

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Gabriel Henrique Hizo

**POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO CANABIDIOL NO  
TRATAMENTO DO TRANSTORNO BIPOLAR**

Porto Alegre

2019

Gabriel Henrique Hizo

**POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO CANABIDIOL NO  
TRATAMENTO DO TRANSTORNO BIPOLAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação  
apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul como requisito parcial para obtenção do título  
de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Márcia Kauer Sant'Anna

Coorientadora: MSc Giovana Bristot

Porto Alegre

2019

### CIP - Catalogação na Publicação

Hizo, Gabriel Henrique  
Potencial anti-inflamatório e antioxidante do  
canabidiol no tratamento do transtorno bipolar /  
Gabriel Henrique Hizo. -- 2019.  
117 f.  
Orientadora: Márcia Kauer-Sant'Anna.

Coorientadora: Giovana Bristot.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,  
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Transtorno Bipolar. 2. Canabidiol. 3.  
Inflamação. 4. Estresse oxidativo. I. Kauer-Sant'Anna,  
Márcia, orient. II. Bristot, Giovana, coorient. III.  
Titulo.

Gabriel Henrique Hizo

**POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO CANABIDIOL NO  
TRATAMENTO DO TRANSTORNO BIPOLAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 3 de dezembro de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ives Cavalcante Passos - UFRGS

---

Dr<sup>a</sup>. Bianca Pfaffenseller – McMaster University

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Kauer Sant'Anna - UFRGS (orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus, em primeiro lugar, por ser o autor da minha vida e pelo seu amor incondicional por mim. O meu melhor amigo, a quem eu dedico minha vida.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Márcia Kauer Sant'Anna, por me acolher no grupo de pesquisa e permitir a realização do trabalho da melhor forma possível.

À minha coorientadora MSc Giovana Bristot, pela amizade, pelo incentivo, pela paciência, pela intensa dedicação em todos os momentos da realização desse trabalho, e por ser meu referencial na profissão.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Psiquiatria Molecular: Diego Rabelo, Ellen Scotton, Fernanda Valiati, Mailton Vasconcelos, Rafael Colombo, Jacson Feiten, Bárbara Antqueviezc, Giovana Dalpiaz e Paola Ziani, pela amizade e ensinamentos. Em especial ao Diego, pelo importante auxílio na análise dos resultados e elaboração deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Psiquiatria Molecular, por serem referência na pesquisa.

Aos meus colegas e amigos de turma.

Aos meus pais, pelo amor e pelas orações.

## RESUMO

O Transtorno Bipolar (TB) é caracterizado por oscilações de humor, alternando entre episódios de mania ou hipomania e depressão. Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a fisiopatologia do TB, sobretudo eventos relacionados a alterações no sistema imunológico, como o aumento do estresse oxidativo e aumento da inflamação. O fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), é um fator de transcrição ligado à resposta antioxidante do organismo, enquanto o fator nuclear kappa B (NF-κB) está envolvido na transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória. O que se observa em doenças crônicas, como no TB, é um desequilíbrio em relação a esses dois fatores de transcrição: NF-κB se encontra com um nível de expressão aumentado, enquanto o nível de Nrf2 está reduzido. Assim, o objetivo desse estudo está centrado em discutir o possível efeito positivo do canabidiol (CBD) em pacientes com TB através da modulação de NF-κB e Nrf2. Foi avaliado, através da técnica de qPCR, a expressão relativa dos genes NF-κB, Nrf2, monoacilglicerol lipase (MGLL) e hidrolase de amida de ácidos graxos (FAAH), a partir de amostras de sangue total periférico de 28 pacientes com TB – onde 14 foram tratados com CBD e 14 com placebo – e 28 controles saudáveis (indivíduos que não apresentam doenças neuropsiquiátricas), totalizando um *n* de 56 indivíduos. Os pacientes apresentaram aumento significativo na expressão gênica de NF-κB, Nrf2, MGLL e FAAH em relação ao grupo controle. O grupo paciente apresentou redução significativa na expressão gênica de NF-κB e Nrf2 após 8 semanas de tratamento com CBD ou placebo (W08), quando comparado com o grupo paciente antes de iniciar o tratamento (W00). Em relação à MGLL e FAAH, não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo paciente em W00 e o grupo paciente em W08. Destacamos que estes são resultados preliminares de um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo (*NCT 03310593*). Nossos achados mostram uma tendência de melhora dos pacientes, uma vez que NF-κB teve seus níveis de expressão gênica equilibrados com os de Nrf2 – e isso implica numa potencial redução dos componentes inflamatórios. Além disso, após a intervenção com CBD ou placebo, observou-se redução na expressão desses genes, em um nível próximo ao observado no grupo controle, reforçando o possível potencial anti-inflamatório e antioxidante do CBD.

Palavras-chave: Transtorno Bipolar. Canabidiol. Fator Nuclear Kappa B. Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado ao Fator 2. Monoacilglicerol Lipase. Amida Hidrolase de Ácidos Graxos.

## ABSTRACT

Bipolar disorder (BD) is characterized by mood swings, alternating between mania or hypomania and depression. Several mechanisms have been proposed to explain the pathophysiology of BD, especially events related to changes in the immune system, such as increased oxidative stress and inflammation. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a transcription factor involved in the antioxidant response, while nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) is involved in the transcription of genes related to inflammatory response. In chronic diseases, such as BD, it is observed an imbalance in these two transcription factors: NF- $\kappa$ B has an increased expression level, while Nrf2 level is reduced. Thus, this study aims to discuss the possible positive effect of cannabidiol (CBD) in BD patients by modulating NF- $\kappa$ B and Nrf2. Relative expression of the genes NF- $\kappa$ B, Nrf2, monoacylglycerol lipase (MGLL) and fatty acid amide hydrolase (FAAH) were evaluated by qPCR technique using peripheral blood from 28 BD patients – of these, 14 were treated with CBD and 14 with placebo - and 28 healthy controls (individuals without neuropsychiatric diseases), in a total of 56 subjects. Patients showed a significant increase in NF- $\kappa$ B, Nrf2, MGLL and FAAH gene expression compared to the control group. The patient group showed a significant reduction in NF- $\kappa$ B and Nrf2 gene expression after 8 weeks of treatment with CBD or placebo (W08) when compared to the patient group before starting treatment (W00). Regarding MGLL and FAAH, no significant differences were found between the group of patients in W00 and the group of patients in W08. We highlight that these are preliminary results from a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial (NCT 03310593). Our results show a tendency for patients to improve their clinical condition, since NF- $\kappa$ B had its gene expression level balanced with Nrf2 - and this implies a potential reduction in inflammatory components. Besides, after an intervention with CBD or placebo, reducing the expression of these genes to a level close to the control group reinforces the possible anti-inflammatory and antioxidant effects of CBD.

Keywords: Bipolar Disorder. Cannabidiol. Nuclear Factor Kappa B. Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2. Monoacylglycerol Lipase. Fatty Acid Amide Hydrolase.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Alguns fatores associados ao TB.....	13
Tabela 2 – Principais genes com polimorfismos relacionados ao TB.....	16



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AC</b>	Adenilato ciclase
<b>AEA</b>	N-araquidonoiletanolamina
<b>2-AG</b>	2-araquidonoil glicerol
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês <i>brain-derived neurotrophic factor</i> )
<b>CBD</b>	Canabidiol
<b>COX2</b>	Ciclo-oxigenase 2
<b>CPF</b>	Córtex pré-frontal
<b>CB1</b>	Receptor canabinoide tipo 1 (do inglês <i>cannabinoid receptor type 1</i> )
<b>CB2</b>	Receptor canabinoide tipo 2 (do inglês <i>cannabinoid receptor type 2</i> )
<b>DAGLs</b>	Diacilglicerol lipases (do inglês <i>diacylglycerol lipases</i> )
<b>EMT</b>	Transportador de membrana de endocanabinoide (do inglês <i>endocannabinoid membrane transporter</i> )
<b>ENT</b>	Transportador de nucleosídeos equilibrativos 1 (do inglês <i>equilibrative nucleoside transporter 1</i> )
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ET-1</b>	Endotelina 1
<b>FAAH</b>	Amida hidrolase de ácidos graxos (do inglês <i>fatty acid amide hydrolase</i> )
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico (do inglês <i>gamma-aminobutyric acid</i> )
<b>GCL</b>	Glutamato cisteína ligase
<b>GWAS</b>	Estudos de associação genômica global (do inglês <i>Genome Wide Association Studies</i> )
<b>GPCRs</b>	Receptores acoplados à proteína G (do inglês <i>G protein-coupled receptors</i> )
<b>GPx</b>	Glutationa peroxidase
<b>GR</b>	Glutationa redutase
<b>GSK3B</b>	Glicogênio sintase quinase 3 beta (do inglês <i>glycogen synthase kinase 3 beta</i> )
<b>GST</b>	Glutationa S-transferase

<b>HPA</b>	Hipotálamo-pituitária-adrenal
<b>HO-1</b>	Heme oxigenase 1
<b>IFNB</b>	Interferon-beta
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzível (do inglês <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
<b>IKC</b>	Complexo ikb quinase (do inglês <i>ikb kinase complex</i> )
<b>JAK</b>	Janus quinases (do inglês <i>Janus kinase</i> )
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MGLL</b>	Monoacilglicerol lipase (do inglês <i>monoacylglycerol lipase</i> )
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
<b>NAPE-PLD</b>	Fosfolipase D específica da N-acil-fosfatidiletanolamina (do inglês <i>N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D</i> )
<b>NAT</b>	N-aciltransferase (do inglês <i>N-acetyltransferase</i> )
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear kappa B (do inglês <i>nuclear factor kappa B</i> )
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato (do inglês <i>N-methyl-D-aspartate</i> )
<b>NO</b>	Óxido nítrico (do inglês <i>inducible nitric oxide</i> )
<b>NQO1</b>	NAD(P)H quinona oxidoreductase 1
<b>Nrf2</b>	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (do inglês <i>nuclear factor erythroid-2-related factor 2</i> )
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PLC</b>	Fosfolipase C (do inglês <i>phospholipase C</i> )
<b>PKA</b>	Proteína quinase A (do inglês <i>protein kinase A</i> )
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (do inglês <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i> )

<b>SO<sub>2</sub></b>	Dióxido de enxofre
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>STAT</b>	Transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição (do inglês <i>signal transducers and activators of transcription</i> )
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (do inglês <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> )
<b>TB</b>	Transtorno bipolar
<b>THC</b>	Tetrahydrocannabinol
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumor necrosis factor</i> )
<b>TNFR1</b>	Receptor do fator de necrose tumoral tipo 1 (do inglês <i>tumor necrosis factor receptor 1</i> )
<b>Trx</b>	Tioredoxina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1	TRANSTORNO BIPOLAR .....	12
<b>1.1.1</b>	<b>Definição e epidemiologia</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Fisiopatologia do TB</b> .....	<b>14</b>
1.1.2.1	Aspectos gerais .....	14
1.1.2.2	Alterações neuroanatômicas .....	15
1.1.2.3	Alterações genéticas .....	16
1.1.2.4	Estresse oxidativo e marcadores inflamatórios: NF- $\kappa$ B e Nrf2 .....	17
1.2	SISTEMA ENDOCANABINOIDE .....	19
<b>1.2.1</b>	<b>Aspectos gerais</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Principais receptores endocanabinoides: CB1 e CB2</b> .....	<b>20</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Principais endocanabinoides: AEA e 2-AG</b> .....	<b>21</b>
<b>1.2.4</b>	<b>Sistema endocanabinoide e os fatores nucleares NF-<math>\kappa</math>B e Nrf2</b> .....	<b>22</b>
1.3	CANABIDIOL .....	24
<b>1.3.1</b>	<b>Estrutura e bioquímica</b> .....	<b>24</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Potencial terapêutico nos transtornos psiquiátricos</b> .....	<b>24</b>
<b>1.3.3</b>	<b>Potencial antioxidante e anti-inflamatório</b> .....	<b>25</b>
1.4	JUSTIFICATIVA .....	26
1.5	OBJETIVOS .....	26
<b>1.5.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>26</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>
	<b>ANEXO A – CARTAS DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b> ...	<b>62</b>
	<b>ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA FRONTIERS IN</b> <b>PSYCHIATRY</b> .....	<b>67</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 TRANSTORNO BIPOLAR

### 1.1.1 Definição e epidemiologia

O Transtorno Bipolar (TB) é uma doença crônica, caracterizada por oscilações de humor, alternando entre episódios de mania ou hipomania e depressão (VIETA et al., 2018). O TB classifica-se em TB tipo I e tipo II, sendo o tipo I aquele com maior presença de episódios de mania, e o tipo II uma forma do transtorno em que os episódios maníacos são mais brandos ou mais breves, predominando episódios depressivos (HARRISON; GEDDES; TUNBRIDGE, 2018; SHIM et al., 2014; TONDO; VÁZQUEZ; BALDESSARINI, 2017). Ambas as fases, maníaca e depressiva, podem ser graves e comprometer o funcionamento normal do organismo (SWANN et al., 2009). Os sinais e sintomas característicos de um episódio maníaco são agitação psicomotora, rapidez na fala, problemas para dormir, sensação de que pode fazer muitas coisas ao mesmo tempo, entre outros. Já em um episódio depressivo, há um forte sentimento de tristeza e vazio, preocupação exagerada, prejuízo na memória e pensamento suicida, por exemplo (TONDO; VÁZQUEZ; BALDESSARINI, 2017).

