*, 164-75, doi:10.1016/j.semcdb.2019.03.008.
- 126 Woodcock EA, Hillmer AT, Mason GF, Cosgrove KP. Imaging Biomarkers of the Neuroimmune System among Substance Use Disorders: A Systematic Review. *Mol Neuropsychiatry*. **2019**, *5*, 125-46, doi:10.1159/000499621.
- 127 Narita M, Miyatake M, Narita M, Shibasaki M, Shindo K, Nakamura A, et al. Direct evidence of astrocytic modulation in the development of rewarding effects induced by drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology*. **2006**, *31*, 2476-88, doi:10.1038/sj.npp.1301007.
- 128 Zhang XQ, Cui Y, Cui Y, Chen Y, Na XD, Chen FY, et al. Activation of p38 signaling in the microglia in the nucleus accumbens contributes to the acquisition and maintenance of morphine-induced conditioned place preference. *Brain Behav Immun*. **2012**, *26*, 318-25, doi:10.1016/j.bbi.2011.09.017.
- 129 Hutchinson MR, Northcutt AL, Chao LW, Kearney JJ, Zhang Y, Berkelhammer DL, et al. Minocycline suppresses morphine-induced respiratory depression, suppresses



- morphine-induced reward, and enhances systemic morphine-induced analgesia. *Brain Behav Immun.* **2008**, *22*, 1248-56, doi:10.1016/j.bbi.2008.07.008.
- 130 Zhang Y, Liang Y, Levran O, Randesi M, Yuferov V, Zhao C, et al. Alterations of expression of inflammation/immune-related genes in the dorsal and ventral striatum of adult C57BL/6J mice following chronic oxycodone self-administration: a RNA sequencing study. *Psychopharmacology (Berl).* **2017**, *234*, 2259-75, doi:10.1007/s00213-017-4657-y.
- 131 Xia W, Liu G, Shao Z, Xu E, Yuan H, Liu J, et al. Toxicology of tramadol following chronic exposure based on metabolomics of the cerebrum in mice. *Sci Rep.* **2020**, *10*, 11130, doi:10.1038/s41598-020-67974-8.
- 132 Zhang Y, Li H, Li Y, Sun X, Zhu M, Hanley G, et al. Essential role of toll-like receptor 2 in morphine-induced microglia activation in mice. *Neurosci Lett.* **2011**, *489*, 43-7, doi:10.1016/j.neulet.2010.11.063.
- 133 Lacagnina MJ, Kopec AM, Cox SS, Hanamsagar R, Wells C, Slade S, et al. Opioid Self-Administration is Attenuated by Early-Life Experience and Gene Therapy for Anti-Inflammatory IL-10 in the Nucleus Accumbens of Male Rats. *Neuropsychopharmacology.* **2017**, *42*, 2128-40, doi:10.1038/npp.2017.82.
- 134 Liu H, Wei J, Liu M, Wu S, Ma C, Liu C, et al. Epigenetic upregulation of CXCL12 expression contributes to the acquisition and maintenance of morphine-induced conditioned place preference. *Exp Neurol.* **2018**, *306*, 55-63, doi:10.1016/j.expneurol.2018.04.013.
- 135 Salarian A, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, Seifi B, Bakhshi E, Akhondzadeh S, et al. Opioid Use Disorder Induces Oxidative Stress and Inflammation: The Attenuating Effect of Methadone Maintenance Treatment. *Iran J Psychiatry.* **2018**, *13*, 46-54, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29892317>
- 136 Piepenbrink MS, Samuel M, Zheng B, Carter B, Fucile C, Bunce C, et al. Humoral Dysregulation Associated with Increased Systemic Inflammation among Injection Heroin Users. *PloS one.* **2016**, *11*, e0158641, doi:10.1371/journal.pone.0158641.
- 137 Ghazavi A, Mosayebi G, Solhi H, Rafiei M, Moazzeni SM. Serum markers of inflammation and oxidative stress in chronic opium (Taryak) smokers. *Immunol Lett.* **2013**, *153*, 22-6, doi:10.1016/j.imlet.2013.07.001.
- 138 Chen SL, Lee SY, Tao PL, Chang YH, Chen SH, Chu CH, et al. Dextromethorphan attenuated inflammation and combined opioid use in humans undergoing methadone maintenance treatment. *J Neuroimmune Pharmacol.* **2012**, *7*, 1025-33, doi:10.1007/s11481-012-9400-1.
- 139 Guzel D, Yazici AB, Yazici E, Erol A. Evaluation of Immunomodulatory and Hematologic Cell Outcome in Heroin/Opioid Addicts. *J Addict.* **2018**, *2018*, 2036145, doi:10.1155/2018/2036145.
- 140 Zajícová A, Wilczek H, Holán V. The alterations of immunological reactivity in heroin addicts and their normalization in patients maintained on methadone *Folia Biologica (Praha).* **2004**, *50*, 24-28,
- 141 Neri M, Panata L, Bacci M, Fiore C, Riezzo I, Turillazzi E, et al. Cytokines, chaperones and neuroinflammatory responses in heroin-related death: what can we learn from different patterns of cellular expression? *Int J Mol Sci.* **2013**, *14*, 19831-45, doi:10.3390/ijms141019831.
- 142 Saad MH, Rumschlag M, Guerra MH, Savonen CL, Jaster AM, Olson PD, et al. Differentially expressed gene networks, biomarkers, long noncoding RNAs, and shared responses with cocaine identified in the midbrains of human opioid abusers. *Sci Rep.* **2019**, *9*, 1534, doi:10.1038/s41598-018-38209-8.
- 143 Marianne L. Seney S-MK, Jill R. Glausier, Mariah A. Hildebrand, XiangningXue, Wei Zong, Jiebiao Wang, Micah A. Shelton, BaDoi N. Phan, ChaitanyaSrinivasan, Andreas R.

- Pfenning, George C. Tseng, David A. Lewis, ZacharyFreyberg, Ryan W. Logan. Transcriptional alterations in dorsolateral prefrontal cortex and nucleus accumbens implicate neuroinflammation and synaptic remodeling in opioid use disorder. *Biological Psychiatry*. **2021**,
- 144 Zhang X, Yu H, Bai R, Ma C. Identification and Characterization of Biomarkers and Their Role in Opioid Addiction by Integrated Bioinformatics Analysis. *Front Neurosci*. **2020**, *14*, 608349, doi:10.3389/fnins.2020.608349.
- 145 O'Sullivan SJ, Malahias E, Park J, Srivastava A, Reyes BAS, Gorky J, et al. Single-Cell Glia and Neuron Gene Expression in the Central Amygdala in Opioid Withdrawal Suggests Inflammation With Correlated Gut Dysbiosis. *Front Neurosci*. **2019**, *13*, 665, doi:10.3389/fnins.2019.00665.
- 146 Motaghinejad M, Karimian SM, Motaghinejad O, Shabab B, Asadighaleni M, Fatima S. The effect of various morphine weaning regimens on the sequelae of opioid tolerance involving physical dependency, anxiety and hippocampus cell neurodegeneration in rats. *Fundam Clin Pharmacol*. **2015**, *29*, 299-309, doi:10.1111/fcp.12121.
- 147 Liu L, Collier JK, Watkins LR, Somogyi AA, Hutchinson MR. Naloxone-precipitated morphine withdrawal behavior and brain IL-1beta expression: comparison of different mouse strains. *Brain Behav Immun*. **2011**, *25*, 1223-32, doi:10.1016/j.bbi.2011.03.016.
- 148 Valentinova K, Tchenio A, Trusel M, Clerke JA, Lalive AL, Tzanoulinou S, et al. Morphine withdrawal recruits lateral habenula cytokine signaling to reduce synaptic excitation and sociability. *Nat Neurosci*. **2019**, *22*, 1053-56, doi:10.1038/s41593-019-0421-4.
- 149 Mansouri MT, Naghizadeh B, Ghorbanzadeh B, Amirgholami N, Houshmand G, Alboghobeish S. Venlafaxine inhibits naloxone-precipitated morphine withdrawal symptoms: Role of inflammatory cytokines and nitric oxide. *Metab Brain Dis*. **2020**, *35*, 305-13, doi:10.1007/s11011-019-00491-4.
- 150 Hutchinson MR, Lewis SS, Coats BD, Skyba DA, Crysdale NY, Berkelhammer DL, et al. Reduction of opioid withdrawal and potentiation of acute opioid analgesia by systemic AV411 (ibudilast). *Brain Behav Immun*. **2009**, *23*, 240-50, doi:10.1016/j.bbi.2008.09.012.
- 151 Chan YY, Yang SN, Lin JC, Chang JL, Lin JG, Lo WY. Inflammatory response in heroin addicts undergoing methadone maintenance treatment. *Psychiatry Res*. **2015**, *226*, 230-4, doi:10.1016/j.psychres.2014.12.053.
- 152 Wang TY, Lee SY, Chang YH, Chen SL, Chen PS, Chu CH, et al. Correlation of cytokines, BDNF levels, and memory function in patients with opioid use disorder undergoing methadone maintenance treatment. *Drug Alcohol Depend*. **2018**, *191*, 6-13, doi:10.1016/j.drugalcdep.2018.06.024.
- 153 Lu RB, Wang TY, Lee SY, Chen SL, Chang YH, See Chen P, et al. Correlation between interleukin-6 levels and methadone maintenance therapy outcomes. *Drug Alcohol Depend*. **2019**, *204*, 107516, doi:10.1016/j.drugalcdep.2019.06.018.
- 154 Lee SY, Chen SL, Chang YH, Chu CH, Chen SH, Chen PS, et al. A placebo-controlled trial of dextromethorphan as an adjunct in opioid-dependent patients undergoing methadone maintenance treatment. *Int J Neuropsychopharmacol*. **2015**, *18*, pyv008, doi:10.1093/ijnp/pyv008.
- 155 Dennis BB, Samaan MC, Bawor M, Paul J, Plater C, Pare G, et al. Evaluation of clinical and inflammatory profile in opioid addiction patients with comorbid pain: results from a multicenter investigation. *Neuropsychiatr Dis Treat*. **2014**, *10*, 2239-47, doi:10.2147/NDT.S72785.