O professor de psiquiatria Emil Kraepelin (1856-1926) foi o primeiro pesquisador a documentar a progressão no TB, e observou que os períodos maníacos poderiam variar de semanas a meses (ZIVANOVIC; NEDIC, 2012), enquanto os períodos no estado depressivo são geralmente mais persistentes, podendo durar anos (TONDO; VÁZQUEZ; BALDESSARINI, 2017). Geralmente o TB tem seu início e desenvolvimento no começo da vida adulta, por volta dos vinte anos de idade (NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH, 2018), porém esse é um dado difícil de ser afirmado, já que em muitos casos o TB é tardiamente diagnosticado ou erroneamente tratado como Depressão Maior, devido à similaridade e sobreposição dos sintomas nessas doenças psiquiátricas (PHILLIPS; KUPFER, 2013). Nos casos em que a doença tem início precoce, tem-se encontrado uma associação entre um pior prognóstico nesses pacientes, resultando em alternâncias mais rápidas entre os episódios e maior ideação suicida (BAUER; PFENNIG, 2005; LEBOYER et al., 2005).

Diversas comorbidades estão associadas ao TB, como julgamento ou estigma social, aumento na taxa de suicídio, obesidade (TULLY et al., 2018), diabetes (CALKIN et al., 2013) e doenças cardiovasculares (PARKER, 2010; SHAMSAEI et al., 2013; WAGECK et al., 2018). Além disso, em termos mundiais, tem-se observado uma prevalência do TB em cerca

de 2% da população (MERIKANGAS et al., 2011), o que tem impulsionado o surgimento de mais pesquisas nessa área. Alguns estudos avaliam os fatores associados ao TB e sugerem as prevalências apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Alguns fatores associados ao TB.

<b>Fator</b>	<b>Prevalência</b>	<b>Referência</b>
<b>Sexo</b>	Prevalências similares entre os sexos	(ROBINS; REGIER, 1991; SCHAFFER et al., 2006; SEEDAT et al., 2009)
<b>Idade</b>	Maior prevalência em grupos de menor faixa etária	(MORENO; ANDRADE, 2005; ROBINS; REGIER, 1991)
<b>Estado civil</b>	Maior prevalência entre indivíduos separados, divorciados ou viúvos	(MERIKANGAS; PATO, 2009)
<b>Nível educacional e socioeconômico</b>	Maior prevalência em pessoas economicamente desfavorecidas	(KESSLER et al., 1997; ROBINS; REGIER, 1991)
<b>Idade de início</b>	Início precoce do TB está associado a piores prognósticos	(BAUER; PFENNIG, 2005)
<b>Incapacidade e qualidade de vida</b>	Prejuízo de saúde e prejuízo social	(BURNETT-ZEIGLER; BOHNERT; ILGEN, 2013; WHITEFORD et al., 2013)

Embora o TB não tenha cura, diversos tratamentos e estratégias farmacológicas têm sido propostos, entre eles o lítio, que por muitos anos tem sido o tratamento padrão-ouro para o TB no Reino Unido (SEVERUS; BAUER; GEDDES, 2018). Estudos apresentam o lítio com efeitos positivos na cognição, prevenção ao suicídio, aumento do comprimento dos telômeros e redução na incidência de demência, num tratamento a longo prazo (POST, 2018). O ácido valproico também tem sido apresentado como uma alternativa para o tratamento do TB, atuando como estabilizador de humor (CHIU et al., 2013), embora diversas evidências mostrem seus efeitos negativos na gravidez (ORNOY, 2009). Carbamazepina e lamotrigina,

fármacos anticonvulsivantes, também são utilizados no tratamento do TB, onde as suas doses precisam ser cuidadosamente monitoradas e aumentadas de forma gradual (CHEN; LIN, 2012; PRABHAVALKAR; POOVANPALLIL; BHATT, 2015). Fármacos antipsicóticos, como aripiprazol (MUNEER, 2016b), olanzapina (NARASIMHAN; BRUCE; MASAND, 2007), quetiapina (THASE, 2008) e risperidona (SAJATOVIC; SUBRAMONIAM; FULLER, 2006) também podem ser prescritos para atuarem como estabilizadores de humor de longo prazo, sobretudo em episódios graves de mania. Por fim, outra opção farmacológica para pacientes refratários – isto é – pacientes que não respondem da forma esperada ao tratamento, é a clozapina (BASTIAMPILLAI et al., 2016).

### **1.1.2 Fisiopatologia do TB**

#### **1.1.2.1 Aspectos gerais**

A fisiopatologia do TB pode ser compreendida como um conjunto de alterações fisiológicas, que compreendem fatores genéticos, neurotransmissores, resiliência celular, neurotrofinas, inflamação e estresse oxidativo (KAPCZINSKI; QUEVEDO, 2015). Elhaik e Zandi (2015) trazem um estudo interessante que resume alguns eventos relacionados à progressão do TB, tais como: excessiva liberação de dopamina durante os episódios maníacos; modulação dos níveis de glutamato por estabilizadores de humor; diminuição de neurotrofinas - como o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) - que desempenham um papel fundamental na sobrevivência e proliferação neuronal; aumento do estresse oxidativo, que está relacionado com o funcionamento e a geração de energia na célula; e aumento da inflamação, que está relacionada não só com as doenças psiquiátricas, mas com diversos mecanismos fisiopatológicos dos mamíferos (ELHAIK; ZANDI, 2015).

Em relação às alterações neuroquímicas, um importante neurotransmissor envolvido no TB é a dopamina (ASHOK et al., 2017). Tem sido observada uma elevação nos níveis dopaminérgicos em episódios maníacos (JUN et al., 2014), o que explica o estado de agitação. Estudos com estimulantes, como a anfetamina, têm mostrado resultados semelhantes, induzindo o aumento de dopamina na fenda sináptica, bem como induzindo episódios maníacos (BRAMNESS et al., 2012). Outro neurotransmissor cujos níveis também estão elevados no córtex pré-frontal (CPF) em pacientes com TB é o glutamato (JUN et al., 2014). Essa alteração nos níveis de glutamato pode estar associada a alterações mitocondriais (YOUNG, 2007). Outros estudos identificaram aumento nos níveis de noradrenalina (KAPCZINSKI; FREY; ZANNATTO, 2004; KURITA, 2016), e redução nos níveis de

serotonina (MAHMOOD; SILVERSTONE, 2001). A hipótese mais frequente na literatura científica é de que a depressão bipolar está associada ao aumento da função colinérgica, enquanto que o episódio maníaco talvez esteja mais associado ao aumento da função das catecolaminas (KAPCZINSKI; QUEVEDO, 2015). Todas essas alterações neuroquímicas podem contribuir direta e indiretamente na fisiopatologia do TB.

Alterações nas neurotrofinas também podem estar associadas à fisiopatologia do TB. Uma das mais conhecidas é o BDNF, que é encontrado em grandes quantidades no cérebro de humanos e apresenta importante função na neuroplasticidade (KAPCZINSKI et al., 2008). Em pacientes bipolares, sobretudo em estágio tardio, foram encontrados níveis reduzidos de BDNF sérico quando comparados ao estágio inicial da doença (KAUER-SANT'ANNA et al., 2009). Esses e outros achados sugerem uma íntima relação entre a redução de BDNF no cérebro com a perda de neuroplasticidade e consequente déficit cognitivo (PFAFFENSELLER et al., 2018).

Outra alteração fisiopatológica no TB é a disfunção mitocondrial, que afeta direta e indiretamente diversos mecanismos, desde disfunções no metabolismo energético até alterações na liberação de neurotransmissores (CLAY; SILLIVAN; KONRADI, 2011). Além disso, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), envolvido no estresse, acaba por controlar de forma defeituosa a liberação do hormônio cortisol (FRIES et al., 2014). Algumas consequências da circulação elevada de cortisol em pacientes bipolares são excitotoxicidade no sistema nervoso central (SNC), inflamação e apoptose celular (MANENSCHIJN et al., 2012).

#### 1.1.2.2 Alterações neuroanatômicas

Algumas anormalidades cerebrais têm sido encontradas em pacientes bipolares, dentre elas o volume aumentado da amígdala e falha das regiões corticais pré-frontais (BALOCH et al., 2010; GARRETT; CHANG, 2008). Além disso, verificam-se também alterações no volume de regiões do lobo frontal (KAMEYAMA et al., 2006), CPF subgenua (DREVETS; SAVITZ; TRIMBLE, 2008), gânglios da base (HWANG et al., 2006), lobo temporal (JONES et al., 2009), diminuição no volume do corpo caloso e consequente aumento dos ventrículos (PEARLSON et al., 1984; SARRAZIN et al., 2015; SWAYZE et al., 1990). Um estudo reuniu essas alterações neuroanatômicas mencionadas e identificou uma relação entre elas e a destruição axonal e alteração na substância branca, sugerindo um novo campo de desenvolvimento de fármacos, isto é, fármacos que não prejudiquem o processo de mielinização da substância branca em pacientes bipolares (MARLINGE; BELLIVIER;



HOUENOU, 2014). Por fim, alguns estudos associam essas alterações com o comportamento: alterações da amígdala, gânglios da base, giro do cíngulo e ínsula podem ser responsáveis pela falha no processamento das emoções, o que resulta na oscilação do humor no TB (SOARES; MANN, 1997); e alterações no CPF, gânglios da base e hipocampo podem estar associadas às características neuropsicológicas durante o estado de mania (KEENER; PHILLIPS, 2007; MACHADO-VIEIRA et al., 2005).

### 1.1.2.3 Alterações genéticas

O TB é uma doença multifatorial, com elevada herdabilidade genética (BIENVENU; DAVYDOW; KENDLER, 2011). Estudos de associação genômica global (GWAS) identificaram os principais genes com polimorfismos associados ao TB (Tabela 2). Um desses estudos avaliou - através dos métodos de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), sequenciamento de Sanger e reação em cadeia da polimerase (PCR) - genes relacionados a atividades neuronais, inflamatórias e comportamentais. Entre os achados, encontrou-se associação de interleucina (IL) 6 com episódios psicóticos e de IL-10 com episódios depressivos, sugerindo uma possível relação entre esses polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e a fisiopatologia do TB.

**Tabela 2.** Principais genes com polimorfismos relacionados ao TB.

<b>Estudo</b>	<b>População</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>Genes</b>
<b>Ferreira</b>	Mista	4387	6209	CACNA1C, ANK3
<b>PGC-BD</b>	Mista	7481 e 4496	9250 e 42422	CACNA1C, ODZ4
<b>Cichon</b>	Germânica	6030	31749	NCAN
<b>Chen</b>	Metanálise	6558 e 484	8187 e 1823	TRANK1
<b>Muhleisen</b>	Mista	9747	14278	ANK3, ODZ4, TRANK1, ADCY2

**Fonte:** Adaptada de Kapczinski & Quevedo, Capítulo 4, 2ª edição.

#### 1.1.2.4 Estresse oxidativo e marcadores inflamatórios: NF- $\kappa$ B e Nrf2

Diversos estudos avaliaram o estresse oxidativo - caracterizado pela desproporção entre espécies reativas de oxigênio (ERO) e agentes antioxidantes - que resulta em diversos danos celulares e fisiológicos (BERK et al., 2011; JACOBY et al., 2016; TANG; WANG, 2013). Entre os danos resultantes do aumento de EROs, por exemplo, temos o dano ao material genético, que traz consigo toda uma cascata de disfunções, comprometendo a célula como um todo (CINGI YIRÜN et al., 2016). As ERO resultam do escape de elétrons durante o metabolismo mitocondrial, e esse acontecimento se estende a uma disfunção mitocondrial que – como mencionado anteriormente – está associada à fisiopatologia do TB (ERDEM et al., 2014). O lítio, um dos tratamentos farmacológicos prescritos para pacientes bipolares, tem sido responsável pelo aumento dos níveis de enzimas antioxidantes durante episódios depressivos, e diminuição de ácido tiobarbitúrico (TBARS) – indicador de peroxidação lipídica (DE SOUSA et al., 2014). Um estudo avaliou o estresse oxidativo ao longo da vida de pacientes com TB e os resultados encontrados sustentam a hipótese de que as ERO são encontradas em níveis elevados principalmente na juventude, mas tem efeito persistente em pacientes bipolares até a fase final da vida (ANDREAZZA et al., 2015).

O TB também é definido como uma doença inflamatória, uma vez que apresenta disfunções imunológicas (MUNEER, 2016a). Alterações inflamatórias em pacientes bipolares são verificadas tanto na periferia como em níveis centrais, e diversos fatores podem contribuir para a ocorrência dessas alterações, a dizer: estresse, genética, epigenética e até microbiota intestinal (FRIES et al., 2019). Um estudo sugere que indivíduos com TB tendem a apresentar um estado pró-inflamatório, o que vai ao encontro da teoria da neuroprogressão e envelhecimento acelerado; no entanto, ainda não se sabe se a inflamação é uma das causas ou se aparece como consequência do TB (VAN DEN AMEELE et al., 2018). Estudos apontam para um aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias - tais como IL-2, IL-4 e IL-6 - durante episódios maníacos, quando comparados com indivíduos saudáveis; enquanto que em episódios depressivos foi observada uma elevação nos níveis de IL-6 (BRIETZKE et al., 2009; KUNZ et al., 2011). Além disso, outro estudo identificou alterações em algumas quimiocinas em pacientes bipolares: aumento nos níveis plasmáticos de CCL11, CCL24 e CXCL10; e diminuição nos níveis de CXCL8 – reforçando a disfunção imunológica no TB (BARBOSA et al., 2013).

O fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), é um fator de transcrição ligado ao metabolismo de lipídeos, manutenção da glicemia e resposta inflamatória, além de ser um regulador fundamental na resposta antioxidante do organismo, evitando os efeitos nocivos das ERO (DINKOVA-KOSTOVA; ABRAMOV, 2015; MA, 2013). O Nrf2, em condições normais, localiza-se no citoplasma e está em baixas concentrações. No entanto, quando a célula é exposta a um estímulo estressor interno ou externo, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, as moléculas Keap1 – que estão associadas ao Nrf2 num estado fisiológico normal – têm sua conformação alterada e, conseqüentemente, se desprendem do Nrf2, permitindo que este se desloque para o núcleo e se associe à proteína sMaf (RAMEZANI; NAHAD; FAGHIHLOO, 2018; TONELLI; CHIO; TUVESON, 2018; VELICHKOVA; HASSON, 2005; WANG et al., 2016). Uma vez no núcleo, o Nrf2 modula a transcrição de genes relacionados a processos celulares específicos, como os envolvidos com proteção antioxidante. Alguns genes-alvo se destacam nesse contexto, como os da heme oxigenase 1 (HO-1), glutatona S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR), glutamato cisteína ligase (GCL), tioredoxina (Trx), glutatona peroxidase (GPx), NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO1), entre outros (TONELLI; CHIO; TUVESON, 2018; ZOJA; BENIGNI; REMUZZI, 2014).

Nesse cenário, outro fator de transcrição nuclear importante é o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). A sua principal função é modular a transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória, mas também está relacionado com apoptose e crescimento celular (BAEUERLE; HENKEL, 1994; LIU et al., 2017). Alguns dos seus genes-alvo são os relacionados a citocinas inflamatórias - fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, por exemplo - óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009; PAHL, 1999).

Em um processo inflamatório crônico, como no caso do TB (MUNEER, 2016a; STERTZ; MAGALHÃES; KAPCZINSKI, 2013), as células do sistema imune estão ativadas, recrutando cada vez mais mediadores inflamatórios, resultando na ativação de NF- $\kappa$ B, de uma forma que a sua ativação se sobressai à atividade de Nrf2 – que tem papel de regular negativamente a transcrição de citocinas e mediadores pró-inflamatórios. A literatura apresenta vasta conexão entre o NF- $\kappa$ B e os transtornos neuropsiquiátricos, mostrando, por exemplo, que uma desregulação na via de NF- $\kappa$ B pode contribuir para a etiologia do TB (MIKLOWITZ et al., 2016). Algumas evidências mostram um envolvimento da transcrição de fatores relacionados a NF- $\kappa$ B no córtex frontal de pacientes bipolares. De forma mais específica, o que foi visto é que os níveis de NF- $\kappa$ B2, uma subunidade de NF- $\kappa$ B, estão

elevados nesses pacientes. Também têm estudos que mostram evidências de um aumento significativo de NF-κB em pacientes com depressão, quando comparado com controles. Estudos pós-mortem avaliando níveis proteicos de marcadores de excitotoxicidade e neuroinflamação, sobretudo no córtex frontal, também indicaram elevados níveis de NF-κB. Em relação ao tratamento farmacológico e os níveis de NF-κB, pacientes que utilizam ácido valproico ou lítio apresentam redução nos níveis de NF-κB. No caso do lítio, sabe-se que isso acontece porque ele é um inibidor direto da glicogênio sintase quinase 3β (GSK3β), que regula, por sua vez, NF-κB. Portanto, o que se observa em transtornos psiquiátricos de uma forma geral é um desequilíbrio em relação a esses dois fatores de transcrição: NF-κB se encontra com um nível de expressão aumentado, enquanto o nível de Nrf2 está reduzido (WARDYN; PONSFORD; SANDERSON, 2015).

## 1.2 SISTEMA ENDOCANABINOIDE

### 1.2.1 Aspectos gerais

Grande parte dos pacientes que são diagnosticados com TB é tratada com uma combinação de fármacos, os quais, em sua maioria, possuem alguma desvantagem. Por exemplo, o lítio, embora seja considerado o padrão ouro como estabilizador do humor (BALON, 2009), possui baixa aceitação, além de estimular episódio maníaco se retirado de modo abrupto; valproato de sódio traz riscos a mulheres em idade fértil; lamotrigina requer muito cuidado no controle da dose; entre outros (ASHTON et al., 2005). Por essa razão, tem-se buscado outros fármacos os quais possam ser usados no tratamento do TB, que apresentem boa eficácia e menos efeitos colaterais. Nesse sentido, considerando que o sistema endocanabinoide parece exercer um papel essencial na fisiopatologia da doença, este sistema pode ser um alvo interessante para o estudo de novos fármacos.

Os endocanabinoides são particularmente interessantes devido à sua forma de ação retrógrada, ou seja, do neurônio pós em direção ao pré-sináptico; da sua síntese sob demanda; dos seus receptores principais - receptor canabinoide tipo 1 (CB1) e receptor canabinoide tipo 2 (CB2), que são acoplados a uma proteína G; e pelas enzimas que degradam esses endocanabinoides (LU; MACKIE, 2016). Os endocanabinoides mais estudados são o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) e a anandamida, também conhecida como N-araquidonoiletanolamina (AEA), os quais são metabolizados pelas enzimas lipase monoacilglicerol (MGLL) e amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH), respectivamente, e

atuam como mensageiros neurais, influenciando, de forma complexa, em diversos mecanismos de neurotransmissão no organismo (SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010).

### 1.2.2 Principais receptores endocanabinoides: CB1 e CB2

O receptor CB1 foi descoberto antes do CB2 (DEVANE et al., 1988), e está presente em maior quantidade no SNC, embora também seja encontrado em menor quantidade no sistema nervoso periférico (KENDALL; YUDOWSKI, 2016). Os receptores CB1 estão localizados nos terminais pré-sinápticos dos núcleos da base, cerebelo, estriado ventral (núcleo accumbens), hipocampo, amígdala, matéria cinzenta periaquedutal e córtex cerebral, regulando diretamente a função cognitiva, as emoções, e os circuitos cerebrais específicos relacionados ao comportamento (PIOMELLI, 2003). Os receptores CB2, por sua vez, são mais expressos na periferia, especialmente em estruturas e células associadas ao sistema imune – possibilitando a atuação dos endocanabinoides como imonumoduladores – e hematopoiese (TURCOTTE et al., 2016). Em ratos *knockout* para o gene do receptor CB2 (CNR2), por exemplo, verificou-se menor número de osteoblastos e, conseqüentemente, menor massa corpórea e óssea, além de anormalidades em linfócitos T e B (BUCKLEY et al., 2000). No entanto, CB2 também é expresso em menor quantidade no SNC, especialmente na microglia (LI; KIM, 2017).

A comunicação neuronal a partir do influxo de cálcio e posterior ativação da fosfolipase D e diacilglicerol lipase, que convertem os fosfolípidos em endocanabinoides propriamente ditos, é mediada pelos endocanabinoides (TSUBOI et al., 2018). De modo geral, os endocanabinoides atingem os receptores CB1 e CB2 - os quais são receptores acoplados à proteína G (GPCRs) - por difusão, modulando a permeabilidade neuronal e inibindo a entrada dos íons cálcio e facilitando a saída dos íons potássio, que por sua vez inibem a adenilato ciclase (AC) e, conseqüentemente, inativam a proteína quinase A (PKA) ou estimulam a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Esses eventos intracelulares regulam a expressão e a liberação de neurotransmissores clássicos, como acetilcolina, glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina e serotonina (DI MARZO; BIFULCO; DE PETROCELLIS, 2004). Dessa forma, a regulação da função cognitiva, das emoções e de circuitos cerebrais específicos relacionados ao comportamento são diretamente afetados.

### 1.2.3 Principais endocanabinoides: AEA e 2-AG

Os principais endocanabinoides estudados são o 2-AG e a anandamida. As enzimas fosfolipase C (PLC) e diacilglicerol lipases (DAGLs) são as responsáveis pela biossíntese de 2-AG, e estão localizadas predominantemente na membrana plasmática das células, principalmente na membrana de neurônios pós-sinápticos (DI MARZO; BIFULCO; DE PETROCELLIS, 2004). A enzima MGLL, por sua vez, está localizada predominantemente em neurônios pré-sinápticos, e tem a função de inativar 2-AG. As enzimas N-aciltransferase (NAT) e N-acilfosfatidil-etanolamina-específica fosfolipase D (NAPE-PLD) são responsáveis pela biossíntese de AEA, enquanto que a enzima responsável pela sua degradação é a FAAH; e toda essa maquinaria está predominantemente localizada nas membranas intracelulares. Por fim, o transportador de endocanabinoide de membrana (EMT) facilita a liberação e a recaptação dos endocanabinoides 2-AG e AEA, e está localizado tanto em neurônios pré como pós-sinápticos (DI MARZO; BIFULCO; DE PETROCELLIS, 2004). Os endocanabinoides entram na célula por difusão simples até alcançar o equilíbrio no gradiente químico, no entanto esse equilíbrio é evitado por compostos capazes de inibir seletivamente a captação de AEA, como, por exemplo, por inibidores diretos de FAAH, pela não expressão de FAAH, e pela internalização de falsos substratos para a atuação de FAAH (PANDEY et al., 2009; PERTWEE, 2015).

No sistema imune, os endocanabinoides têm o papel de modular a transcrição, produção e migração de citocinas e quimiocinas (PANDEY et al., 2009). AEA e 2-AG, de uma forma geral, possuem efeito supressor do sistema imune, agindo por meio do receptor CB2, que é mais expresso do que CB1 nesse contexto (MCALLISTER; GLASS, 2002). Alguns trabalhos trazem a expressão “*fine-tuning*” para sugerir que os endocanabinoides atuam como responsáveis pelo ajuste fino no equilíbrio homeostático imune (SKAPER; DI MARZO, 2012). AEA diminui os níveis de IL-6 e IL-8, por exemplo, através dos receptores CB2 (DEROCQ et al., 1998). Após estudos em células HL-60 do tipo macrófago, verificou-se que 2-AG é um ligante com mais afinidade pelo receptor CB2 (SUGIURA et al., 2000), mas em receptores CB1, 2-AG também estimula a liberação de óxido nítrico (NO), importante agente inflamatório (STEFANO et al., 2000). Diversos estudos mostram a ação dos endocanabinoides nas células do sistema imune na periferia. Vannacci e colegas mostraram que 2-AG leva à diminuição da expressão de CD63, um marcador de diferenciação celular utilizado para identificar basófilos (VANNACCI et al., 2004). Já Oka e colaboradores reportaram que 2-AG induz a migração de eosinófilos em células EoL-1 (OKA et al., 2004).

Nos linfócitos, que são células centrais na resposta inflamatória, AEA e 2-AG tem efeito inibitório sobre a indução e proliferação dessas células, além da inibição de CXCL12 – responsável pela modulação da atividade dos linfócitos T (COOPMAN et al., 2007; LEE; YANG; KAMINSKI, 1995). Em monócitos e macrófagos, os endocanabinoides - em especial AEA - parece inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (CABRAL et al., 1995). Já no SNC, as células do sistema imune – astrócitos e microglia – têm suas funções celulares e capacidade de regeneração moduladas pela ação dos endocanabinoides (NAVARRETE; DÍEZ; ARAQUE, 2014; STELLA, 2009). A liberação de citocinas pró-inflamatórias por astrócitos, como TNF- $\alpha$ , é bloqueada por AEA (MOLINA-HOLGADO; LLEDÓ; GUAZA, 1997). Por outro lado, AEA também provoca um aumento nos níveis de IL-6 em astrócitos corticais (MOLINA-HOLGADO; MOLINA-HOLGADO; GUAZA, 1998). Em outro estudo, viu-se que, em neurônios e microglia do giro denteado que sofreram lesão excitotóxica induzida por N-metil-D-aspartato (NMDA), 2-AG exerceu atividade neuroprotetora (KREUTZ et al., 2009). De uma forma geral, grande parte da literatura têm apresentado a AEA como o endocanabinoide modulador anti-inflamatório mais potente, que atua na maioria das células do sistema imune, ficando responsável pela diminuição da migração e adesão celular, aumento do processo fagocitário, redução da liberação de IL-2, redução da ativação do fator NF- $\kappa$ B, elevação da produção de IL-10 e aumento da apoptose. Por outro lado, 2-AG age como modulador tanto anti quanto pró-inflamatório. Ele participa na redução de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2 em células T; aumento da migração de células B; aumento da quimiotaxia em eosinófilos; aumento da liberação de NO em células NK e aumento da migração e adesão de macrófagos (CHIURCHIÙ, 2016).