## ANEXO III – Artículo 2

### **Immunomodulatory role of CB2 receptors in emotional and cognitive disorders**

Álvaro Morcuende<sup>1</sup>, María Salud García-Gutiérrez<sup>1,2,3</sup>, Simone Tambaro<sup>4</sup>, Elena Nieto<sup>1</sup>, Jorge Manzanares<sup>1,2,3</sup> and Teresa Femenía<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Avda de Ramón y Cajal s/n, San Juan de Alicante, 03550 Alicante, Spain

<sup>2</sup>Redes de Investigación Cooperativa Orientada a Resultados en Salud (RICORS), Red de Investigación en Atención Primaria de Adicciones (RIAPAd), Instituto de Salud Carlos III, MICINN and FEDER, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), Alicante, Spain

<sup>4</sup> Division of Neurogeriatrics, Center for Alzheimer Research, Department of Neurobiology, Care Sciences and Society (NVS), Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

\*

Teresa Femenía

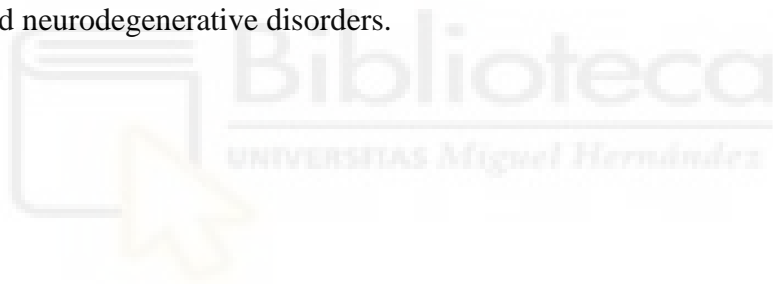
tfemenia@umh.es; Tel.: +34-96-591-9553

**Correspondence:**

**Keywords: Cannabinoid receptor 2, psychiatry, anxiety, depression, Alzheimer's disease, emotional response.**

## **Abstract**

Emotional behavior, memory, and learning have been associated with alterations in the immune system in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. In recent years, several studies pointed out the involvement of the cannabinoid receptor 2 (CB2r) in the immune system and the regulation of inflammation. This receptor is widely distributed in different tissues and organs with higher expression in spleen and immune system cells. However, CB2r has also been detected in several brain areas and different brain cell types, such as neurons and glia. These findings suggest that CB2r may closely relate the immune system and the brain circuits regulating inflammation, mood, and cognitive functions. Therefore, we review the studies that may help elucidate the molecular bases of CB2r in regulating inflammation in different brain cells and its role in the pathophysiology of psychiatric and neurodegenerative disorders.



## Introduction

Psychiatric disorders are a heterogeneous group where alterations at the inflammatory level have been identified, relating in some cases to the onset or progression of psychiatric disorders.

Studies reported increased circulating inflammation in individuals with mood disorders characterized by cognitive dysfunction [1] [2, 3] [4, 5][6-9].

Inflammation is a process that helps repair tissue damage or resolve an infection, in which the rapid response of the innate immune system plays a significant role. Different mediators known as Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs) are released into the extracellular space during tissue damage. These DAMPs are recognized by specific receptors, Pattern Recognition Receptors (PRR), composed of several families of receptors. The most important PRRs are the Toll-Like Receptors (TLRs) or NOD-Like Receptors (NLRs). These receptors recognize DAMPs and Pathogen-associated Molecular Patterns (PAMPs) or products associated with oxidative stress such as reactive oxygen species (ROS). Once these PRRs are activated, they initiate an intracellular signaling cascade triggering the release of inflammatory mediators through the Type I interferon and Nuclear Factor Kappa-B (NF- $\kappa$ B) signaling pathways, the most studied pathways of pro-inflammatory cytokine production [10, 11]. In an inflammatory process, there is a resolution phase where anti-inflammatory mechanisms such as anti-inflammatory cytokines, maresins, and resolvins are stimulated [12]. When this fails, the consequence is chronic and pathological inflammation, but still, the organism will try to compensate for this inflammation to reach homeostasis. In this context, a delicate balance between the levels of pro-inflammatory cytokines (e.g., L-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ ) and anti-inflammatory (e.g., IL-4, IL-10, IL-11, and IL-13) is necessary for a proper resolution of the inflammation process. These signals are regulated upon the phenotype acquired of the

immune cells and microglia at specific time windows (i.e., M1 pro-inflammatory phenotype or M2 anti-inflammatory phenotype) [13, 14].

Noteworthy, the release of DAMPS and the consequent release of pro-inflammatory cytokines produce a systemic sterile inflammation without the participation of pathogens. This systemic inflammation may promote disruption of the blood-brain barrier, making it more permeable to the passage of DAMPS, pro-inflammatory cytokines, or infiltration of leukocytes and macrophages associated with neuroinflammation [15-17]. In this way, sterile inflammation has been linked to various psychiatric illnesses, especially to episodes of major depression or bipolar disorder [8, 10, 11]. In this sense, it has been observed in different clinical studies that the administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), mainly using selective COX-2 inhibitors, can improve the psychiatric pathology, evidencing the close correlation between these diseases and the immune system [18].

In this regard, during the last years, many findings suggested the participation of the endogenous cannabinoid system in the modulation of behavior and inflammation. Therefore, due to the possible importance of inflammation in the onset and development of psychiatric diseases, it is necessary to investigate further the precise mechanisms underlying this process to discover new therapeutic targets.

## **2. The endogenous cannabinoid system**

The endogenous cannabinoid system (ECS) is composed of several receptors, including the cannabinoid receptor 1 (CB1r) and the cannabinoid receptor 2 (CB2r), endogenous ligands, and enzymes responsible for their synthesis and degradation. In addition, it should be noted that there are other atypical receptors, not CB1/CB2, which include the GPR family receptors. Their effects could be mediated through the activation

of different mechanisms, such as gene transcription mediated by peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), transient receptor potential channels (TRP), or vanilloid receptors like TRPV1 [19-21].

The main actions of CB1r and CB2r include inhibition of adenylate cyclase, receptors coupled to G proteins of the G<sub>o</sub> and G<sub>i</sub> type. However, while CB1r and CB2r have a similar affinity for G<sub>i</sub> type, CB2r has a lower affinity for G<sub>o</sub> than G<sub>i</sub>. [22]; inhibition of voltage-dependent calcium channels; activation of MAP kinases; and modulation of potassium channels. Their activation leads to cell physiology changes as diverse as synaptic function, gene transcription, and cell migration [19, 21, 23, 24]. However, cannabinoid receptors combine among themselves; Callen et al. report the presence of CB1-CB2 receptor heteromers in different brain areas, showing a bidirectional cross-antagonism phenomenon between them [25].

Regarding the distribution of endocannabinoid receptors, CB1r is widely distributed in the central nervous system (CNS), in brain regions such as the cortex, basal ganglia, hippocampus, cerebellum, dorsal and ventral striatum, globus pallidus, and substantia nigra, among other areas. These receptors are found in neurons and glia and seem to play an important role in motivation and cognition, involved in GABAergic and glutamatergic pathways [19, 21, 23, 24]. On the other hand, CB2r was initially discovered in the spleen, suggesting a role in immunity. It was believed to be the primary expression site for a long time and with no expression in the brain. Since the CB2R expression in the healthy brain is low and the available tools have important limitations (i.e., issues with antibodies specificity). It was classically thought to be expressed in microglial cells and vascular elements and to increase in large numbers in the presence of tissue damage or neuroinflammation [19, 21, 23, 24]. However, it has also been found in basal conditions in neurons and brain areas highly involved in emotional, rewarding, and cognitive

behaviors, such as the ventral tegmental area (VTA), nucleus accumbens, amygdala, or hippocampus. Therefore, it is suggested that it may have an essential role in several brain disorders related to these behaviors [24].

Among the endogenous cannabinoids (EC), the two most studied ones are the arachidonylethanolamine or anandamide (AEA) and the 2-arachidonoylglycerol (2-AG) [23]. Typically, the endogenous ligands are derived from membrane phospholipids and therefore are not stored in synaptic vesicles, in contrast to other neurotransmitters [19, 23]. However, other EC ligands have been characterized, such as lysophosphatidylinositol (LPI), virodhamine, and noladin ether.

In the synthesis of EC, both AEA and 2-AG are derived from arachidonic acid, the primary source of arachidonic acid, the omega-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs). The AEA is produced from the precursor N-arachidonoyl-phosphatidyl-ethanol (NAPE). It is thought that AEA is obtained from this precursor and by four possible routes, being NAPE phospholipase D (NAPE-PLD), a direct and well-characterized route [19, 23]. Although the synthesis of 2-AG appears to be simple, the majority comes from the sequential hydrolysis of arachidonoyl-phosphatidylinositol-bisphosphate by a phospholipase (PLC $\beta$ ) followed by hydrolysis of the resulting diacylglycerol by the enzyme diacylglycerol lipase (DAGL) [19, 23]. The importance of 2-AG as an intermediate metabolite in lipid synthesis must be emphasized. The primary source of arachidonic acid for the biosynthesis of prostaglandins [19, 23] stands out for their involvement as an inflammatory mediator. Two isoforms of DAGL,  $\alpha$ , and  $\beta$ , have been characterized. In animal studies, it was proposed that DAGL $\alpha$  is a crucial enzyme for neuronal plasticity in adults.

The metabolization of AEA in the central nervous system is carried out mainly by the fatty acid aminohydrolase or FAAH, which is found in postsynaptic neurons and can also



degrade various fatty acid derivatives. In addition, anandamide can be metabolized by cyclooxygenase-2 (COX-2) or N-acyl ethanolamine amidase (NAAA) [19, 21, 23]. The degradation will be carried out mainly by the monoacylglycerol lipase (MAGL) located in presynaptic neurons. In turn, other enzymes that can hydrolyze 2-AG are ABHD6, usually located in dendrites and dendritic spines of excitatory neurons, and ABH12. Similarly, like AEA, 2-AG can also be metabolized by COX-2, and under certain conditions, FAAH could act in its degradation [19, 21, 23]. Therefore, it could be hypothesized that COX-2 inhibitors may elevate basal levels of endocannabinoids, producing the beneficial effect observed.

On the other hand, the most popular phytocannabinoid is the delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC), the main psychoactive component of *Cannabis sativa* cannabidiol (CBD), this one devoid of abuse and dependence, subject of intense medical research. CBD can bind to more than 65 targets and displays 100 times less affinity for CB1r than  $\Delta$ 9-THC [26, 27]. In addition, one of the first synthetic treatments employed in humans that acts selectively to the EC system was the antagonist/inverse agonist of CB1r SR141716A (rimonabant). This compound was used to treat obesity, but its commercialization stopped due to a few cases of suicide reported in patients treated with this drug [19-21, 23, 24]. This fact pointed out how the modulation of the endogenous cannabinoid system impacts psychiatric disorders.

### **3. CB2r as a potential modulator of neuroinflammation**

Currently, CB2r are emerging as potential immunomodulatory agents with specific roles in cell-type specificity. Therefore, knowing these receptors will help understand the mechanisms by which CB2r could impact psychiatry due to the importance of inflammation in neuropsychiatric disorders. A large amount of studies have demonstrated

the involvement of inflammatory mediators in mood disorders and in particular, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in behavioral alterations (For review see. [28-30]) For this reason, we will review in the following sections how the modulation of CB2 receptors shows promising results for the management of psychiatric diseases (Figure 1).