#### **1.2.4 Sistema endocanabinoide e os fatores nucleares NF- $\kappa$ B e Nrf2**

Dado o papel central do fator de transcrição NF- $\kappa$ B na resposta imune do organismo humano, e a atividade moduladora dos endocanabinoides, diversos estudos têm sugerido uma interação entre essas moléculas biológicas. AEA suprime a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por moléculas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , o que resulta na sua ação anti-inflamatória. TNF- $\alpha$  se liga ao receptor do fator de necrose tumoral tipo 1 (TNFR1), recrutando e ativando um complexo de proteínas quinase. Esses eventos são mediados por um complexo envolvido em propagar a resposta celular à inflamação, conhecido como complexo I $\kappa$ B kinase (IKK), que fosforila I $\kappa$ B, proteína ligada ao fator NF- $\kappa$ B. I $\kappa$ B irá ser degradado pelo proteossoma, liberando NF- $\kappa$ B para regular a transcrição de genes relacionados à resposta inflamatória. Uma hipótese sugere que AEA intervém nesse processo, inibindo IKK (SANCHO et al.,

2003). Outro estudo corrobora essa hipótese, mostrando que AEA bloqueia a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por lipopolissacarídeo (LPS), suprimindo mediadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e IL-6 (NAKAJIMA et al., 2006). Semelhantemente à AEA, 2-AG parece impedir o aumento da ativação de NF- $\kappa$ B sob um estímulo inflamatório. Em modelo animal de traumatismo cranioencefálico fechado, os níveis de 2-AG estão aumentados, e tanto esses níveis endógenos quanto o 2-AG exógeno reduzem o edema cerebral via receptor CB1, contribuindo para a melhora do animal (PANIKASHVILI et al., 2005). Outro estudo avaliou a capacidade preventiva de 2-AG sobre neurotoxicidade provocada pelo dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) oriundo da poluição atmosférica; A exposição aguda de SO<sub>2</sub> pode levar à excitotoxicidade mediada por glutamato e danos neuronais, através da sinalização de NF- $\kappa$ B, que regula a transcrição de COX-2. 2-AG, por meio do receptor CB1, regula a ação de NF- $\kappa$ B de maneira endógena, reduzindo os níveis de COX-2 e, conseqüentemente, protegendo o organismo de disfunções neurológicas (LI et al., 2015).

Outras hipóteses destacam a capacidade de neuroproteção do 2-AG através de: 1) inibição da liberação de glutamato, por meio da inibição prévia na liberação de cálcio; 2) melhor aproveitamento de glicose e produção de cetonas por meio do receptor CB1; 3) antagonizando o efeito vasoconstritor da endotelina 1 (ET-1) (MECHOULAM; PARKER; GALLILY, 2002).

O fator Nrf2 – regulador chave na defesa antioxidante no organismo – também tem sua ação afetada pela ação moduladora dos endocanabinoides. Um estudo mostrou que quando se utiliza um inibidor da enzima FAAH, AEA não é degradado e se acumula. Esse acúmulo de AEA é seguido por um acúmulo de ERO, que induz a translocação de Nrf2 para o núcleo, e lá ele regula a transcrição de genes importantes para a resposta anti-inflamatória e protetora, como a enzima antioxidante HO-1, contribuindo para os efeitos analgésicos, anticonvulsivantes e antidepressivos dos endocanabinoides (LI et al., 2013). Outro estudo demonstrou, também em modelo animal, que a administração de um inibidor de FAAH em ratos hipertensos culminou em elevação nos níveis de AEA, na expressão dos receptores CB1 e CB2, e nos níveis de Nrf2 (BIERNACKI et al., 2015). Semelhante ao que acontece quando FAAH é inibida, o bloqueio de MGLL evita que 2-AG seja degradado, o que leva à redução da neuroinflamação e da produção de eicosanoides – moléculas derivadas do ácido araquidônico, envolvido na resposta inflamatória e antioxidante (NOMURA et al., 2011).



## 1.3 CANABIDIOL

### 1.3.1 Estrutura e bioquímica

A planta *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha, possui mais de 100 canabinoides, que são moléculas as quais compartilham uma estrutura química semelhante. Desses canabinoides, o principal responsável pelos efeitos psicoativos é o  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC). Além deste, outro canabinoide que tem se destacado é o canabidiol (CBD), pois não induz os efeitos subjetivos da maconha, pelo contrário, apresenta diversas vantagens terapêuticas como agente antioxidante, anti-inflamatório, neuroprotetor, anticonvulsivo, anti-emético, ansiolítico e antidepressivo (CRIPPA et al., 2018; MANDOLINI et al., 2018). O uso medicinal da *Cannabis* teve início por volta dos anos 2.700 A.C.; no entanto, foi no século XIX que a planta foi introduzida de fato na medicina norte-americana. No século seguinte, foram melhor desenvolvidos os conhecimentos a respeito do sistema endocanabinóide e a estrutura molecular e síntese do THC. No ano de 2010 o genoma da *Cannabis* foi sequenciado, e em 2016 a estrutura do receptor CB1 foi desvendada (REEKIE; SCOTT; KASSIOU, 2017). Embora o THC e o CBD tenham sido descobertos aproximadamente no mesmo período, até então o THC tem ganhado mais destaque como alvo terapêutico. Diferente do THC, que age por meio dos receptores CB1 e CB2, que são acoplados à proteína G, até o momento atual não se identificou ainda um receptor específico para o CBD (DI MARZO, 2018). CBD, cuja fórmula molecular é  $C_{21}H_{30}O_2$ , tem estrutura similar ao resorcinol (MURASE et al., 2014), e tem se mostrado mais protetor do que  $\alpha$ -tocoferol ou vitamina C em relação à toxicidade de neurônios glutamatérgicos.

### 1.3.2 Potencial terapêutico nos transtornos psiquiátricos

Há alguns anos o CBD vem sendo estudado como potencial agente terapêutico em diversas doenças, sobretudo nos transtornos psiquiátricos (KHOURY et al., 2019). Na esquizofrenia, através da facilitação na sinalização dos endocanabinoides e o efeito antagonista sobre o receptor CB1, o CBD pode exercer efeitos antipsicóticos. No transtorno de ansiedade, através da modificação do fluxo sanguíneo em regiões específicas no cérebro e o efeito agonista nos receptores 1A de serotonina, o CBD pode exercer efeitos ansiolíticos. Em relação aos sintomas de retirada da maconha e tabaco, o CBD parece modular os endocanabinoides e sistemas serotoninérgicos e glutamatérgicos, ativando, por exemplo, os receptores TRPV1 que afetam na liberação de glutamato (CRIPPA et al., 2018), e reduzindo os efeitos negativos da retirada.

### 1.3.3 Potencial antioxidante e anti-inflamatório

Dados da literatura apontam que o CBD atua na diminuição da ativação da via de sinalização propagada por NF- $\kappa$ B. O CBD inibe a degradação induzida pelo agente estimulante do processo inflamatório, inibindo a formação de quinase intermediária IRAK-1, que por consequência leva à degradação da I $\kappa$ B (proteína inibidora, que mantém NF- $\kappa$ B no núcleo) e à diminuição da fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B. IL-1B, IL-6 e interferon-beta (IFNB) podem promover a ativação de NF- $\kappa$ B. IFNB induz a fosforilação da família de proteínas Janus quinases (JAK), que leva à ativação das proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição (STAT), principalmente STAT1 e STAT3, ou seja, ativa a via de sinalização JAK-STAT (KOZELA et al., 2010). Após essa ativação, as STATs induzem a transcrição de genes ligados à resposta inflamatória. O CBD então pode atuar interferindo nesse processo, impedindo a fosforilação das STATs. STAT1 e STAT3, embora muito semelhantes, não são idênticas. Dessa forma, enquanto STAT1 exerce efeito pró-inflamatório, induzindo expressão de quimiocinas (CCL2, por exemplo) e regulando a migração ou adesão de células do sistema imune, STAT3 exerce efeito anti-inflamatório, principalmente por meio de IL-10 (KOZELA et al., 2010). O que tem sido observado nos estudos é a redução da ativação de STAT1 induzida por patógeno ou molécula estimulante da inflamação, como LPS, por meio da administração de CBD. E mais, o CBD tem fortalecido STAT3. Dessa forma, o CBD diminui efeitos pró-inflamatórios e intensifica os anti-inflamatórios (KOZELA et al., 2010).

Além disso, o CBD bloqueia a recaptação de AEA e inibe a atividade da enzima que a hidrolisa (FAAH) (ASHTON et al., 2005); também aumenta os níveis de 2-AG, uma vez que inibe a enzima responsável por sua degradação (MGLL) (LIMEBEER et al., 2018). A influência do CBD sobre AEA e 2-AG é especialmente importante porque os endocanabinoides apresentam uma íntima relação com a ativação de alguns fatores nucleares, como Nrf2, que culminará na transcrição de genes responsáveis pela resposta antioxidante na célula (LI et al., 2013). Por outro lado, o CBD inibe NF- $\kappa$ B, reduzindo a transcrição de genes pró-inflamatórios (KOZELA et al., 2010). George Booz apontou alguns possíveis mecanismos de ação do CBD: 1) mesmo apresentando baixa afinidade pelos receptores CB1 e CB2, CBD tem se apresentado como um antagonista nesses receptores em baixas concentrações. Em concentrações entre 1-10  $\mu$ M, CBD age como um agonista inverso dos receptores CB1 e CB2. E, por fim, em concentrações ainda mais elevadas ele age como inibidor da enzima de degradação dos endocanabinoides mais importante, a FAAH (BOOZ,

2011). 2) Em determinadas concentrações, CBD age como inibidor da enzima transportador de nucleosídeos equilibrativos 1 (ENT1), responsável pela recepção de adenosina em macrófagos e células da glia (BOOZ, 2011). Dessa forma, o aumento de adenosina exógena ativa o receptor de adenosina  $A_{2A}$ , culminando numa atividade imunossupressora em macrófagos e células da glia, uma vez que ocorre a diminuição da produção de TNF- $\alpha$ . O CBD pode ser importante, portanto, especialmente em doenças onde há hiperativação microglial, como no TB (MECHAWAR; SAVITZ, 2016). 3) CBD atenua a geração de superóxido mitocondrial induzido por glicose e ativação de NF- $\kappa$ B, além de reduzir a expressão de ERO (BOOZ, 2011). Portanto, CBD pode agir diretamente em níveis mitocondriais ou nucleares, se opondo ao estresse oxidativo e nitrosativo. 4) Baixas concentrações de CBD inibem a atividade da enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), diminuindo assim a degradação de triptofano, o precursor da serotonina (BOOZ, 2011). Assim, CBD pode diminuir o risco de desenvolvimento da fase depressiva no TB (ANDERSON et al., 2016).

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a gravidade do TB e o grande impacto dessa doença sobre indivíduos acometidos e também sobre a sociedade de uma forma geral, a proposta deste trabalho é investigar alguns mecanismos envolvidos em uma possível melhora clínica – em decorrência do uso do CBD – de pacientes bipolares em episódios depressivos. Após a realização dos experimentos, e fundamentado em uma vasta bibliografia, o que se espera é uma melhora clínica dos pacientes em uso de CBD, devido a um possível reequilíbrio dos fatores de transcrição Nrf2 e NF- $\kappa$ B. Além disso, também é esperado que as enzimas MGLL e FAAH tenham seus níveis de transcrição gênica restabelecidos aos níveis normais, restabelecendo a dinâmica normal do sistema endocanabinoide nos pacientes.

#### 1.5 OBJETIVOS

##### 1.5.1 Objetivo geral

Discutir a importância do sistema endocanabinoide no TB, bem como o possível efeito positivo do CBD em pacientes com TB através da modulação de NF- $\kappa$ B e Nrf2.

### 1.5.2 Objetivos específicos

- a) Verificar a existência de alterações (em nível de expressão gênica) no sistema endocanabinoide entre pacientes com TB (antes de iniciarem o tratamento – semana W00) e controles.
- b) Comparar os níveis de expressão gênica de NF- $\kappa$ B e Nrf2 entre pacientes bipolares e controles.
- c) Discutir a relação do CBD com as principais enzimas metabólicas - FAAH e MGLL - responsáveis pelo catabolismo dos principais endocanabinoides.
- d) Entender a conexão entre o CBD, endocanabinoides, enzimas metabólicas e os fatores NF- $\kappa$ B e Nrf2.

## **2 TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO**

Trabalho em preparação a ser submetido de acordo com as normas de publicação da revista *Frontiers in Psychiatry*.

### **POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO CANABIDIOL NO TRATAMENTO DO TRANSTORNO BIPOLAR**

Gabriel Henrique Hizo, Giovana Bristot, Francisco Diego Rabelo da Ponte, Fernanda Endler Valiati, Keila Maria Mendes Ceresér, Jairo Vinicius Merege de Mello Pinto, Érico de Moura Silveira Júnior, Miréia Fortes Vianna Sulzbach, Márcia Kauer Sant'Anna

## Potencial Anti-inflamatório e Antioxidante do Canabidiol no Tratamento do Transtorno Bipolar

1 **Gabriel Henrique Hizo<sup>1</sup>, Giovana Bristot<sup>1,2</sup>, Francisco Diego Rabelo da Ponte<sup>1,3</sup>, Fernanda**  
 2 **Endler Valiati<sup>1,2</sup>, Keila Maria Mendes Ceresér<sup>1,3</sup>, Jairo Vinicius Merege de Mello Pinto<sup>1,3</sup>, Érico**  
 3 **de Moura Silveira Júnior<sup>1</sup>, Miréia Fortes Vianna Sulzbach<sup>1</sup>, Márcia Kauer Sant'Anna<sup>1,2,3,4\*</sup>**

4 <sup>1</sup> Laboratório de Psiquiatria Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS,  
 5 Brasil.

6 <sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto  
 7 Alegre, RS, Brasil.

8 <sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal  
 9 do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

10 <sup>4</sup> Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

### 11 \* Correspondência:

12 Márcia Kauer Sant'Anna  
 13 mksantanna@gmail.com

14 **Palavras-chave: Transtorno Bipolar, Canabidiol, Fator Nuclear Kappa B, Fator Nuclear**  
 15 **Eritroide 2 Relacionado ao Fator 2, Monoacilglicerol Lipase, Amida Hidrolase de Ácidos**  
 16 **Graxos**

### 17 **Resumo**

18 O Transtorno Bipolar (TB) é caracterizado por oscilações de humor, alternando entre episódios de  
 19 mania ou hipomania e depressão. Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a  
 20 fisiopatologia do TB, sobretudo eventos relacionados a alterações no sistema imunológico, como o  
 21 aumento do estresse oxidativo e da inflamação. O fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2  
 22 (Nrf2), é um fator de transcrição ligado à resposta resposta antioxidante do organismo, enquanto o  
 23 fator nuclear kappa B (NF-κB) está envolvido na transcrição de genes envolvidos na resposta  
 24 inflamatória. O que se observa em doenças crônicas, como no TB, é um desequilíbrio nesses dois  
 25 fatores: NF-κB se encontra com um nível de expressão aumentado, enquanto o nível de Nrf2 está  
 26 reduzido. Assim, o objetivo deste estudo é discutir o possível efeito positivo do canabidiol (CBD) em  
 27 pacientes com TB, através da modulação de NF-κB e Nrf2. Foi avaliado, através da técnica de qPCR,  
 28 a expressão relativa dos genes NF-κB, Nrf2, monoacilglicerol lipase (MGLL) e hidrolase de amida de  
 29 ácidos graxos (FAAH), a partir de amostras de sangue total periférico de 28 pacientes com TB – onde  
 30 14 foram tratados com CBD e 14 com placebo – e 28 controles saudáveis (indivíduos que não  
 31 apresentam doenças neuropsiquiátricas), totalizando um n de 56 indivíduos. Os pacientes  
 32 apresentaram aumento significativo na expressão gênica de NF-κB, Nrf2, MGLL e FAAH em  
 33 relação ao grupo controle. O grupo paciente apresentou redução significativa na expressão gênica de  
 34 NF-κB e Nrf2 após 8 semanas de tratamento com CBD ou placebo (W08), quando comparado com o  
 35 grupo paciente antes de iniciar o tratamento (W00). Em relação à MGLL e FAAH, não foram  
 36 encontradas diferenças significativas entre o grupo paciente em W00 e o grupo paciente em W08.  
 37 Destacamos que estes são resultados preliminares de um ensaio clínico randomizado, duplo-cego,  
 38 controlado por placebo (NCT 03310593). Nossos achados mostram uma tendência de melhora dos

39 pacientes, uma vez que NF- $\kappa$ B teve seus níveis de expressão gênica equilibrados com os de Nrf2 – e  
40 isso implica numa potencial redução dos componentes inflamatórios. Além disso, após a intervenção  
41 com CBD ou placebo, observou-se redução na expressão desses genes, em um nível próximo ao  
42 observado no grupo controle, reforçando o possível potencial anti-inflamatório e antioxidante do  
43 CBD.

## 44 **1 Introdução**

45 O Transtorno Bipolar (TB) é caracterizado por oscilações de humor, alternando entre episódios  
46 de mania ou hipomania e depressão (1). O TB classifica-se em tipo I e tipo II, sendo o tipo I aquele  
47 com maior presença de episódios de mania, e o tipo II uma forma do transtorno em que os episódios  
48 maníacos são mais brandos ou mais breves, predominando episódios depressivos (2–4). Em termos  
49 mundiais, tem-se observado uma prevalência do TB em cerca de 2% da população (5), o que tem  
50 impulsionado o surgimento de mais pesquisas nessa área.

51 Diversos mecanismos têm sido propostos a fim de explicar as falhas na proteção contra a  
52 progressão do TB, desde eventos relacionados ao aumento do estresse oxidativo, que está relacionado  
53 com o funcionamento e a geração de energia na célula, e aumento da inflamação, que está  
54 relacionado não só com as doenças psiquiátricas, mas com diversos mecanismos fisiopatológicos dos  
55 mamíferos (6). O fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), também conhecido como  
56 NFE2L2, é um fator de transcrição ligado à resposta inflamatória, além de ser um regulador  
57 fundamental na resposta antioxidante do organismo, evitando os efeitos nocivos das espécies reativas  
58 de oxigênio (ERO) (7,8). O Nrf2, em condições normais, localiza-se no citoplasma e está em baixas  
59 concentrações. No entanto, quando a célula é exposta a um estímulo estressor interno ou externo,  
60 como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, as moléculas Keap1 – que estão associadas ao  
61 Nrf2 num estado fisiológico normal – têm sua conformação alterada e, conseqüentemente, se  
62 desprendem de Nrf2, permitindo que este se desloque para o núcleo e se associe à proteína sMaf (9–  
63 12). Uma vez no núcleo, o Nrf2 modula a transcrição de genes relacionados a processos celulares  
64 específicos, como os envolvidos com proteção antioxidante. Alguns genes-alvo se destacam nesse  
65 contexto, como os da heme oxigenase 1 (HO-1), glutathione S transferase (GST), superóxido  
66 dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR) (9,13).

67 Nesse cenário, outro fator de transcrição nuclear importante é o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B).  
68 A sua principal função é modular a transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória, mas  
69 também está relacionado com apoptose e crescimento celular (14,15). Alguns dos seus genes-alvo  
70 são os relacionados a citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , interleucina (IL)-1,  
71 IL-2, IL-6 e IL-12, por exemplo), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclo-oxigenase 2 (COX-  
72 2) (16,17).

73 Em um processo inflamatório crônico, como no caso do TB (18,19), as células do sistema  
74 imune estão ativadas, recrutando cada vez mais mediadores inflamatórios, resultando na ativação de  
75 NF- $\kappa$ B, de uma forma que a sua ativação se sobressai à atividade de Nrf2 – que tem papel de regular  
76 negativamente a transcrição de citocinas e mediadores pró-inflamatórios. Portanto, o que se observa  
77 em transtornos psiquiátricos, de uma forma geral, é um desequilíbrio em relação a esses dois fatores  
78 de transcrição: NF- $\kappa$ B se encontra com um nível de expressão aumentado, enquanto o nível de Nrf2  
79 está reduzido (20).

80 Grande parte dos pacientes que são diagnosticados com TB são tratados com uma combinação  
81 de fármacos, os quais, em sua maioria, possuem alguma desvantagem. O lítio, por exemplo, embora  
82 seja considerado o padrão ouro como estabilizador do humor (21), possui baixa aceitação e quando  
83 retirado pode estimular estado de mania; ácido valproico traz riscos a mulheres em idade fértil;  
84 lamotrigina requer muito cuidado no controle da dose; entre outros (22). Por essa razão, tem-se  
85 buscado outros fármacos que possam ser usados no tratamento do TB, que apresentem boa eficácia e

86 menos efeitos colaterais. Nesse sentido, considerando que o sistema endocanabinoide parece exercer  
87 um papel essencial na fisiopatologia da doença, este sistema pode ser um alvo interessante para o  
88 estudo de novos fármacos. Os endocanabinoides são particularmente interessantes por causa da sua  
89 forma de ação retrógrada, ou seja, do neurônio pós em direção ao pré-sináptico; da sua síntese sob  
90 demanda; dos seus receptores principais CB1 e CB2, que são acoplados a uma proteína G; e pelas  
91 enzimas que degradam esses endocanabinoides (23). Os mais conhecidos e também mais estudados  
92 são 2-araquidonoil glicerol (2-AG) e anandamida, também conhecida como N-  
93 araquidonoiletanolamina (AEA), os quais são metabolizados pelas enzimas monoacilglicerol lipase  
94 (MGLL) e amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH), respectivamente, e atuam como mensageiros  
95 neurais, influenciando, de forma complexa, em diversos mecanismos de neurotransmissão no  
96 organismo (24).

97 A planta *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha, possui mais de 100  
98 canabinoides, que são moléculas que compartilham uma estrutura química semelhante. Desses  
99 canabinoides, o principal responsável pelos efeitos psicoativos é o  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-  
100 THC). Além deste, outro canabinoide que tem se destacado é o canabidiol (CBD), pois não induz os  
101 efeitos subjetivos da maconha, pelo contrário, apresenta diversas vantagens terapêuticas como agente  
102 antioxidante, anti-inflamatório, neuroprotetor, anticonvulsivante, anti-emético, ansiolítico e  
103 antidepressivo (25,26).

104 Há muitos anos o CBD vem sendo estudado como potencial agente terapêutico em diversas  
105 doenças. Foi demonstrado em modelo animal de ansiedade e depressão que o CBD atua na facilitação  
106 da neurotransmissão pelo receptor 5HT1A de serotonina em áreas-chaves desses transtornos  
107 psiquiátricos. Ainda em modelos animais de ansiedade e depressão, o CBD parece ativar os  
108 receptores TRPV1, afetando na liberação de glutamato (26). Além disso, o CBD bloqueia a  
109 recaptação de AEA e inibe a atividade da enzima que a hidrolisa (FAAH) (22); e também aumenta os  
110 níveis de 2-AG, uma vez que inibe a enzima responsável por sua degradação (MGLL) (27). A  
111 influência do CBD sobre AEA e 2-AG é especialmente importante, pois os endocanabinoides  
112 apresentam uma íntima relação com a ativação de alguns fatores nucleares, como Nrf2, que  
113 culminará na transcrição de genes responsáveis pela resposta antioxidante na célula (28). Por outro  
114 lado, o CBD inibe NF- $\kappa$ B, reduzindo a transcrição de genes pró-inflamatórios (29). Desta forma, o  
115 presente estudo tem como objetivo principal discutir o possível efeito positivo do CBD em pacientes  
116 com TB através da modulação de NF- $\kappa$ B e Nrf2. Além disso, verificar a existência de alterações (em  
117 nível de expressão gênica) no sistema endocanabinoide entre pacientes com TB (antes de iniciarem o  
118 tratamento – semana W00) e controles.

## 119 2 Materiais e Métodos

### 120 2.1 Delineamento do estudo

121 Trata-se de um estudo envolvendo 28 pacientes com TB – onde 14 foram tratados com CBD e  
122 14 com placebo – e 28 controles saudáveis (indivíduos que não apresentam doenças neurológicas ou  
123 neuropsiquiátricas), totalizando um n de 56 indivíduos. Foram incluídos no estudo homens e  
124 mulheres com idade entre 18 e 65 anos. Os critérios de inclusão para o grupo paciente foram:  
125 apresentar diagnóstico de TB do tipo I ou II segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de  
126 Transtornos Mentais, 5ª edição (DSM-5); pontuar acima de 12 na *Montgomery-Asberg Depression*  
127 *Rating Scale* (MADRS) e abaixo de 11 na *Young Mania Rating Scale* (YMRS); não ser gestante, não  
128 estar amamentando e não ter planos de engravidar nos meses subsequentes à pesquisa; estar em uso  
129 de lítio, ácido valproico ou antipsicóticos atípicos em doses terapêuticas há pelo menos quatro  
130 semanas na avaliação inicial, bem como estar com doses estáveis de quaisquer outras medicações em  
131 uso. Já os critérios de exclusão foram os seguintes: apresentar outro transtorno mental; possuir



132 história de não resposta ou intolerância ao CBD; possuir transtorno por uso de substância psicoativa  
133 segundo o DSM-5 nos últimos 6 meses, à exceção da nicotina; possuir doença médica relevante  
134 clinicamente instável; e possuir risco de suicídio ou homicídio ativos.

135 Em relação aos pacientes (grupo tratado com CBD e grupo placebo), as coletas de sangue  
136 foram realizadas antes do início do tratamento (W00) e após oito semanas de acompanhamento  
137 (W08). Esse material biológico foi proveniente de um projeto já em andamento, intitulado  
138 “Canabidiol como tratamento adjuvante para depressão bipolar: Ensaio clínico duplo-cego,  
139 randomizado e controlado por placebo para avaliar a eficácia do canabidiol como tratamento  
140 adjuvante para depressão bipolar”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA,  
141 sob número 17-0029/ ClinicalTrials.gov: NCT03310593. Trata-se de um estudo duplo-cego,  
142 randomizado e controlado por placebo, onde os participantes receberam 1-2 cápsulas de CBD 150mg  
143 / dia ou placebo em um ensaio clínico randomizado (ECR) por 12 semanas, permanecendo em  
144 tratamento como de costume durante o estudo. Os sintomas maníacos e psicóticos são avaliados de  
145 acordo com a YMRS e a *Brief Psychiatric Rating Scale* (BPRS), respectivamente. Os efeitos  
146 colaterais são avaliados com a escala *Udvalg for Kliniske Undersogelser* (UKU). Até então não  
147 foram observados episódios psicóticos induzidos e nem mudança maníaca. Além disso, não houve  
148 efeitos colaterais graves associados à intervenção. As amostras referentes aos controles utilizadas  
149 neste estudo foram coletadas no Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto  
150 2014-0515). Todos os indivíduos que participaram deste estudo assinaram o Termo de  
151 Consentimento Livre e Esclarecido.