Figure.1 Effects of CB2r activation as a potential modulator of neuroinflammation

### **3.1. The involvement of the CB2r in the microglia**

CB2r in microglia appears to be involved in a variety of paradigms and diseases involving neuroinflammation, including Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease, multiple sclerosis (MS), as well as stress or addiction [8, 31, 32]. Some studies showed that activation of CB2 receptors prevents the activation of microglia and the release of pro-inflammatory mediators [33-35]. This anti-inflammatory action seems to be responsible for a neuroprotective effect in different animal models of AD, MS, stroke, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and other diseases involving inflammation [36]. However, the molecular mechanisms associated with these anti-inflammatory effects remain unknown.

Evidence suggests that CB2r controls microglial activity by interfering with the NF- $\kappa$ B pathway [37] and with the mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathways (c-Jun N-terminal Kinase (JNK), ERK, or p38) [38]. These kinases are well-known targets for the modulation of inflammation by interfering in downstream signaling pathways of the innate immune response and the production of inflammatory mediators [39]. However, the activation of CB2r coupling to MAPKs is dependent on cellular context. A wide range of activation and inhibition has been observed depending on the cell type, cell differentiation status, and co-modulators of MAPK cascades [36].

Early reports showed that CB2r agonists prevented neuronal injury during neuroinflammation by regulating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1), resulting in Erk1/2 inhibition [34]. Similarly, Romero-Sandoval reported that activation of CB2r with JWH-015, a selective CB2r agonist, induced an anti-inflammatory phenotype in microglia consistent with a reduction in TNF- $\alpha$  expression and a decrease in microglial migration through inhibition of ERK1/2 phosphorylation and MKP induction [40]. Another study also found a reduction of p-ERK and p-p38 133 with an anti-inflammatory effect upon CB2r activation using JWH-133 [41]. Moreover, oleamide (ODA), an amide fatty acid with actions at CB1 and CB2 receptors [42], showed a protective effect by inhibiting Nitric Oxide (NO), Prostaglandin E, COX-2 production through inhibition of Akt, p38, and ERK phosphorylation when BV2 microglia were treated with Lipopolysaccharide (LPS). This TLR4 agonist triggers inflammation through NF- $\kappa$ B [43]. Li et al. also reported reduced levels of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 in BV2 microglia following hypoxic exposure and treatment with Trans-caryophyllene. These anti-inflammatory effects were mediated by inhibiting the NF- $\kappa$ B pathway [37].

Noteworthy, Vicomi et al. found that in axotomized neurons, the JWH-015 agonist did not produce neuroprotection via the ERK1/2 and p38 pathways during remote cell death. Instead, the beneficial effect was seen through an increase in p-Akt and a decrease in p-JNK, a PI3K-dependent effect, suggesting a protective effect of JWH-015 through regulation of JNK via the PI3K/Akt pathway [44]. Importantly, there is a constitutive control of CB2r-mediated basal JNK activity in the mouse brain; the selective CB2r agonist JWH133 reduced JNK phosphorylation, whereas acute administration of the antagonist AM630 would increase it. In contrast, chronic administration of AM630

markedly decreases basal JNK activation, revealing a reversal of the acute effect of the antagonist [45].

In an in-vitro model of multiple sclerosis, anandamide showed an anti-inflammatory action by inhibiting LPS/IFN $\gamma$ -induced NF-kB activation. In particular, anandamide strongly activated the phosphorylation of ERK1/2 and JNK pathways while reducing Akt phosphorylation, which increased IL-10 production in microglia [46].

In addition, several reports suggest that the anti-inflammatory effect of CB2r activation might involve other different pathways such as JAK (Janus kinase)/STAT1 (signal transducer and activator of transcription) [35] or activation of the pCREB-Bcl-2 pathway [47].

CB2r has been positioned as an essential target mechanism for phenotypic change of microglia [38, 48]. One of the main ideas of how CB2r can counteract inflammation is shifting microglia towards an anti-inflammatory phenotype, M2, with a consequent increase in the release of anti-inflammatory cytokines such as IL-10. Essentially, the endogenous endocannabinoids 2-AG and AEA increase the expression of the anti-inflammatory phenotype by microglia while decreasing M1 inflammatory microglia markers [46] [49]. Similarly, palmitoylethanolamide (PEA) blunted the increase of M1 pro-inflammatory markers induced by lipopolysaccharide (LPS), concomitantly increasing those M2 anti-inflammatory markers in N9 microglial cells partially through CB2r activation [50].

The mechanisms involved in the switch of microglia to an anti-inflammatory phenotype by CB2r are the (cyclic AMP)-dependent protein kinase-mediated pathway found in in-vivo and in-vitro models of brain injury [51], the PI3K/Akt/mTOR/NF-kB pathway in neuroprotection induced in an animal model of vascular dementia (VD) [52],

and the protein kinase C (PKC) and PGC-1 $\alpha$ , a transcription protein involved in the regulation of mitochondrial biogenesis [50, 53].

Interestingly, the expression of cannabinoid receptors, mainly CB2, has been related to the microglial phenotype [49]. For instance, results from in vitro studies suggest that the deletion of microglial CB2r leads to suppressing inflammatory phenotypes. Also, primary microglia from CB2r deficient mice are less responsive to pro-inflammatory stimuli [54]. On the other hand, microglia from CB2r deficient mice cannot polarize to an M2a phenotype [49]. Altogether, these findings suggest that CB2rs play a role in microglia activation either to a pro- or anti-inflammatory phenotype. Nevertheless, these findings are still ambiguous, and further research will clarify the fine-tune mechanisms involved in regulating pro- or anti-inflammatory behaviors associated with CB2.

Altogether, these data highlight the critical immunomodulatory functions of CB2 receptors in microglia. Moreover, modulation of this receptor may be an excellent strategy to target neuroinflammation in psychiatric diseases.

### **3.2 The involvement of the CB2 receptor in astrocytes**

It is well known the role of astrocytes at the level of neuronal support and metabolism [55]. Still, it has also been seen how they can intervene, after systemic inflammation, in regulating cognitive functions [56]. In this aspect, cb2 receptors expressed in the astrocytes could be contributing to the modulation of inflammation and metabolism in astrocytes to support neuronal function.

The treatment with the CB2r agonist WIN55,212-2, in IL-1 $\beta$ -stimulated human astrocytes, inhibited iNOS together with reduced release of pro-inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$ , CXCL10, CCL2, and CCL5. Therefore, the authors suggested that it was primarily mediated by CB2r receptors [57]. On the other hand, Jia et al. showed that CB2r

could mediate anti-inflammatory actions in astrocytes. CB2 receptor expression is upregulated in astrocytes treated with 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), a toxic metabolite that activates glial cells to release inflammatory mediators. Furthermore, the authors showed that pretreatment with the CB2r agonist JWH133 inhibits MPP<sup>+</sup>-induced iNOS and COX-2 protein up-regulation and TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA up-regulation in astrocytes. Moreover, the CB2r agonist inhibited MPP<sup>+</sup>-induced iron influx into astrocytes. The authors concluded that all these effects depended on CB2r [58]. Additional anti-inflammatory effects for a CB2r agonist have also been reported in the context of spinal glial activation and pain sensitization [59]. These findings suggest a functional relationship between astrocytic CB2r signaling and inhibition of p38 phosphorylation, which is associated with an anti-inflammatory effect and suppression of IL-1-induced CX3CL1 upregulation [60, 61].

In addition, pretreatment with a CB2r agonist protected against increased blood-brain barrier permeability in a model of spinal cord ischemia-reperfusion. This action may be primarily mediated by reduced expression of MyD88/NF- $\kappa$ B level pathway and the astrocytic TLR4/Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), an enzyme involved in BBB leakage [62]. Other studies show how the stimulation with JWH133 alleviated neuroinflammation and protected BBB permeability in rat models of intracerebral hemorrhage [63, 64]. In addition, CB2r is expressed in cell types, different from astrocytes, that form the blood-brain barrier, such as endothelial cells [65], showing the implication of the CB2r in the maintenance of the brain-periphery homeostasis.

### 3.3 The involvement of the CB2 receptor in neurons

The CB2 receptors are involved in protecting neuronal damage caused by neuroinflammation. The most studied mechanisms of this protection were those involving microglia. However, CB2 receptors are also expressed in neurons. This protective effect could be due to neuronal intracellular mechanisms, although it is unknown whether neuronal CB2r can modulate immune functions.

Marchant et al. showed how chronic activation of CB1 and CB2 receptors by WIN-2 proven an anti-inflammatory cytokine profile in the hippocampus of aged rats. While the agonist actions of WIN-2 at CB1/2 receptors promoted neurogenesis in the dentate gyrus, the antagonist actions of WIN-1 at the TRPV1 receptor were responsible for the reduction in microglial activation [66]; Furthermore, CB2 receptors have been shown to promote neural progenitor cell proliferation through the activation of mTORC1 signaling [67].

To date, few studies have investigated the differential signaling pathways triggered by CB2r in microglial and neuronal cells. However, neuronal and microglial CB2 receptors have been shown to play different roles in behavioral regulation [68]. One of the possible mechanisms that have been observed is the modulation of the transcription factor NRF2 through CB2 receptors. NRF2 is a master regulator of inflammation and modulates microglial dynamics. It has been shown to counteract inflammation in several neurodegenerative diseases by interacting with the transcription factor NF- $\kappa$ B. However, these findings have not been reproduced at the neuronal level [69]. Therefore, this raises the possibility that CB2r in neurons has other functions not involved in the regulation of inflammation.

Another neuroprotective mechanism of CB2r is the bidirectional interaction between neurons and glial cells through the release of soluble factors and the formation of ligand-receptor associations. It is thought that CB2r-mediated modulation of neuron-glia

crossstalk would be highly relevant for neuronal survival when brain homeostasis is lost. Recent studies have shown that MAGL inhibition increases the risk of neuronal death in neuronal cultures but not in neuron/microglia co-cultures. The authors conclude that the neuroprotective effect of MAGL inhibition was due to CB2r in microglia [70].

A possible protective mechanism involved in CB2r-mediated microglia-neuron interaction is the potentiation of the CD200-CD200R interaction. CD200R is expressed on microglia, whereas CD200 is expressed on neurons, and their interaction plays a crucial role in neuronal protection in inflammation-mediated neurodegeneration. Furthermore, CD200R1-CD200 interaction was associated with decreased production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6 but increased IL-10 in activated microglia after anandamide treatment [32]. Another possible mechanism related to microglia-neuron interaction and CB2r involves the up-regulation of microglial CX3CR1. This effect promotes a neurotrophic phenotype of microglia, associated with increased release of BDNF by microglia and increased proliferation of neuronal progenitor cells [71].