## 152 2.2 Coleta e processamento do material biológico

153 A coleta de sangue foi realizada por punção venosa e o material transferido para um tubo roxo  
154 (com anticoagulante EDTA). Na sequência, 500 µL de sangue total foram alíquotados em um tubo  
155 eppendorf contendo 1,3 mL de RNAlater, que foi então armazenado a -80 °C até o momento da  
156 extração do RNA.

## 157 2.3 Extração e purificação do RNA

158 O RNA total foi extraído e purificado com o uso do kit *RiboPure™ RNA Purification Kit,*  
159 *blood* (Invitrogen – AM1928). A seguir, a pureza do RNA foi avaliada utilizando o equipamento  
160 NanoDrop ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA), e a quantificação do RNA foi realizada no  
161 equipamento Qubit 2.0, através do kit *Qubit RNA HS Assay Kit* (Invitrogen - Q32855).

## 162 2.4 Síntese de cDNA

163 A seguir, foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir das amostras de RNA,  
164 com a utilização do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems,  
165 Vilnius, Lithuania – 4368814) e do equipamento *Veriti 96 Well Thermal Cycler*. O cDNA foi  
166 sintetizado a partir de 330 ng de RNA, que foram colocados em um volume total de reação de 20 µL  
167 contendo *10X RT Buffer, 25X dNTP Mix (100 mM), 10X RT Random Primers, MultiScribe Reverse*  
168 *Transcriptase e RNase Inhibitor*. A reação de transcrição reversa foi realizada da seguinte forma: 10  
169 min a 25°C, 2 h a 37°C e 5 min a 85°C. Posteriormente, o cDNA foi mantido a -20°C até uso  
170 posterior.

## 171 2.5 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

172 O cDNA foi então utilizado para a realização da técnica de qPCR, usando ensaio pré-  
173 desenhado do tipo TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, California), específico para os genes

174 de interesse NF- $\kappa$ B (Hs00174517\_m1), NFE2L2 (Hs00975961\_g1), FAAH (Hs00155015\_m1) e  
 175 MGLL (Hs00200752\_m1) – bem como para o gene de referência (B2M), que foi escolhido após a  
 176 realização de um teste com amostras de pacientes bipolares, similares às amostras do estudo, e  
 177 apresentou um *Cycle Threshold* (Ct) menor e mais estável entre os genes de referência testados (B2M  
 178 RRN18S, GAPDH e RPLPO). O qPCR foi realizado utilizando o equipamento QuantStudio 3  
 179 (Applied Biosystems). Foram utilizados 2  $\mu$ L de cDNA combinado com *Taqman PCR Master Mix*  
 180 (QuatroG, Porto Alegre, RS, BR - 100082) e ensaio pré-desenhado do tipo *TaqMan Gene*  
 181 *Expression*. O volume final de cada reação foi de 14  $\mu$ L, e todas as medições foram realizadas em  
 182 triplicata. O Ct foi manualmente definido nas curvas de amplificação. Os níveis de expressão foram  
 183 normalizados com o gene de referência, e a quantificação relativa de mRNA para cada gene de  
 184 interesse foi calculada pelo método  $\Delta\Delta$ Ct (30).

## 185 2.6 Análise estatística

186 As análises estatísticas referentes aos dados sociodemográficos e à expressão do mRNA dos  
 187 genes de interesse foram realizadas utilizando-se o software R (versão 3.6.2) e RStudio (versão  
 188 1.2.5019-6) para Windows. A normalidade dos dados quantitativos foi verificada pelo teste de  
 189 Shapiro-Wilk. Quando a distribuição foi paramétrica, as médias dos grupos para cada gene foram  
 190 comparadas utilizando-se o teste *t-Student* (comparação entre pacientes com TB antes do início do  
 191 tratamento (W00) e controles; e entre W00 e os pacientes no final do tratamento (W08)). Quando a  
 192 distribuição foi não paramétrica, os dados foram comparados pelo teste de Mann-Whitney  
 193 (comparação entre W00 e controle; e entre W00 e W08). Em todos os testes foi considerada a  
 194 significância estatística de 0,05. Os pacotes utilizados no RStudio foram readxl(1.3.1) – para  
 195 importar os dados do excel; plyr (1.8.4) – para transformar gênero em categoria; dplyr (0.8.3) – para  
 196 cálculo de desvio padrão de idade entre os grupos, e para cálculo de mediana e intervalo  
 197 interquartil; RColorBrewer (1.1.2) e ggplot2 (3.2.1) – para construção de boxplot.

## 198 3 Resultados

### 199 3.1 Avaliação dos níveis de mRNA entre os grupos

200 Os dados demográficos estão representados na Tabela 1. O aumento significativo dos níveis de  
 201 mRNA no grupo paciente antes do início do tratamento – semana 0 (W00), em relação ao grupo  
 202 controle foi observado em NF- $\kappa$ B ( $p < 0,001$ ) (Figura 1), Nrf2 ( $p < 0,001$ ) (Figura 3), MGLL ( $p <$   
 203  $0,001$ ) (Figura 5) e FAAH ( $p < 0,01$ ) (Figura 7). Foi observada redução significativa nos níveis de  
 204 expressão gênica no grupo paciente no final do tratamento – semana 8 (W08), quando comparado  
 205 com o grupo na semana 0, em NF- $\kappa$ B ( $p < 0,05$ ) (Figura 2) e Nrf2 ( $p < 0,01$ ) (Figura 4). Em relação à  
 206 MGLL e à FAAH, não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo paciente na semana  
 207 8 e o grupo paciente na semana 0 (Figura 6 e Figura 8, respectivamente). Dos 28 pacientes  
 208 selecionados para o estudo, apenas as amostras de 7 deles tiveram níveis detectados no qPCR para a  
 209 sonda MGLL em W00, e 11 em W08. Em relação à FAAH, apenas 8 amostras apresentaram  
 210 amplificação Ct em W00, e 7 em W08. O reduzido número de pacientes incluídos no estudo até o  
 211 momento, aliado ao fato de ausência de detecção de expressão gênica para MGLL e FAAH em  
 212 grande parte das amostras pode explicar porque não houve diferença significativa entre os grupos  
 213 W00 e W08 em relação a esses dois genes. Destacamos que estes são resultados preliminares de um  
 214 ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo (NCT 03310593). Portanto, a fim de  
 215 respeitar a metodologia proposta, não foi possível quebrarmos o cegamento do estudo nesse  
 216 momento, dividindo os pacientes com TB em grupo placebo e grupo tratado com CBD.

## 217 4 Discussão

218 Os níveis de NF- $\kappa$ B estão aumentados em doenças inflamatórias regulando a transcrição de  
219 uma grande variedade de genes, que em grande parte estão relacionados a processos pró-  
220 inflamatórios (14). Também é visto esse aumento nos níveis de NF- $\kappa$ B no TB, reforçando a hipótese  
221 de que o TB seja uma doença crônica. Além disso, o aumento nos níveis desse fator de transcrição  
222 nuclear tem sido associado à piora dos sintomas clínicos em pacientes (31). Nossos resultados  
223 corroboram com a literatura, onde os níveis de NF- $\kappa$ B estão aumentados significativamente nos  
224 pacientes com TB (W00) em comparação com o grupo controle. No entanto, há uma redução na  
225 expressão de NF- $\kappa$ B após as 8 semanas de tratamento com CBD ou placebo (W08), indicando que  
226 existe a possibilidade do CBD estar influenciando nesse processo. A literatura tem mostrado esse  
227 potencial mecanismo de ação do CBD – isto é – seu papel na supressão de NF- $\kappa$ B. Isso pode ocorrer  
228 através da redução da fosforilação da subunidade p65 de NF- $\kappa$ B, dificultando a ida do fator nuclear  
229 para o núcleo, onde ele exerceria seus efeitos na modulação da transcrição de genes pró-  
230 inflamatórios; ou, como outro estudo mostra, pela estabilização da subunidade I $\kappa$ B como parte do  
231 mecanismo pelo qual o CBD suprime NF- $\kappa$ B (29,32). Por se tratar de um ensaio clínico randomizado  
232 (ECR), duplo-cego, controlado por placebo (NCT 03310593), que ainda está em andamento, não  
233 podemos afirmar que a redução da expressão de NF- $\kappa$ B está acontecendo por ação do CBD, porém  
234 nos fornece dados preliminares interessantes, sugerindo que, de fato, o CBD esteja agindo como  
235 agente anti-inflamatório no TB. Além disso, por se tratar de um estudo clínico onde o CBD é usado  
236 apenas como um fármaco adjuvante, outros fármacos utilizados pelos pacientes podem estar afetando  
237 na redução dos níveis de NF- $\kappa$ B. Uma vasta literatura mostra a ação do lítio, um dos principais  
238 estabilizadores de humor, como inibidor da proteína glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), a qual  
239 controla a expressão e a atividade de NF- $\kappa$ B, e reduzindo também a expressão de citocinas  
240 inflamatórias (33–35). Outro estabilizador de humor, o ácido valproico, também regula  
241 negativamente a atividade de NF- $\kappa$ B, que normalmente estaria aumentado em situações patológicas  
242 (36). Antidepressivos – como fluoxetina - e antipsicóticos atípicos – como quetiapina - suprimem a  
243 reação pró-inflamatória via modulação de NF- $\kappa$ B (37–39).

244 Embora a literatura mostre que há um desequilíbrio entre Nrf2 e NF- $\kappa$ B em situações  
245 patológicas, e que, portanto, existe a ideia de que, em níveis proteicos, quando um deles está mais  
246 elevado, acaba por inibir o outro (20), em nível de expressão gênica isso não parece acontecer. Pelo  
247 contrário, as células parecem tentar aumentar a expressão de Nrf2 para compensar os níveis de NF-  
248  $\kappa$ B, e diminuir, assim, os seus efeitos pró-inflamatórios. Dessa forma, os pacientes em na semana 0  
249 apresentaram aumento significativo na expressão de Nrf2 quando comparados com o grupo controle,  
250 mostrando que possivelmente as alterações neuroinflamatórias características do TB serviram de  
251 estímulo para que houvesse um aumento da expressão de Nrf2 como mecanismo de proteção contra o  
252 também aumento de NF- $\kappa$ B. Já na semana 8 observou-se uma diminuição de Nrf2, uma vez que os  
253 níveis de NF- $\kappa$ B também diminuíram, não sendo necessária uma elevada expressão dos fatores de  
254 proteção antioxidante modulados por Nrf2. Novamente, não sabemos se o CBD é o responsável por  
255 essa compensação nos níveis desses fatores, pois outros fármacos também podem ter influência  
256 nesses achados. O lítio, por exemplo, parece aumentar a expressão de genes-alvo de Nrf2 (40),  
257 embora outro estabilizador de humor – ácido valproico – parece produzir o efeito oposto, isto é,  
258 suprimir Nrf2 (41). A literatura também aborda, em estudos de modelo animal, que pode existir uma  
259 relação entre a idade e os níveis de Nrf2, onde se mostrou que os níveis de Nrf2 são reduzidos em  
260 ratos mais velhos quando comparados com os mais jovens (42). Dessa forma, para que se  
261 compreenda o aumento da expressão de Nrf2 em pacientes, bem como a sua redução após o  
262 tratamento, é preciso levar em conta todas essas variáveis apresentadas.

263 No que se refere às enzimas de clivagem dos endocanabinoides – MGLL e FAAH – o nosso  
264 estudo mostra que há alteração nos níveis de expressão gênica das enzimas responsáveis por

265 metabolizar os endocanabinoides nos pacientes. Isso corrobora com a literatura, onde se observa que  
266 há relação entre a fisiopatologia de doenças psiquiátricas e os componentes do sistema  
267 endocanabinóide (43). MGLL e FAAH estão significativamente mais expressos nos pacientes em  
268 W00 quando comparados com o grupo controle, e isso pode influenciar negativamente, pois diminui  
269 as concentrações dos endocabinoides AEA e 2-AG – que apresentam uma íntima relação com os  
270 fatores NF- $\kappa$ B e Nrf2. No entanto, na semana 8 houve uma redução, embora não significativa, da  
271 expressão dessas enzimas, mostrando uma tendência em retornar ao que é considerado o estado basal,  
272 onde as concentrações enzimáticas estão controladas, permitindo uma concentração fisiológica  
273 normal dos endocabinoides no organismo. Novamente, é necessário também levar em conta que,  
274 embora a literatura mostre que o CBD tem potencial de agir sobre MGLL e FAAH (44), outros  
275 fármacos também podem influenciar na expressão dessas enzimas. A administração crônica de alguns  
276 fármacos antidepressivos – como imipramina e tianeptina – aumentam os níveis de AEA e 2-AG no  
277 hipocampo e estriado dorsal (45), e isso parece também acontecer na periferia, conforme mostram  
278 nossos achados.