Altogether, these data highlight an essential role for brain CB2r in modulating inflammatory responses. CB2r can modulate immune function by suppressing inflammation, shifting microglia to an M2 anti-inflammatory phenotype, supporting neuron-glia coupling, promoting neuronal proliferation and neuroprotection, which makes them potential modulators for psychiatric conditions, as they present immune alterations. Importantly, data show an anti-inflammatory effect in multiple inflammatory diseases. Data regarding the molecular mechanisms are still uncertain since studies are performed in different conditions. However, these data reveal that CB2r can impact central routes involved in microglial functions (JNK, p38, ERK, Akt, mTOR). These pathways are also involved in neuropsychiatric disorders and inflammatory conditions. CB2r is emerging as a potential therapeutic target. Further studies are needed to reveal



how CB2r mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions in neuropsychiatric disorders.

#### **4. Contribution of CB2r in modulating the crosstalk between neuroinflammation, neuroplasticity and emotional disorders**

##### **4.1 CB2r modulation of neuroinflammation in depressive disorders**

Approximately 16% of the world population presents a depressive disorder, the third leading cause of disability and the fourth leading cause of disease burden [72]. Its clinical features include a great variety of symptoms such as sleep disturbances, sadness, apathy, anhedonia and reduced social interest. Depressive disorders are associated with a detriment in social relationships, including family breakdown, absence from work, and reduced productivity in the workplace. The prevalence of depressive disorders varies depending on age and sex, with the highest rates in women [73-76]. Interestingly, the severity of depressive disorders is more significant at older ages [77].

Despite the significant number of antidepressants available, the clinical response rate is low, reflecting that only one-third of patients achieve complete remission [78, 79]. The main reason for this clinical reality lies in the incomplete knowledge of the biological basis underlying depressive disorders, especially considering gender and age influence. Thus, it is necessary to invest more efforts and resources in characterizing in more detail the underlying mechanisms with the final goal of identifying new and effective critical targets for treating these disorders. In this respect, cumulative data pointed out CB2r as a promising therapeutic option for several neuropsychiatric conditions, including depressive disorders. The first evidence came from animal models of depression showing alterations of CB2r in different brain regions, such as the hippocampus (HIPPO), amygdala (AMY) and frontal cortex [80-83]. A postmortem study from the Manzanares group

performed in the brain of suicide victims showed a reduction of CB<sub>2</sub>r gene expression in the dorsolateral prefrontal cortex and AMY, critical regions in decision making and impulsivity emotional reactivity [84]. Besides, the research team led by Onaivi has shown a high incidence of the Q63R polymorphism of CB<sub>2</sub>r in Japanese depressive patients [85]. The R allele of this functional polymorphism was also associated with increased sensitivity for childhood trauma, possibly due to a loss in the inhibition of inflammation and overactivation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis [86].

In the same way, genetic and pharmacological studies performed in rodents further supported the role of CB<sub>2</sub>r in emotional reactivity, including anxiety and depressive-like behaviors. On the one hand, mice overexpressing CB<sub>2</sub>r in the central nervous system (neurons and glia) (CB<sub>2</sub>xP) presented decreased depressive-like behaviors in the tail suspension and novelty suppressed feeding tests [81]. On the other hand, mice lacking CB<sub>2</sub>r (CB<sub>2</sub>KO) showed just the opposite since their vulnerability was higher in the evaluated paradigms [87]. Overexpression of CB<sub>2</sub>r was associated with an endophenotype resistant to stimuli promoting a depressive state in the unpredictable chronic mild stress paradigm (UCMS), a reliable animal model to study the pathophysiological mechanisms underlying depression as decreased neurogenesis, HPA axis alterations and neuroinflammation [88-92].

Likewise, pharmacological studies chronically administering the cannabinoid CB<sub>2</sub>r-antagonist AM630 (1 mg/kg/12h) revealed a reduction of depressive behaviors induced by CUMS [81]. In contrast to these data, it was previously shown that administration of AM630 (3 mg/kg/24h) produced no effect on sucrose consumption in CUMS-exposed mice [80]. These discrepancies could be due to notable differences between the two studies, such as 1) the rodent strains employed (BALB/c [80], ICR [81]), and 2) the dose and administration patterns evaluated (3 mg/kg/24h [80], 1 mg/kg/12h [81]).

Based on the neuroinflammation hypothesis of depression [93-95], administration of the LPS, which induces sickness and depressive-like behaviors and cognitive impairments, is used to clarify the underlying mechanism of depression [96-98]. A significant up-regulation of CB2r was identified in activated microglia using this model [99]. Additional evidence about the role of CB2r in modulating neuroinflammation and depressive-like behaviors came from pharmacological studies testing CB2r-agonists. Acute and chronic administration (7 days) of the CB2r-agonist 1-phenylisatin (PI) significantly improved LPS-behavioral and neuroinflammation, reducing depressive-like behaviors, oxidative stress and TNF- $\alpha$  levels, and preventing the decline of antioxidant enzymes as GSH and catalase [100]. Interestingly, Youssef et al. [101] observed that the CB2r-agonist beta-caryophyllene (BCP) alleviates insulin resistance, oxidative stress, neuroinflammation, and psychological changes, including depressive-like behaviors and memory deficits induced by high fat/fructose diet (HFFD) in male Wistar rats. More in detail, this study indicated that CB2r, together with PPAR- $\gamma$ , is involved in the anti-inflammatory, anxiolytic and antioxidant effects of BCP. Further data supported anxiolytic- and antidepressant-like effects of BCP in different paradigms [102, 103]. Interestingly, pre-administration of the CB2r-antagonist AM630 completely blocked BCP effects, supporting the involvement of CB2r in such anxiolytic and antidepressant properties [104]. Curiously, blockade of CB2r by the antagonist SR144528 attenuated the effects of the synthetic cannabinoid HU210 (CB1r and CB2r agonist) on reducing the increase of cytokines concentrations induced by LPS in the brain [105].

Complementary studies revealed the involvement of CB2r in the antidepressant properties of different compounds. Such is the case of a very recent study showing that CB2r, along with CB1r and PPAR- $\gamma$ , are involved in the antidepressant-like effects of the rosmarinic acid in the LPS-induced neuroinflammatory model [106]. Besides, the

compound terpineol, monoterpenoid alcohol, showed immunomodulatory, neuroprotective, and antidepressant-like effects mainly through CB<sub>1</sub>r and CB<sub>2</sub>r [107].

Interestingly, previous studies demonstrated the regulatory role of CB<sub>2</sub>r in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation in mice. JWH133 prevented the increase in pro-inflammatory cytokines and the cellular oxidative and nitrosative damage (lipid peroxidation) induced by immobilization and acoustic stress (2 h/day for 4 days). Similarly, CB<sub>2</sub>xP exhibited the same anti-inflammatory and neuroprotective actions as those observed in mice pretreated with JWH133. Conversely, CB<sub>2</sub>KO mice showed intensified stress-induced neuroinflammatory responses [108].

Additional studies also revealed a closed association between CB<sub>2</sub>r and classical monoaminergic systems involved in depression, such as the dopaminergic and the serotonergic systems [109] [110, 111]. More importantly, CB<sub>2</sub>r also influences neuroplasticity. In this respect, genetic mice models revealed alterations in BDNF, one of the main neurotrophic factors involved in neurogenesis, which plays an essential role in modulating the plasticity of adult neurons and glia cells [112]. Overexpression of CB<sub>2</sub>r (Cb<sub>2</sub>xP) increased BDNF levels in the HIPP, which was not reduced even after 8 weeks of CUMS [81]. In contrast, CB<sub>2</sub>KO presented low BDNF, MAP2, NF200 and SYN-immunoreactive fibers and a reduced number of synapses in the HIPP, supporting abnormalities in the dendritic reorganization and the synaptic connections [113]. Indeed, chronic administration of AM630 significantly increases CB<sub>2</sub>r and BDNF gene expression in the HIPP of mice exposed to the CUMS, being proposed as a mechanism underlying its antidepressant properties in this mice model [81]. These results strongly suggest that CB<sub>2</sub>r may play an essential role in regulating BDNF gene expression. Recent pieces of evidence supported how microglia can modulate neuronal plasticity potentially

through BDNF. Thus, it is necessary to study further if modulation of microglia by CB2r may be the mechanism underlying the increase of BDNF observed in CB2xP mice.

Furthermore, the lack of CB2r (CB2KO) reduced the glucocorticoid receptor (GR) gene expression in the HIPP [113]. Increased phosphorylation of proteins involved in the mTOR signaling pathway, p70S6K and AKT, was found in CB2KO, revealing potential alterations in the translational process that controls the protein synthesis underlying synaptic neuronal plasticity and memory [113-116]. Considering the role of stress and GR in regulating inflammatory processes and BDNF gene expression [117, 118], it is tempting to speculate that the reduction of GR gene expression may cause changes in BDNF gene expression, neuronal plasticity and consequently alter the neurogenesis processes.

More recently, the neuroprotective effects of CB2r agonists were associated with the suppression of microglial activation through the inhibition of neurotoxic factors and by decreasing neuronal cell damage [119]. During CNS inflammation, activation of CB2r inhibited ERK-1/2 signaling in microglia, reducing iNOS production [34]. Studies carried out with the BCP demonstrated that this CB2r-agonist presents a modulatory effect on the PGC-1 $\alpha$ /BDNF pathway [103]. Additional pharmacological studies using CB2r-agonists, such as JWH133 and AM1241, showed that activation of CB2r significantly upregulated BDNF while reducing a variety of neuroinflammatory markers [50, 120]. Altogether revealed that CB2r, through the regulation of microglial activity, modulates BDNF gene expression and, consequently, neuroplasticity.

It is important to note that cumulative evidence highlight that the success of antidepressant treatments lies in their ability to reduce inflammatory processes and improve trophic factors [121, 122]. Moreover, recent studies have demonstrated that antidepressants promote microglial phenotype switching to M2-like cells, which can

secrete anti-inflammatory cytokines, an effect that is also found by activation of CB2r on these cells [123, 124]. Interestingly, microglia show sex- and age-differential characteristics. Aging female microglia selectively upregulates M1 markers with a poor response to noxious and stress stimuli [125]. These results indicate the CB2r as a promising target for treating depressive disorders that deserve further exploration, especially considering sex and age.

Table 1. modulatory effects of CB2r of neuroinflammation in depressive disorders

#### **4.2 CB2r modulation of neuroinflammation in anxiety disorders**

Anxiety disorders are the most common mental diseases, affecting nearly 30% of adults at some point in their lives [126]. They present high comorbidity with other psychiatric disorders, among which depressive disorders stand out [73, 127, 128]. Different factors have increased the likelihood of developing anxiety, such as genetic, environmental, psychological, and developmental causes [129-135]. The treatment of anxiety disorders includes psychotherapy and pharmacotherapy such as anxiolytic and antidepressant drugs. Among anxiolytics, benzodiazepines (BZP) are the most common, generally prescribed only for short periods. Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) and serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor (SNRI) antidepressant classes are the first-line medication treatments [136, 137]. Despite all the therapeutic options available, their limited efficacy and side effects [138-143] prompted further research to elucidate the underlying mechanisms. Therefore, identifying new targets and drugs along with current pharmacological options would improve clinical effectiveness and safety outcomes.

The identification of CB2r in brain regions is closely related to the response to stress, as the HIPP and AMY [81, 144, 145] accelerated the development of studies to clarify its role in modulating anxiety. In rodents, exposure to different types of stressful stimuli

induced significant changes in the expression of CB2r in the brain. Such is the case of maternal deprivation (MD), a model used for evaluating long-lasting effects of early life stress, including anxiety- and depressive-like behaviors, cognitive impairments and neuroendocrine alterations [146-148]. In rats, MD significantly increased the expression of CB2r in the HIPP [149]. Similarly, additional studies revealed sex-dependent differences, observing an increase of CB2r gene expression in the frontal cortex, ventral and dorsal striatum, dorsal HIPP and AMY in MD-male rats. In females, such an increase was only observed in the HIPP, suggesting that consequences of early life stress depend on sex and brain region [83]. Moreover, a rapid increase in CB2r gene expression has been observed in the HIPP of mice exposed to social defeat [150].

Studies using mice modified genetically demonstrated that CB2xP showed resistance to anxiogenic-like stimuli in the light-dark box and elevated plus maze tests [151]. On the contrary, CB2KO mice presented anxious behaviors [87]. More interestingly, genetic manipulation studies allowed us to go more deeply into the cell-specific active involvement of CB2r in the HIPP, dissecting the effects of CB2r gene expression disruption or overexpression in hippocampal neurons or microglia in the regulation of anxiety behavior and cognition [68]. The results revealed that overexpression of CB2r in CA1 pyramidal neurons significantly reduced anxiety levels. In the case of microglia, the elevation of CB2r increased contextual fear memory, whereas the absence of CB2r induced a reduction. Moreover, the deletion of CB2r in VTA dopaminergic neurons caused a significant anxiolytic-like effect [152]. Altogether, these results revealed that CB2r plays distinct roles in regulating anxiety and memory depending on the type of cells expressed.

Pharmacological studies also revealed the role of this cannabinoid receptor in stress response and anxiety. Acute treatment with the CB2r-agonist JWH015 reduced anxiety-

like behaviors in stressed mice; however, its chronic administration induced opposite effects [153]. In line with these results, acute activation of CB2r by BCP caused an anxiolytic-like effect entirely abolished by the CB2r-antagonist AM630, supporting the role of CB2r on BCP effects [102, 104]. Alternatively, it has been demonstrated that chronic administration of the CB2r-antagonist AM630 reduced the anxious behaviors induced by the CUMS [81]. Similarly, chronic intracerebroventricular administration of the CB2r antisense oligonucleotide induced anxiolytic-like effects [154]. Although additional studies are needed, the data collected to the date indicated potential differences between acute and chronic administration effects of compounds acting on CB2r. The CB2r agonists appear to be more helpful in producing an acute anxiolytic effect, whereas CB2r antagonists would be more appropriate for chronic anxiolytic treatments. CB2r has been closely related to crucial targets in response to stress and anxiety, including the HPA axis [151], the GABAergic system [151, 155], and more recently, neuroinflammation. The modulation of neuroinflammatory elements was associated with the anxiolytic-like effects of the non-selective CB2r-agonist WIN55,212-2 in mice exposed to repeat social deficits. This cannabinoid compound decreased IL-1 $\beta$  gene expression in microglia/macrophages and the accumulation of peripheral inflammatory monocytes [156]. Interestingly, in animal models of traumatic brain injury, the modulation of neuroinflammation by CB2r agonist reduced the development of anxiety and depressive-like behaviors in rodents [157-159]. Thus, modulation neuroinflammation appears to be a mechanism by which CB2r modulates emotional responses deserving an in-depth exploration.

Table 2. modulatory effects of CB2r of neuroinflammation in anxiety disorders



## **5. Contribution of CB2r in modulating the crosstalk between neuroinflammation, cognitive dysfunction and neurodegeneration**

The role of CB2r in the onset of Alzheimer's disease (AD) has been intensively investigated in the last decades. Inflammation has been shown to prompt cognitive dysfunction and dementia later in life [160]. Several studies associate depression with a high risk of developing dementia, and often those diseases are concomitant [161].

Unraveling its pathophysiological role in AD can provide a new therapeutical strategy. CB2r are poorly expressed in the neuronal brain cells in healthy conditions and are primarily detected in glial cells. However, CB2r levels drastically increase in neurodegenerative disorders, playing an essential role in modulating pro-inflammatory mediators such as AD [162, 163]. High levels of CB2r have been found in senile plaques surrounding microglia and astrocytes in both cortex and hippocampus in postmortem human AD patients [164, 165]. Similarly, in a preclinical murine AD model, a high expression of CB2r was also found in astrocytes and microglia surrounding the amyloid plaques but not neuronal cells [166]. Interestingly, expression levels of CB2r correlated with two relevant AD molecular markers, A $\beta$ 42 levels and senile plaque score. Both human and rodents' findings support a potential role of CB2r in the inflammatory response generated by plaque deposition.

Although most studies found a correlation of CB2r expression and A $\beta$ 42 levels, Tau overexpression appears to be involved in modulating CB2r levels in both mouse and human brains [167]. This study showed a TAU-dependent increase of CB2r expression on a neuronal level, and most importantly, the deletion of CB2r in TAU mice was associated with a cognitive improvement. However, it was ineffective to reverse neuroinflammation supporting a neuronal CB2 effect in TAU mice rather than glial, as reported in APP Tg AD mouse models. To further investigate the role of CB2r, Aso and

colleagues produced an AD(APP/PS1)/CB2 KO transgenic mice and evaluated the specific contribution of CB2r in the AD pathology [168]. The deletion of the CB2r increased cortical A $\beta$  deposition and A $\beta$ 40 soluble levels on the APP/PS1 mice. However, no effect was reported on tau pathology. Similar results were also previously observed in the mice model J20APP/CB2 KO [169]. In addition, in this study, the deletion of CB2r reduced total Tau expression, supporting a divergent effect of CB2r between the A $\beta$  and Tau pathology. In other studies, in contradiction with Aso's (2013) findings, CB2r deletion in APP/PS1 mice was associated with improved cognitive and learning deficits. These findings were accompanied by reduced neuronal loss, decreased plaque levels, and a reduction of activated microglia [170].

CB2r has been a target of several in vitro and in vivo tests in preclinical studies, sometimes contradictory results. In primary rat hippocampal neuronal cultures, it has been shown that the CB2r agonist JWH133 treatment reduces the A $\beta$ 42-induced neuron apoptosis [171], reverted effect by the selective CB2r antagonist AM630. CB2r activation with the selective CB2r agonist JWH-015 suppressed IFN- $\gamma$ -induced microglia activation, TNF- $\alpha$ , and nitric oxide production [35]. In APP/PS1 mice, the same compound enhanced the novel object recognition memory deficiency but was inefficient for hippocampus-dependent spatial cognitive dysfunction in the Morris water maze test. Moreover, activation of CB2r did not affect plaque deposition. Pretreatment with MDA7, a selective CB2r agonist, in an A $\beta$ 42 induced AD-Murine model, was associated with a reduction in microglia activation and pro-inflammatory IL-1 $\beta$  production. An improvement in memory impairment was found in the Morris water maze test [172]. Recently, similar results were reported after treating APP/PS1 mice with anandamide analog (NITyr). NITyr treatment improved motor coordination spatial memory and reduced A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 without affecting the APP expression [173].

Administration of CB2r agonists may affect microglia-dependent neuroinflammation. In addition, CB2r activation over CB1r compounds results in a more appealing therapeutic strategy since CB2r activation is not linked to the psychoactive effects linked to CB1r activation. Taken together, these findings, and considering the high levels of CB2r in microglia observed in preclinical and clinical studies, CB2r can be regarded as a novel target for AD therapy.

Table. 3 modulatory effects of CB2r of neuroinflammation in cognitive dysfunction and neurodegeneration

## **6. Conclusions**

Studies developed to the date indicated that CB2r is involved in emotional response and cognition. Its pharmacological modulation could be an exciting tool to treat different neuropsychiatric disorders. Despite the correlation between the immune system and the brain, the implication of CB2r needs to be further elucidated. CB2r expression in cells of immune systems points out the possible involvement of this system in psychiatry and neurology with the implication of CB2r. Here, different actions have been related to CB2r and its pharmacological modulation, including changes in inflammatory pathways and microglial functions associated with NF-KB, JAK, MAPK and AKT signaling pathways. Remarkably, a neuroprotective action has been proposed for this receptor, possibly by producing a shift of microglia towards an anti-inflammatory phenotype. In addition, CB2r modulation also changes the response of astrocytes and neurons on inflammation, protecting from BBB leakage or promoting neural plasticity. Consequently, the CB2r modulation may be a promising target to improve neuropsychiatric diseases associated with neuroinflammation.

Several human clinical trials are ongoing to look at the potential modulation of the cannabinoid system in human disease. However, no studies are currently underway with

selective modulation of the CB2r to treat neuropsychiatric illnesses. Among the following strategies, we find the use of FAAH inhibitors, for instance, using the compound PF-04457845 in Tourette syndrome (NCT02134080) or cannabis use disorder (NCT03386487). The potential use of URB597 for the treatment of schizophrenia has been shown to protect against NLRP3 inflammasome activation (97). However, no studies with MAGL inhibitors are currently underway. Furthermore, the potential use of CBD, directly modulating the EC system, to treat anxiety (NCT02548559), psychosis (NCT03883360), as well as the anxiety and agitation symptoms in mild to moderate Alzheimer Disease (NCT04075435), are currently being evaluated. Besides, the use of nabilone, an analog of THC, is also being studied for non-motor symptoms in patients with Parkinson's Disease (PD) (NCT03773796).

It is unclear whether the therapeutic effect could be due to the improvement of inflammation through modulation of the CB2r or other critical targets of the ECS. Therefore, the specific role of the CB2r in inflammation associated with psychiatric disorders requires further study.

## **7. Conflicts of Interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## **8. Author Contributions**

AM and TF designed, coordinated, and reviewed the sections and contents of the review manuscript. TF oversaw the organization to distribute the writing tasks among the authors and the article writing. AM, MSG-G, ST, and EN performed the literature searches. AM, MSG-G, ST, JM, and TF participated in the manuscript writing. All authors critically reviewed and approved the final version of the manuscript.

## **9. Funding**

The preparation of the manuscript was supported by “Instituto de Salud Carlos III” (RD. PI18/00576), RD21/0009/0008 “Red de Investigación en Atención Primaria de Adicciones”) and “Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas” (PNSD, 2019I012) from the Spanish Ministry of Health to JM, and “Ministerio de Ciencia e Innovación programa Ramón y Cajal” (RYC201722666) to T.F.