279 Por fim, nossos achados mostram uma tendência de melhora dos pacientes, uma vez que NF-  
280  $\kappa$ B teve seus níveis equilibrados com Nrf2. Isso representa uma potencial melhora para os pacientes,  
281 uma vez que a expressão de citocinas inflamatórias será neutralizada pelos mecanismos de proteção  
282 do organismo, entre eles a elevação da resposta antioxidante. Além disso, o tratamento (CBD ou  
283 placebo) reduziu a expressão desses genes próxima aos seus níveis no estado fisiologicamente  
284 saudável. Embora não seja possível quebrar o cegamento do estudo nesse momento, acreditamos que,  
285 quando dividirmos o grupo tratado em grupos CBD e placebo, provavelmente poderemos afirmar que  
286 esses efeitos positivos sejam consequentes do tratamento com CBD.

## 287 **5 Conflitos de Interesse**

288 Os autores não possuem conflitos de interesse a declarar.

## 289 **6 Contribuições dos Autores**

290 GHH: desenho experimental, realização dos experimentos, análise e interpretação dos dados,  
291 discussão dos resultados e preparo do manuscrito; GB: desenho experimental, realização dos  
292 experimentos, análise e interpretação dos dados, revisão do manuscrito; FEV: recrutamento de  
293 controles; KMMC, JVMMP, EMSJ, MFVS: consultas clínicas e acompanhamento dos pacientes;  
294 FDRP: análise estatística; MKS: desenho experimental, discussão dos resultados, revisão do  
295 manuscrito.

## 296 **7 Financiamento**

297 Este estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de  
298 Clínicas de Porto Alegre (FIPE - HCPA), e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
299 Tecnológico (CNPq).

## 300 **8 Agradecimentos**

301 Os autores agradecem o apoio financeiro fornecido pelos órgãos de fomento (FIPE-HCPA e  
302 CNPq).

303

304

305 **9 Referências**

- 306 1. Vieta E, Berk M, Schulze TG, Carvalho AF, Suppes T, Calabrese JR, Gao K, Miskowiak KW,  
307 Grande I. Bipolar disorders. *Nat Rev Dis Primers* (2018) **4**:18008. doi:10.1038/nrdp.2018.8
- 308 2. Harrison PJ, Geddes JR, Tunbridge EM. The Emerging Neurobiology of Bipolar Disorder.  
309 *Trends Neurosci* (2018) **41**:18–30. doi:10.1016/j.tins.2017.10.006
- 310 3. Tondo L, Vázquez GH, Baldessarini RJ. Depression and Mania in Bipolar Disorder. *Curr*  
311 *Neuropharmacol* (2017) **15**:353–358. doi:10.2174/1570159X14666160606210811
- 312 4. Shim IH, Woo YS, Jun T-Y, Bahk W-M. Mixed-state bipolar I and II depression: time to  
313 remission and clinical characteristics. *J Affect Disord* (2014) **152–154**:340–346.  
314 doi:10.1016/j.jad.2013.09.035
- 315 5. Merikangas KR, Jin R, He J-P, Kessler RC, Lee S, Sampson NA, Viana MC, Andrade LH, Hu  
316 C, Karam EG, et al. Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental  
317 health survey initiative. *Arch Gen Psychiatry* (2011) **68**:241–251.  
318 doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.12
- 319 6. Elhaik E, Zandi P. Dysregulation of the NF- $\kappa$ B pathway as a potential inducer of bipolar  
320 disorder. *J Psychiatr Res* (2015) **70**:18–27. doi:10.1016/j.jpsychires.2015.08.009
- 321 7. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2013)  
322 **53**:401–426. doi:10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320
- 323 8. Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free*  
324 *Radic Biol Med* (2015) **88**:179–188. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.036
- 325 9. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*  
326 (2018) **29**:1727–1745. doi:10.1089/ars.2017.7342
- 327 10. Ramezani A, Nahad MP, Faghihloo E. The role of Nrf2 transcription factor in viral infection. *J*  
328 *Cell Biochem* (2018) **119**:6366–6382. doi:10.1002/jcb.26897
- 329 11. Wang X, Campbell MR, Lacher SE, Cho H-Y, Wan M, Crowl CL, Chorley BN, Bond GL,  
330 Kleeberger SR, Slattery M, et al. A Polymorphic Antioxidant Response Element Links  
331 NRF2/sMAF Binding to Enhanced MAPT Expression and Reduced Risk of Parkinsonian  
332 Disorders. *Cell Rep* (2016) **15**:830–842. doi:10.1016/j.celrep.2016.03.068
- 333 12. Velichkova M, Hasson T. Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out  
334 of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism. *Mol Cell Biol* (2005) **25**:4501–  
335 4513. doi:10.1128/MCB.25.11.4501-4513.2005
- 336 13. Zoja C, Benigni A, Remuzzi G. The Nrf2 pathway in the progression of renal disease. *Nephrol*  
337 *Dial Transplant* (2014) **29 Suppl 1**:i19–i24. doi:10.1093/ndt/gft224
- 338 14. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target*  
339 *Ther* (2017) **2**: doi:10.1038/sigtrans.2017.23

- 340 15. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu*  
341 *Rev Immunol* (1994) **12**:141–179. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001041
- 342 16. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation.  
343 *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2009) **1**:a000034. doi:10.1101/cshperspect.a000034
- 344 17. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* (1999)  
345 **18**:6853–6866. doi:10.1038/sj.onc.1203239
- 346 18. Muneer A. Bipolar Disorder: Role of Inflammation and the Development of Disease  
347 Biomarkers. *Psychiatry Investig* (2016) **13**:18–33. doi:10.4306/pi.2016.13.1.18
- 348 19. Stertz L, Magalhães PVS, Kapczinski F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The  
349 relevance of microglial activation. *Curr Opin Psychiatry* (2013) **26**:19–26.  
350 doi:10.1097/YCO.0b013e32835aa4b4
- 351 20. Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and  
352 NF-κB response pathways. *Biochem Soc Trans* (2015) **43**:621–626. doi:10.1042/BST20150014
- 353 21. Balon R. Old but still gold: Lithium in stabilizing the mood. *Indian J Psychiatry* (2009) **51**:157–  
354 158. doi:10.4103/0019-5545.49460
- 355 22. Ashton CH, Moore PB, Gallagher P, Young AH. Cannabinoids in bipolar affective disorder: a  
356 review and discussion of their therapeutic potential. *J Psychopharmacol (Oxford)* (2005)  
357 **19**:293–300. doi:10.1177/0269881105051541
- 358 23. Lu H-C, Mackie K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol Psychiatry*  
359 (2016) **79**:516–525. doi:10.1016/j.biopsych.2015.07.028
- 360 24. Saito VM, Wotjak CT, Moreira FA. [Pharmacological exploitation of the endocannabinoid  
361 system: new perspectives for the treatment of depression and anxiety disorders?]. *Braz J*  
362 *Psychiatry* (2010) **32 Suppl 1**:S7-14.
- 363 25. Mandolini GM, Lazzaretti M, Pigoni A, Oldani L, Delvecchio G, Brambilla P. Pharmacological  
364 properties of cannabidiol in the treatment of psychiatric disorders: a critical overview.  
365 *Epidemiol Psychiatr Sci* (2018) **27**:327–335. doi:10.1017/S2045796018000239
- 366 26. Crippa JA, Guimarães FS, Campos AC, Zuardi AW. Translational Investigation of the  
367 Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD): Toward a New Age. *Front Immunol* (2018)  
368 **9**:2009. doi:10.3389/fimmu.2018.02009
- 369 27. Limebeer CL, Rock EM, Sharkey KA, Parker LA. Nausea-Induced 5-HT Release in the  
370 Interoceptive Insular Cortex and Regulation by Monoacylglycerol Lipase (MAGL) Inhibition  
371 and Cannabidiol. *eNeuro* (2018) **5**: doi:10.1523/ENEURO.0256-18.2018
- 372 28. Li H, Wood JT, Whitten KM, Vadivel SK, Seng S, Makriyannis A, Avraham HK. Inhibition of  
373 fatty acid amide hydrolase activates Nrf2 signalling and induces heme oxygenase 1 transcription  
374 in breast cancer cells. *Br J Pharmacol* (2013) **170**:489–505. doi:10.1111/bph.12111

- 375 29. Kozela E, Pietr M, Juknat A, Rimmerman N, Levy R, Vogel Z. Cannabinoids Delta(9)-  
376 tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-  
377 kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. *J Biol*  
378 *Chem* (2010) **285**:1616–1626. doi:10.1074/jbc.M109.069294
- 379 30. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative  
380 PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (2001) **25**:402–408.  
381 doi:10.1006/meth.2001.1262
- 382 31. Miklowitz DJ, Portnoff LC, Armstrong CC, Keenan-Miller D, Breen EC, Muscatell KA,  
383 Eisenberger NI, Irwin MR. Inflammatory cytokines and nuclear factor-kappa B activation in  
384 adolescents with bipolar and major depressive disorders. *Psychiatry Res* (2016) **241**:315–322.  
385 doi:10.1016/j.psychres.2016.04.120
- 386 32. Nichols JM, Kaplan BLF. Immune Responses Regulated by Cannabidiol. *Cannabis and*  
387 *Cannabinoid Research* (2019) doi:10.1089/can.2018.0073
- 388 33. Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen  
389 synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* (2000) **406**:86–90.  
390 doi:10.1038/35017574
- 391 34. Chuang D-M, Wang Z, Chiu C-T. GSK-3 as a Target for Lithium-Induced Neuroprotection  
392 Against Excitotoxicity in Neuronal Cultures and Animal Models of Ischemic Stroke. *Front Mol*  
393 *Neurosci* (2011) **4**:15. doi:10.3389/fnmol.2011.00015
- 394 35. Wang Y, Huang WC, Wang CY, Tsai CC, Chen CL, Chang YT, Kai JI, Lin CF. Inhibiting  
395 glycogen synthase kinase-3 reduces endotoxaemic acute renal failure by down-regulating  
396 inflammation and renal cell apoptosis. *Br J Pharmacol* (2009) **157**:1004–1013.  
397 doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00284.x
- 398 36. Rao JS, Bazinet RP, Rapoport SI, Lee H-J. Chronic treatment of rats with sodium valproate  
399 downregulates frontal cortex NF-kappaB DNA binding activity and COX-2 mRNA. *Bipolar*  
400 *Disord* (2007) **9**:513–520. doi:10.1111/j.1399-5618.2007.00361.x
- 401 37. Tian M, Yang M, Li Z, Wang Y, Chen W, Yang L, Li Y, Yuan H. Fluoxetine suppresses  
402 inflammatory reaction in microglia under OGD/R challenge via modulation of NF-κB signaling.  
403 *Biosci Rep* (2019) **39**: doi:10.1042/BSR20181584
- 404 38. Chen M-L, Tsai T-C, Lin Y-Y, Tsai Y-M, Wang L-K, Lee M-C, Tsai F-M. Antipsychotic drugs  
405 suppress the AKT/NF-κB pathway and regulate the differentiation of T-cell subsets. *Immunol*  
406 *Lett* (2011) **140**:81–91. doi:10.1016/j.imlet.2011.06.011
- 407 39. Bi X, Yan B, Fang S, Yang Y, He J, Li X-M, Kong J. Quetiapine regulates neurogenesis in  
408 ischemic mice by inhibiting NF-kappaB p65/p50 expression. *Neurol Res* (2009) **31**:159–166.  
409 doi:10.1179/174313209X393573
- 410 40. Kerr F, Sofola-Adesakin O, Ivanov DK, Gatliff J, Gomez Perez-Nievas B, Bertrand HC,  
411 Martinez P, Callard R, Snoeren I, Cochemé HM, et al. Direct Keap1-Nrf2 disruption as a  
412 potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *PLoS Genet* (2017) **13**:e1006593.  
413 doi:10.1371/journal.pgen.1006593

- 414 41. Palsamy P, Bidasee KR, Shinohara T. Valproic acid suppresses Nrf2/Keap1 dependent  
415 antioxidant protection through induction of endoplasmic reticulum stress and Keap1 promoter  
416 DNA demethylation in human lens epithelial cells. *Exp Eye Res* (2014) **121**:26–34.  
417 doi:10.1016/j.exer.2014.01.021
- 418 42. Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu R-M, Hagen TM. Decline in  
419 transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is  
420 reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) **101**:3381–3386.  
421 doi:10.1073/pnas.0400282101
- 422 43. Muguruza C, Morentin B, Meana JJ, Alexander SP, Callado LF. Endocannabinoid system  
423 imbalance in the postmortem prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J*  
424 *Psychopharmacol (Oxford)* (2019) **33**:1132–1140. doi:10.1177/0269881119857205
- 425 44. Leweke FM, Piomelli D, Pahlisch F, Muhl D, Gerth CW, Hoyer C, Klosterkötter J, Hellmich M,  
426 Koethe D. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of  
427 schizophrenia. *Transl Psychiatry* (2012) **2**:e94. doi:10.1038/tp.2012.15
- 428 45. Smaga I, Bystrowska B, Gawliński D, Pomierny B, Stankowicz P, Filip M. Antidepressants and  
429 changes in concentration of endocannabinoids and N-acylethanolamines in rat brain structures.  
430 *Neurotox Res* (2014) **26**:190–206. doi:10.1007/s12640-014-9465-0



431 **Legendas das Figuras**

432 **Figura 1.** Níveis relativos de mRNA de NF- $\kappa$ B em pacientes com TB e controles. Os resultados são  
433 apresentados como mediana  $\pm$  intervalo interquartílico (n = 15, no grupo Controle; n = 9, no grupo  
434 Paciente). Níveis de significância (\*) foram considerados quando  $p < 0,05$  no teste de Mann-  
435 Whitney.