## **10. Acknowledgments**

We thank Sergio Javaloy for his excellent assistance in the graphical design.

## References

1. Osimo, E.F., et al., *Prevalence and correlates of low-grade systemic inflammation in adult psychiatric inpatients: An electronic health record-based study*. Psychoneuroendocrinology, 2018. **91**: p. 226-234.
2. Vogelzangs, N., et al., *Anxiety disorders and inflammation in a large adult cohort*. Transl Psychiatry, 2013. **3**: p. e249.
3. Hoge, E.A., et al., *Broad spectrum of cytokine abnormalities in panic disorder and posttraumatic stress disorder*. Depress Anxiety, 2009. **26**(5): p. 447-55.
4. Dowlati, Y., et al., *A meta-analysis of cytokines in major depression*. Biol Psychiatry, 2010. **67**(5): p. 446-57.
5. Ortiz-Dominguez, A., et al., *Immune variations in bipolar disorder: phasic differences*. Bipolar Disord, 2007. **9**(6): p. 596-602.
6. Misiak, B., J. Leszek, and A. Kiejna, *Metabolic syndrome, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease--the emerging role of systemic low-grade inflammation and adiposity*. Brain Res Bull, 2012. **89**(3-4): p. 144-9.
7. Menard, C., et al., *Immune and Neuroendocrine Mechanisms of Stress Vulnerability and Resilience*. Neuropsychopharmacology, 2017. **42**(1): p. 62-80.
8. Bauer, M.E. and A.L. Teixeira, *Inflammation in psychiatric disorders: what comes first?* Ann N Y Acad Sci, 2019. **1437**(1): p. 57-67.
9. Hodes, G.E., et al., *Neuroimmune mechanisms of depression*. Nat Neurosci, 2015. **18**(10): p. 1386-93.
10. Chen, G.Y. and G. Nunez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 826-37.
11. Franklin, T.C., C. Xu, and R.S. Duman, *Depression and sterile inflammation: Essential role of danger associated molecular patterns*. Brain Behav Immun, 2018. **72**: p. 2-13.
12. Serhan, C.N. and B.D. Levy, *Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators*. J Clin Invest, 2018. **128**(7): p. 2657-2669.
13. Tang, Y. and W. Le, *Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases*. Mol Neurobiol, 2016. **53**(2): p. 1181-1194.
14. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 13.
15. Varatharaj, A. and I. Galea, *The blood-brain barrier in systemic inflammation*. Brain Behav Immun, 2017. **60**: p. 1-12.
16. Niklasson, F. and H. Agren, *Brain energy metabolism and blood-brain barrier permeability in depressive patients: analyses of creatine, creatinine, urate, and albumin in CSF and blood*. Biol Psychiatry, 1984. **19**(8): p. 1183-206.
17. Sumner, J.A., et al., *Posttraumatic stress disorder onset and inflammatory and endothelial function biomarkers in women*. Brain Behav Immun, 2018. **69**: p. 203-209.
18. Muller, N., *COX-2 Inhibitors, Aspirin, and Other Potential Anti-Inflammatory Treatments for Psychiatric Disorders*. Front Psychiatry, 2019. **10**: p. 375.
19. Mechoulam, R. and L.A. Parker, *The endocannabinoid system and the brain*. Annu Rev Psychol, 2013. **64**: p. 21-47.
20. Sharir, H. and M.E. Abood, *Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor*. Pharmacol Ther, 2010. **126**(3): p. 301-13.
21. Marco, E.M., et al., *Endocannabinoid system and psychiatry: in search of a neurobiological basis for detrimental and potential therapeutic effects*. Front Behav Neurosci, 2011. **5**: p. 63.
22. Glass, M. and J.K. Northup, *Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors*. Mol Pharmacol, 1999. **56**(6): p. 1362-9.
23. Lu, H.C. and K. Mackie, *An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System*. Biol Psychiatry, 2016. **79**(7): p. 516-25.
24. Manzanares, J., et al., *Role of the endocannabinoid system in drug addiction*. Biochem Pharmacol, 2018. **157**: p. 108-121.

25. Callen, L., et al., *Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain*. J Biol Chem, 2012. **287**(25): p. 20851-65.
26. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders*. Biomolecules, 2020. **10**(11).
27. Zlebnik, N.E. and J.F. Cheer, *Beyond the CB1 Receptor: Is Cannabidiol the Answer for Disorders of Motivation?* Annu Rev Neurosci, 2016. **39**: p. 1-17.
28. Dantzer, R., et al., *From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(1): p. 46-56.
29. Remus, J.L. and R. Dantzer, *Inflammation Models of Depression in Rodents: Relevance to Psychotropic Drug Discovery*. Int J Neuropsychopharmacol, 2016. **19**(9).
30. Raison, C.L., L. Capuron, and A.H. Miller, *Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression*. Trends Immunol, 2006. **27**(1): p. 24-31.
31. Benito, C., et al., *Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation*. Br J Pharmacol, 2008. **153**(2): p. 277-85.
32. Hernangomez, M., et al., *CD200-CD200R1 interaction contributes to neuroprotective effects of anandamide on experimentally induced inflammation*. Glia, 2012. **60**(9): p. 1437-50.
33. Klegeris, A., C.J. Bissonnette, and P.L. McGeer, *Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor*. Br J Pharmacol, 2003. **139**(4): p. 775-86.
34. Eljaschewitsch, E., et al., *The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells*. Neuron, 2006. **49**(1): p. 67-79.
35. Ehrhart, J., et al., *Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation*. J Neuroinflammation, 2005. **2**: p. 29.
36. Rom, S. and Y. Persidsky, *Cannabinoid receptor 2: potential role in immunomodulation and neuroinflammation*. J Neuroimmune Pharmacol, 2013. **8**(3): p. 608-20.
37. Guo, K., et al., *Trans-caryophyllene suppresses hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF-kappaB activation in microglia*. J Mol Neurosci, 2014. **54**(1): p. 41-8.
38. Komorowska-Muller, J.A. and A.C. Schmole, *CB2 Receptor in Microglia: The Guardian of Self-Control*. Int J Mol Sci, 2020. **22**(1).
39. Kaminska, B., *MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1754**(1-2): p. 253-62.
40. Romero-Sandoval, E.A., et al., *Cannabinoid receptor type 2 activation induces a microglial anti-inflammatory phenotype and reduces migration via MKP induction and ERK dephosphorylation*. Mol Pain, 2009. **5**: p. 25.
41. Tang, J., et al., *Cannabinoid receptor 2 attenuates microglial accumulation and brain injury following germinal matrix hemorrhage via ERK dephosphorylation in vivo and in vitro*. Neuropharmacology, 2015. **95**: p. 424-33.
42. Maya-Lopez, M., et al., *A Cannabinoid Receptor-Mediated Mechanism Participates in the Neuroprotective Effects of Oleamide Against Excitotoxic Damage in Rat Brain Synaptosomes and Cortical Slices*. Neurotox Res, 2020. **37**(1): p. 126-135.
43. Oh, Y.T., et al., *Oleamide suppresses lipopolysaccharide-induced expression of iNOS and COX-2 through inhibition of NF-kappaB activation in BV2 murine microglial cells*. Neurosci Lett, 2010. **474**(3): p. 148-153.
44. Viscomi, M.T., et al., *Selective CB2 receptor agonism protects central neurons from remote axotomy-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway*. J Neurosci, 2009. **29**(14): p. 4564-70.
45. Salort, G., M. Alvaro-Bartolome, and J.A. Garcia-Sevilla, *Regulation of cannabinoid CB2 receptor constitutive activity in vivo: repeated treatments with inverse agonists reverse the acute activation of JNK and associated apoptotic signaling in mouse brain*. Psychopharmacology (Berl), 2017. **234**(6): p. 925-941.

46. Correa, F., et al., *Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB2 receptors: roles of ERK1/2, JNK, and NF-kappaB*. *Glia*, 2010. **58**(2): p. 135-47.
47. Fujii, M., et al., *Cannabinoid receptor type 2 agonist attenuates apoptosis by activation of phosphorylated CREB-Bcl-2 pathway after subarachnoid hemorrhage in rats*. *Exp Neurol*, 2014. **261**: p. 396-403.
48. Mecha, M., et al., *Microglia activation states and cannabinoid system: Therapeutic implications*. *Pharmacol Ther*, 2016. **166**: p. 40-55.
49. Mecha, M., et al., *Endocannabinoids drive the acquisition of an alternative phenotype in microglia*. *Brain Behav Immun*, 2015. **49**: p. 233-45.
50. Ma, L., et al., *Activation of murine microglial N9 cells is attenuated through cannabinoid receptor CB2 signaling*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **458**(1): p. 92-7.
51. Tao, Y., et al., *Cannabinoid receptor-2 stimulation suppresses neuroinflammation by regulating microglial M1/M2 polarization through the cAMP/PKA pathway in an experimental GMH rat model*. *Brain Behav Immun*, 2016. **58**: p. 118-129.
52. Luo, X.Q., et al., *Paeoniflorin exerts neuroprotective effects by modulating the M1/M2 subset polarization of microglia/macrophages in the hippocampal CA1 region of vascular dementia rats via cannabinoid receptor 2*. *Chin Med*, 2018. **13**: p. 14.
53. Ma, L., et al., *PGC-1alpha-Mediated Mitochondrial Biogenesis is Involved in Cannabinoid Receptor 2 Agonist AM1241-Induced Microglial Phenotype Amelioration*. *Cell Mol Neurobiol*, 2018. **38**(8): p. 1529-1537.
54. Schmöle, A.C., et al., *Cannabinoid receptor 2 deficiency results in reduced neuroinflammation in an Alzheimer's disease mouse model*. *Neurobiol Aging*, 2015. **36**(2): p. 710-9.
55. Belanger, M., I. Allaman, and P.J. Magistretti, *Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation*. *Cell Metab*, 2011. **14**(6): p. 724-38.
56. Femenia, T., et al., *Disrupted Neuroglial Metabolic Coupling after Peripheral Surgery*. *J Neurosci*, 2018. **38**(2): p. 452-464.
57. Sheng, W.S., et al., *Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes*. *Glia*, 2005. **49**(2): p. 211-9.
58. Jia, Y., et al., *JWH133 inhibits MPP(+)-induced inflammatory response and iron influx in astrocytes*. *Neurosci Lett*, 2020. **720**: p. 134779.
59. Tumati, S., et al., *Repeated morphine treatment-mediated hyperalgesia, allodynia and spinal glial activation are blocked by co-administration of a selective cannabinoid receptor type-2 agonist*. *J Neuroimmunol*, 2012. **244**(1-2): p. 23-31.
60. Alkhatib, M.S., et al., *Evidence for a role of endocannabinoids, astrocytes and p38 phosphorylation in the resolution of postoperative pain*. *PLoS One*, 2010. **5**(5): p. e10891.
61. Sheng, W.S., et al., *WIN55,212-2 inhibits production of CX3CL1 by human astrocytes: involvement of p38 MAP kinase*. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2009. **4**(2): p. 244-8.
62. Jing, N., et al., *Exogenous activation of cannabinoid-2 receptor modulates TLR4/MMP9 expression in a spinal cord ischemia reperfusion rat model*. *J Neuroinflammation*, 2020. **17**(1): p. 101.
63. Wang, Z., et al., *Cannabinoid receptor 2 agonist attenuates bloodbrain barrier damage in a rat model of intracerebral hemorrhage by activating the Rac1 pathway*. *Int J Mol Med*, 2018. **42**(5): p. 2914-2922.
64. Li, L., et al., *A cannabinoid receptor 2 agonist reduces blood-brain barrier damage via induction of MKP-1 after intracerebral hemorrhage in rats*. *Brain Res*, 2018. **1697**: p. 113-123.
65. Rajesh, M., et al., *CB2-receptor stimulation attenuates TNF-alpha-induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **293**(4): p. H2210-8.
66. Marchalant, Y., et al., *Cannabinoids attenuate the effects of aging upon neuroinflammation and neurogenesis*. *Neurobiol Dis*, 2009. **34**(2): p. 300-7.



67. Palazuelos, J., et al., *CB2 cannabinoid receptors promote neural progenitor cell proliferation via mTORC1 signaling*. J Biol Chem, 2012. **287**(2): p. 1198-209.
68. Li, Y. and J. Kim, *Distinct roles of neuronal and microglial CB2 cannabinoid receptors in the mouse hippocampus*. Neuroscience, 2017. **363**: p. 11-25.
69. Galan-Ganga, M., et al., *Cannabinoid CB2 Receptor Modulation by the Transcription Factor NRF2 is Specific in Microglial Cells*. Cell Mol Neurobiol, 2020. **40**(1): p. 167-177.
70. Rojo-Bustamante, E., et al., *CB2 Receptors and Neuron-Glia Interactions Modulate Neurotoxicity Generated by MAGL Inhibition*. Biomolecules, 2020. **10**(8).
71. Chung, T., et al., *Adolescent Binge Drinking*. Alcohol Res, 2018. **39**(1): p. 5-15.
72. WHO. *Depression Fact Sheet*. 2021 10 of December of 2021]; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>.
73. Kessler, R.C., et al., *Co-morbid major depression and generalized anxiety disorders in the National Comorbidity Survey follow-up*. Psychol Med, 2008. **38**(3): p. 365-74.
74. Deshpande, S.S., et al., *Stresses and Disability in Depression across Gender*. Depress Res Treat, 2014. **2014**: p. 735307.
75. Vieta, E., et al., *Epidemiology and costs of depressive disorder in Spain: the EPICO study*. Eur Neuropsychopharmacol, 2021. **50**: p. 93-103.
76. Terlizzi, M.A.V.a.E.P., *Symptoms of depression among adults: United States, 2019*, U.S.D.o.H.a.H.S.C.f.D.C.a.P.N.C.f.H. Statistics, Editor. 2020.
77. Arias de la Torre, J., et al., *Prevalence and age patterns of depression in the United Kingdom. A population-based study*. J Affect Disord, 2021. **279**: p. 164-172.
78. Tranter, R., et al., *Prevalence and outcome of partial remission in depression*. J Psychiatry Neurosci, 2002. **27**(4): p. 241-7.
79. Thase, M.E., *Update on partial response in depression*. J Clin Psychiatry, 2009. **70 Suppl 6**: p. 4-9.
80. Onaivi, E.S., et al., *Functional expression of brain neuronal CB2 cannabinoid receptors are involved in the effects of drugs of abuse and in depression*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1139**: p. 434-49.
81. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(7): p. 1773-84.
82. Smaga, I., et al., *Changes in the Brain Endocannabinoid System in Rat Models of Depression*. Neurotox Res, 2017. **31**(3): p. 421-435.
83. Marco, E.M., et al., *Consequences of early life stress on the expression of endocannabinoid-related genes in the rat brain*. Behav Pharmacol, 2014. **25**(5-6): p. 547-56.
84. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Alterations in Gene and Protein Expression of Cannabinoid CB2 and GPR55 Receptors in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Suicide Victims*. Neurotherapeutics, 2018.
85. Onaivi, E.S., et al., *Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects*. PLoS ONE, 2008. **3**(2): p. e1640.
86. Lazary, J., et al., *A functional variant of CB2 receptor gene interacts with childhood trauma and FAAH gene on anxious and depressive phenotypes*. J Affect Disord, 2019. **257**: p. 716-722.
87. Ortega-Alvaro, A., et al., *Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice*. Neuropsychopharmacology, 2011. **36**(7): p. 1489-504.
88. Cai, L., et al., *Antidepressant-like effects of penta-acetyl geniposide in chronic unpredictable mild stress-induced depression rat model: Involvement of inhibiting neuroinflammation in prefrontal cortex and regulating hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. Int Immunopharmacol, 2020. **80**: p. 106182.
89. Liu, B., et al., *Icariin exerts an antidepressant effect in an unpredictable chronic mild stress model of depression in rats and is associated with the regulation of hippocampal neuroinflammation*. Neuroscience, 2015. **294**: p. 193-205.
90. Farooq, R.K., et al., *Is unpredictable chronic mild stress (UCMS) a reliable model to study depression-induced neuroinflammation?* Behav Brain Res, 2012. **231**(1): p. 130-7.

91. Willner, P., *Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1997. **134**(4): p. 319-29.
92. Willner, P., *The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage*. *Neurobiol Stress*, 2017. **6**: p. 78-93.
93. Miller, A.H. and C.L. Raison, *The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target*. *Nat Rev Immunol*, 2016. **16**(1): p. 22-34.
94. Roohi, E., N. Jaafari, and F. Hashemian, *On inflammatory hypothesis of depression: what is the role of IL-6 in the middle of the chaos?* *J Neuroinflammation*, 2021. **18**(1): p. 45.
95. Wu, Z., et al., *Neurogenic hypothesis of positive psychology in stress-induced depression: Adult hippocampal neurogenesis, neuroinflammation, and stress resilience*. *Int Immunopharmacol*, 2021. **97**: p. 107653.
96. Ming, Z., G. Sawicki, and L.K. Bekar, *Acute systemic LPS-mediated inflammation induces lasting changes in mouse cortical neuromodulation and behavior*. *Neurosci Lett*, 2015. **590**: p. 96-100.
97. Casaril, A.M., et al., *Antidepressant-like effect of a new selenium-containing compound is accompanied by a reduction of neuroinflammation and oxidative stress in lipopolysaccharide-challenged mice*. *J Psychopharmacol*, 2017. **31**(9): p. 1263-1273.
98. O'Connor, J.C., et al., *Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice*. *Mol Psychiatry*, 2009. **14**(5): p. 511-22.
99. Carlisle, S.J., et al., *Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation*. *Int Immunopharmacol*, 2002. **2**(1): p. 69-82.
100. Sahu, P., et al., *Cannabinoid receptor 2 activation mitigates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and sickness behavior in mice*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2019. **236**(6): p. 1829-1838.
101. Youssef, D.A., H.M. El-Fayoumi, and M.F. Mahmoud, *Beta-caryophyllene alleviates diet-induced neurobehavioral changes in rats: The role of CB2 and PPAR-gamma receptors*. *Biomed Pharmacother*, 2019. **110**: p. 145-154.
102. Bahi, A., et al., *beta-Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice*. *Physiol Behav*, 2014. **135**: p. 119-24.
103. Hwang, E.S., et al., *Antidepressant-like effects of beta-caryophyllene on restraint plus stress-induced depression*. *Behav Brain Res*, 2020. **380**: p. 112439.
104. Galdino, P.M., et al., *The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, beta-caryophyllene, in male mice*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2012. **38**(2): p. 276-84.
105. Roche, M., et al., *In vivo modulation of LPS-induced alterations in brain and peripheral cytokines and HPA axis activity by cannabinoids*. *J Neuroimmunol*, 2006. **181**(1-2): p. 57-67.
106. Lataliza, A.A.B., et al., *Antidepressant-like effect of rosmarinic acid during LPS-induced neuroinflammatory model: The potential role of cannabinoid receptors/PPAR-gamma signaling pathway*. *Phytother Res*, 2021. **35**(12): p. 6974-6989.
107. Vieira, G., et al., *Antidepressant-Like Effect of Terpeneol in an Inflammatory Model of Depression: Involvement of the Cannabinoid System and D2 Dopamine Receptor*. *Biomolecules*, 2020. **10**(5).
108. Zoppi, S., et al., *Regulatory role of the cannabinoid CB2 receptor in stress-induced neuroinflammation in mice*. *Br J Pharmacol*, 2014. **171**(11): p. 2814-26.
109. Franklin, J.M., et al., *Cannabinoid 2 receptor- and beta Arrestin 2-dependent upregulation of serotonin 2A receptors*. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2013. **23**(7): p. 760-7.
110. Franklin, J.M. and G.A. Carrasco, *Cannabinoid-induced enhanced interaction and protein levels of serotonin 5-HT(2A) and dopamine D(2) receptors in rat prefrontal cortex*. *J Psychopharmacol*, 2012. **26**(10): p. 1333-47.

111. Franklin, J.M. and G.A. Carrasco, *Cannabinoid receptor agonists upregulate and enhance serotonin 2A (5-HT<sub>2A</sub>) receptor activity via ERK1/2 signaling*. *Synapse*, 2013. **67**(3): p. 145-59.
112. Huang, E.J. and L.F. Reichardt, *Neurotrophins: roles in neuronal development and function*. *Annu Rev Neurosci*, 2001. **24**: p. 677-736.
113. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Synaptic plasticity alterations associated with memory impairment induced by deletion of CB2 cannabinoid receptors*. *Neuropharmacology*, 2013. **73**: p. 388-96.
114. Lehman, J.A., V. Calvo, and J. Gomez-Cambronero, *Mechanism of ribosomal p70S6 kinase activation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in neutrophils: cooperation of a MEK-related, THR421/SER424 kinase and a rapamycin-sensitive, mTOR-related THR389 kinase*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(30): p. 28130-8.
115. Richter, J.D. and E. Klann, *Making synaptic plasticity and memory last: mechanisms of translational regulation*. *Genes Dev*, 2009. **23**(1): p. 1-11.
116. Zhou, X., et al., *Intracellular calcium and calmodulin link brain-derived neurotrophic factor to p70S6 kinase phosphorylation and dendritic protein synthesis*. *J Neurosci Res*, 2010. **88**(7): p. 1420-32.
117. Smith, M.A., et al., *Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus*. *J Neurosci*, 1995. **15**(3 Pt 1): p. 1768-77.
118. Cazakoff, B.N. and J.G. Howland, *Acute stress disrupts paired pulse facilitation and long-term potentiation in rat dorsal hippocampus through activation of glucocorticoid receptors*. *Hippocampus*, 2010. **20**(12): p. 1327-31.
119. Rivest, S., *Cannabinoids in microglia: a new trick for immune surveillance and neuroprotection*. *Neuron*, 2006. **49**(1): p. 4-8.
120. Tang, J., et al., *A selective CB2R agonist (JWH133) restores neuronal circuit after Germinal Matrix Hemorrhage in the preterm via CX3CR1(+) microglia*. *Neuropharmacology*, 2017. **119**: p. 157-169.
121. Hayley, S. and D. Litteljohn, *Neuroplasticity and the next wave of antidepressant strategies*. *Front Cell Neurosci*, 2013. **7**: p. 218.
122. Prowse, N. and S. Hayley, *Microglia and BDNF at the crossroads of stressor related disorders: Towards a unique trophic phenotype*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2021. **131**: p. 135-163.
123. Boorman, E., et al., *Crosstalk between endocannabinoid and immune systems: a potential dysregulation in depression?* *Psychopharmacology (Berl)*, 2016. **233**(9): p. 1591-604.
124. Su, F., et al., *Fluoxetine and S-citalopram inhibit M1 activation and promote M2 activation of microglia in vitro*. *Neuroscience*, 2015. **294**: p. 60-8.
125. Han, J., et al., *Uncovering sex differences of rodent microglia*. *J Neuroinflammation*, 2021. **18**(1): p. 74.
126. Association, A.P. *What are anxiety disorders?* 2021 [cited 2021 28/12/2021]; Available from: <https://www.psychiatry.org/patients-families/anxiety-disorders/what-are-anxiety-disorders>.
127. Grant, B.F., et al., *Prevalence, correlates, co-morbidity, and comparative disability of DSM-IV generalized anxiety disorder in the USA: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions*. *Psychol Med*, 2005. **35**(12): p. 1747-59.
128. Konac, D., et al., *Comorbidity Between Depression and Anxiety in Adolescents: Bridge Symptoms and Relevance of Risk and Protective Factors*. *J Psychopathol Behav Assess*, 2021. **43**(3): p. 583-596.
129. Struijs, S.Y., et al., *Psychological risk factors and the course of depression and anxiety disorders: A review of 15 years NESDA research*. *J Affect Disord*, 2021. **295**: p. 1347-1359.
130. Tiguman, G.M.B., M.T. Silva, and T.F. Galvao, *Prevalence of depressive and anxiety symptoms and their relationship with life-threatening events, tobacco dependence and*

- hazardous alcohol drinking: a population-based study in the Brazilian Amazon.* J Affect Disord, 2022. **298**(Pt A): p. 224-231.
131. Martin, J., et al., *Examining sex differences in neurodevelopmental and psychiatric genetic risk in anxiety and depression.* PLoS One, 2021. **16**(9): p. e0248254.
  132. Hajj, A., et al., *Clinical and genetic factors associated with anxiety and depression in breast cancer patients: a cross-sectional study.* BMC Cancer, 2021. **21**(1): p. 872.
  133. Hettema, J.M., et al., *The structure of genetic and environmental risk factors for anxiety disorders in men and women.* Arch Gen Psychiatry, 2005. **62**(2): p. 182-9.
  134. Scattolin, M.A.A., R.M. Resegue, and M.C.D. Rosario, *The impact of the environment on neurodevelopmental disorders in early childhood.* J Pediatr (Rio J), 2021.
  135. Berg, N., et al., *Stress, development and mental health study, the follow-up study of Finnish TAM cohort from adolescence to midlife: cohort profile.* BMJ Open, 2021. **11**(12): p. e046654.
  136. Bighelli, I., et al., *Antidepressants and benzodiazepines for panic disorder in adults.* Cochrane Database Syst Rev, 2016. **9**: p. CD011567.
  137. Skapinakis, P., et al., *Pharmacological and psychotherapeutic interventions for management of obsessive-compulsive disorder in adults: a systematic review and network meta-analysis.* Lancet Psychiatry, 2016. **3**(8): p. 730-739.
  138. Patterson, B. and M. Van Ameringen, *Augmentation Strategies for Treatment-Resistant Anxiety Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis.* Depress Anxiety, 2016. **33**(8): p. 728-36.
  139. Ammar, G., W.J. Naja, and A. Pelissolo, *[Treatment-resistant anxiety disorders: A literature review of drug therapy strategies].* Encephale, 2015. **41**(3): p. 260-5.
  140. Chapoutot, M., et al., *Cognitive Behavioral Therapy and Acceptance and Commitment Therapy for the Discontinuation of Long-Term Benzodiazepine Use in Insomnia and Anxiety Disorders.* Int J Environ Res Public Health, 2021. **18**(19).
  141. Bounds, C.G. and V.L. Nelson, *Benzodiazepines*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
  142. Schanzer, B., et al., *Novel investigational therapeutics for generalized anxiety disorder (GAD).* Expert Opin Investig Drugs, 2019. **28**(11): p. 1003-1012.
  143. Bruggeman, C. and C.S. O'Day, *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Toxicity*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
  144. Brusco, A., et al., *Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors.* Ann N Y Acad Sci, 2008. **1139**: p. 450-7.
  145. Gong, J.P., et al., *Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain.* Brain Res, 2006. **1071**(1): p. 10-23.
  146. Nishi, M., *Effects of Early-Life Stress on the Brain and Behaviors: Implications of Early Maternal Separation in Rodents.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(19).
  147. Rincel, M. and M. Darnaudery, *Maternal separation in rodents: a journey from gut to brain and nutritional perspectives.* Proc Nutr Soc, 2020. **79**(1): p. 113-132.
  148. Vetulani, J., *Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition.* Pharmacol Rep, 2013. **65**(6): p. 1451-61.
  149. Llorente-Berzal, A., et al., *Sex-dependent changes in brain CB1R expression and functionality and immune CB2R expression as a consequence of maternal deprivation and adolescent cocaine exposure.* Pharmacol Res, 2013. **74**: p. 23-33.
  150. Robertson, J.M., et al., *Anxious behavior induces elevated hippocampal Cb2 receptor gene expression.* Neuroscience, 2017. **352**: p. 273-284.
  151. Garcia-Gutierrez, M.S. and J. Manzanares, *Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice.* J Psychopharmacol, 2011. **25**(1): p. 111-20.
  152. Liu, Q.R., et al., *Cannabinoid type 2 receptors in dopamine neurons inhibits psychomotor behaviors, alters anxiety, depression and alcohol preference.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 17410.
  153. Onaivi, E.S., et al., *Behavioral effects of CB2 cannabinoid receptor activation and its influence on food and alcohol consumption.* Ann N Y Acad Sci, 2008. **1139**: p. 426-33.

154. Onaivi, E.S., et al., *Methods to study the behavioral effects and expression of CB2 cannabinoid receptor and its gene transcripts in the chronic mild stress model of depression*. *Methods Mol Med*, 2006. **123**: p. 291-8.
155. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABA(A) receptors*. *Br J Pharmacol*, 2012. **165**(4): p. 951-64.
156. Lisboa, S.F., et al., *Repeated social defeat-induced neuroinflammation, anxiety-like behavior and resistance to fear extinction were attenuated by the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2*. *Neuropsychopharmacology*, 2018. **43**(9): p. 1924-1933.
157. Kasatkina, L.A., S. Rittchen, and E.M. Sturm, *Neuroprotective and Immunomodulatory Action of the Endocannabinoid System under Neuroinflammation*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(11).
158. Tanaka, M., S. Sackett, and Y. Zhang, *Endocannabinoid Modulation of Microglial Phenotypes in Neuropathology*. *Front Neurol*, 2020. **11**: p. 87.
159. Amenta, P.S., et al., *A cannabinoid type 2 receptor agonist attenuates blood-brain barrier damage and neurodegeneration in a murine model of traumatic brain injury*. *J Neurosci Res*, 2012. **90**(12): p. 2293-305.
160. Sartori, A.C., et al., *The impact of inflammation on cognitive function in older adults: implications for healthcare practice and research*. *J Neurosci Nurs*, 2012. **44**(4): p. 206-17.
161. Byers, A.L. and K. Yaffe, *Depression and risk of developing dementia*. *Nat Rev Neurol*, 2011. **7**(6): p. 323-31.
162. Cassano, T., et al., *Cannabinoid Receptor 2 Signaling in Neurodegenerative Disorders: From Pathogenesis to a Promising Therapeutic Target*. *Front Neurosci*, 2017. **11**: p. 30.
163. Abate, G., D. Uberti, and S. Tambaro, *Potential and Limits of Cannabinoids in Alzheimer's Disease Therapy*. *Biology (Basel)*, 2021. **10**(6).
164. Benito, C., et al., *Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains*. *J Neurosci*, 2003. **23**(35): p. 11136-41.
165. Solas, M., et al., *CB2 receptor and amyloid pathology in frontal cortex of Alzheimer's disease patients*. *Neurobiol Aging*, 2013. **34**(3): p. 805-8.
166. Savonenko, A.V., et al., *Cannabinoid CB2 Receptors in a Mouse Model of Abeta Amyloidosis: Immunohistochemical Analysis and Suitability as a PET Biomarker of Neuroinflammation*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0129618.
167. Galan-Ganga, M., et al., *Cannabinoid receptor CB2 ablation protects against TAU induced neurodegeneration*. *Acta Neuropathol Commun*, 2021. **9**(1): p. 90.
168. Aso, E., et al., *Cannabinoid Receptor 2 Participates in Amyloid-beta Processing in a Mouse Model of Alzheimer's Disease but Plays a Minor Role in the Therapeutic Properties of a Cannabis-Based Medicine*. *J Alzheimers Dis*, 2016. **51**(2): p. 489-500.
169. Koppel, J., et al., *CB2 receptor deficiency increases amyloid pathology and alters tau processing in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. *Mol Med*, 2014. **20**: p. 29-36.
170. Schmole, A.C., et al., *Cannabinoid Receptor 2-Deficiency Ameliorates Disease Symptoms in a Mouse Model with Alzheimer's Disease-Like Pathology*. *J Alzheimers Dis*, 2018. **64**(2): p. 379-392.
171. Zhao, J., et al., *Activation of cannabinoid receptor 2 protects rat hippocampal neurons against Abeta-induced neuronal toxicity*. *Neurosci Lett*, 2020. **735**: p. 135207.
172. Wu, J., et al., *Activation of the CB2 receptor system reverses amyloid-induced memory deficiency*. *Neurobiol Aging*, 2013. **34**(3): p. 791-804.
173. Long, C.M., et al., *N-linoleyltyrosine exerts neuroprotective effects in APP/PS1 transgenic mice via cannabinoid receptor-mediated autophagy*. *J Pharmacol Sci*, 2021. **147**(4): p. 315-324.