436 **Figura 2.** Níveis relativos de mRNA de NF- $\kappa$ B em pacientes com TB antes do início do tratamento  
437 com CBD ou placebo (Semana 0) e após 8 semanas de tratamento (Semana 8). Os resultados são  
438 apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 9, no grupo Semana 0; n = 12, no grupo Semana 8).  
439 Níveis de significância (\*) foram considerados quando  $p < 0,05$  no teste *t* de Student para dados não  
440 pareados.

441 **Figura 3.** Níveis relativos de mRNA de Nrf2 em pacientes com TB e controles. Os resultados são  
442 apresentados como mediana  $\pm$  intervalo interquartílico (n = 19, no grupo Controle; n = 16, no grupo  
443 Paciente). Níveis de significância (\*) foram considerados quando  $p < 0,05$  no teste de Mann-  
444 Whitney.

445 **Figura 4.** Níveis relativos de mRNA de Nrf2 em pacientes com TB antes do início do tratamento  
446 com CBD ou placebo (Semana 0) e após 8 semanas de tratamento (Semana 8). Os resultados são  
447 apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 16, no grupo Semana 0; n = 11, no grupo Semana 8).  
448 Níveis de significância (\*) foram considerados quando  $p < 0,05$  no teste *t* de Student para dados não  
449 pareados.

450 **Figura 5.** Níveis relativos de mRNA de MGLL em pacientes com TB e controles. Os resultados são  
451 apresentados como mediana  $\pm$  intervalo interquartílico (n = 19, no grupo Controle; n = 7, no grupo  
452 Paciente). Níveis de significância (\*) foram considerados quando  $p < 0,05$  no teste de Mann-  
453 Whitney.

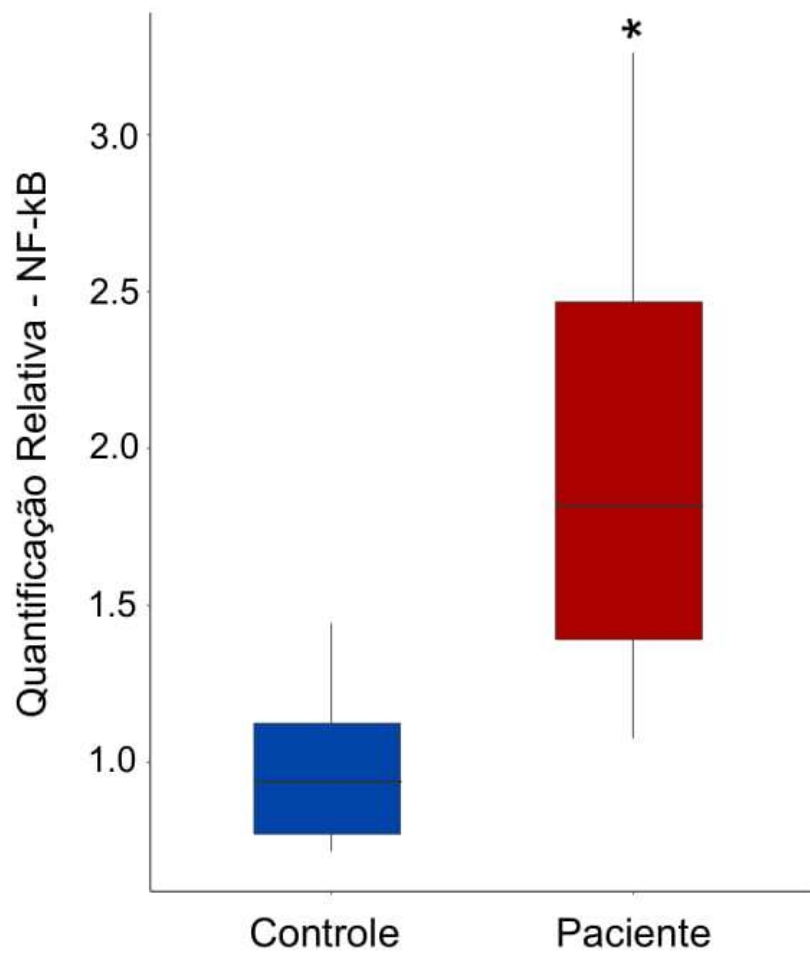
454 **Figura 6.** Níveis relativos de mRNA de MGLL em pacientes com TB antes do início do tratamento  
455 com CBD ou placebo (Semana 0) e após 8 semanas de tratamento (Semana 8). Os resultados são  
456 apresentados como mediana  $\pm$  intervalo interquartílico (n = 7, no grupo Semana 0; n = 11, no grupo  
457 Semana 8). Não houve diferença significativa, considerando  $p < 0,05$  no teste de Mann-Whitney.

458 **Figura 7.** Níveis relativos de mRNA de FAAH em pacientes com TB e controles. Os resultados são  
459 apresentados como mediana  $\pm$  intervalo interquartílico (n = 8, no grupo Controle; n = 5, no grupo  
460 Paciente). Níveis de significância (\*) foram considerados quando  $p < 0,05$  no teste de Mann-  
461 Whitney.

462 **Figura 8.** Níveis relativos de mRNA de FAAH em pacientes com TB antes do início do tratamento  
463 com CBD ou placebo (Semana 0) e após 8 semanas de tratamento (Semana 8). Os resultados são  
464 apresentados como mediana  $\pm$  intervalo interquartílico (n = 5, no grupo Semana 0; n = 7, no grupo  
465 Semana 8). Não houve diferença significativa, considerando  $p < 0,05$  no teste de Mann-Whitney.

466 Figuras

467 Figura 1



468

469

470

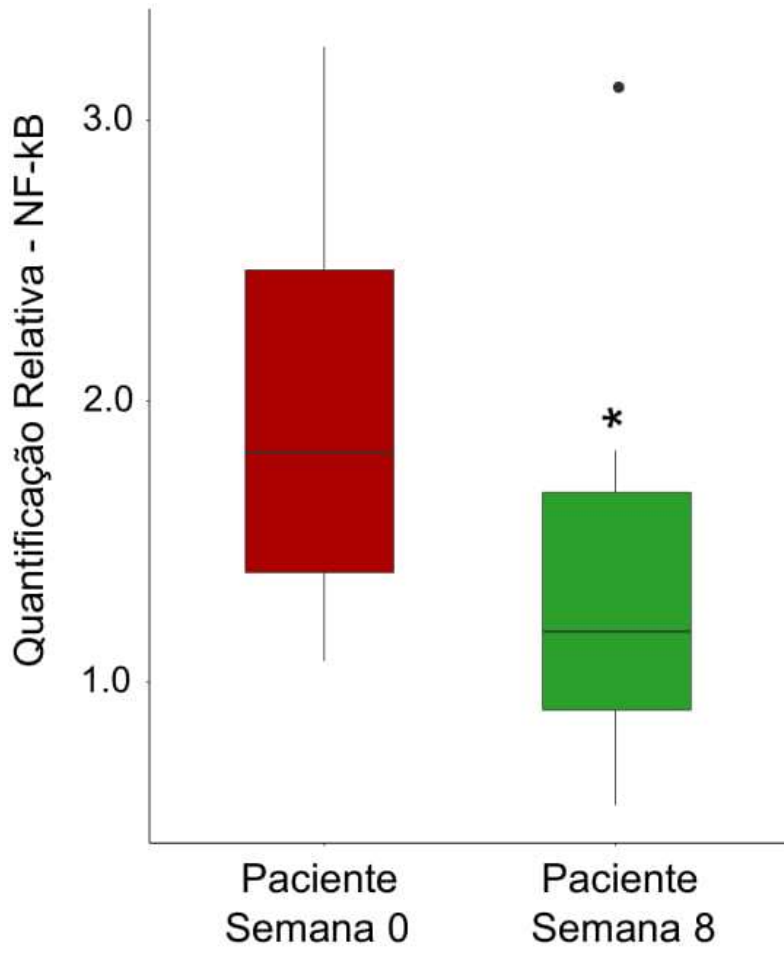
471

472

473

474 Figura 2

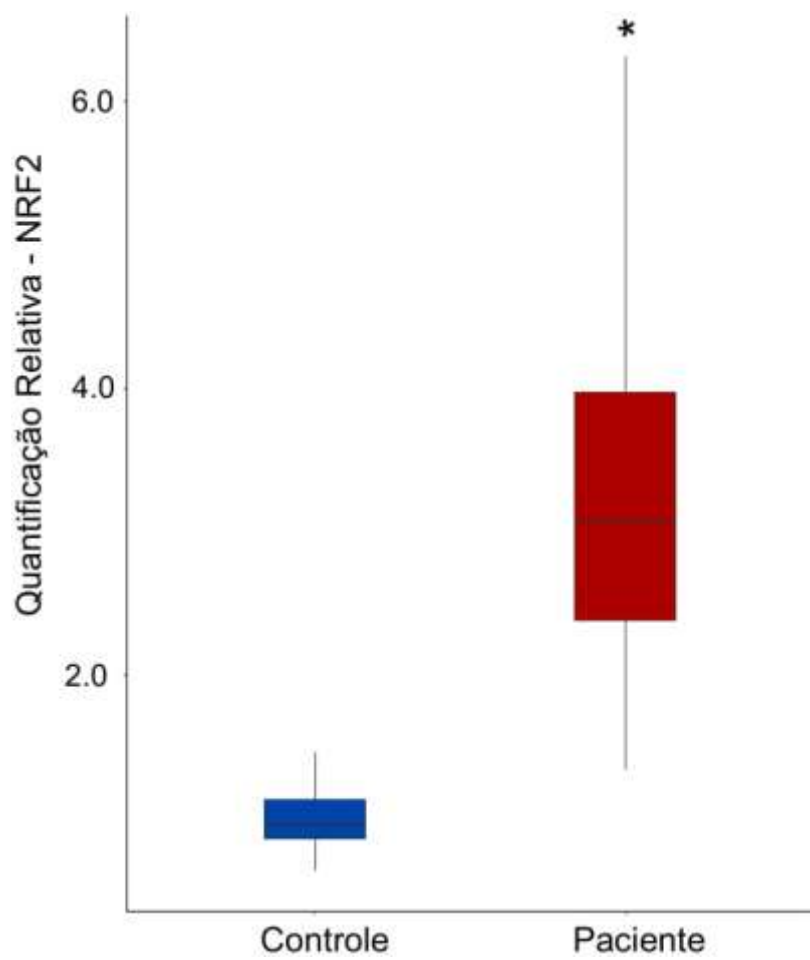
475



476

477 Figura 3

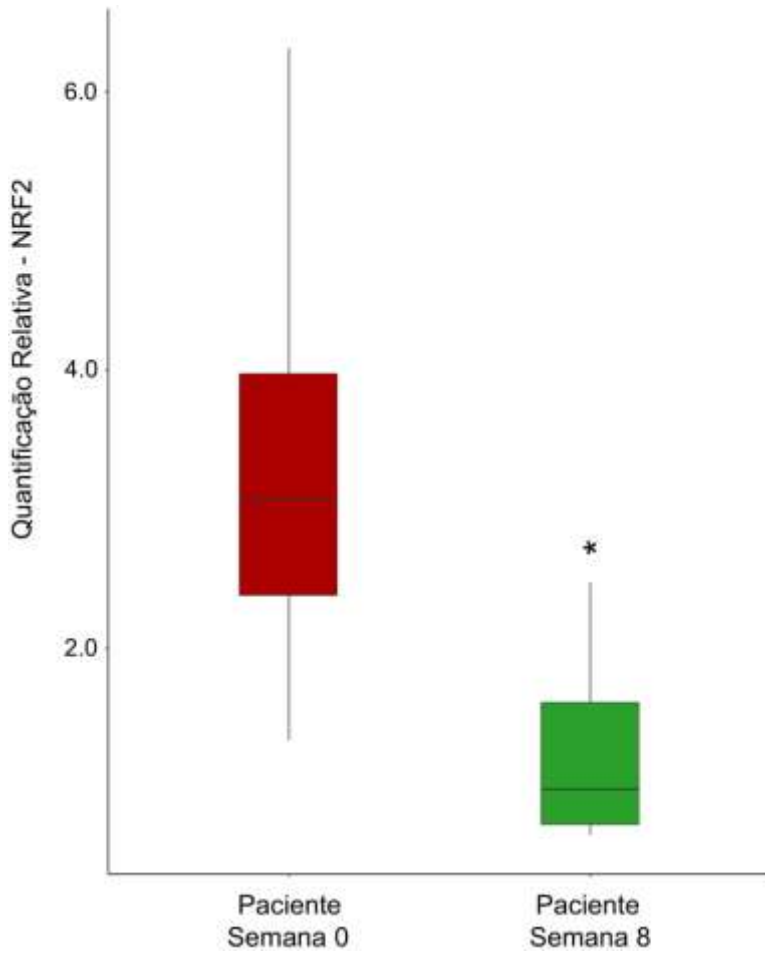
478



479

480 Figura 4

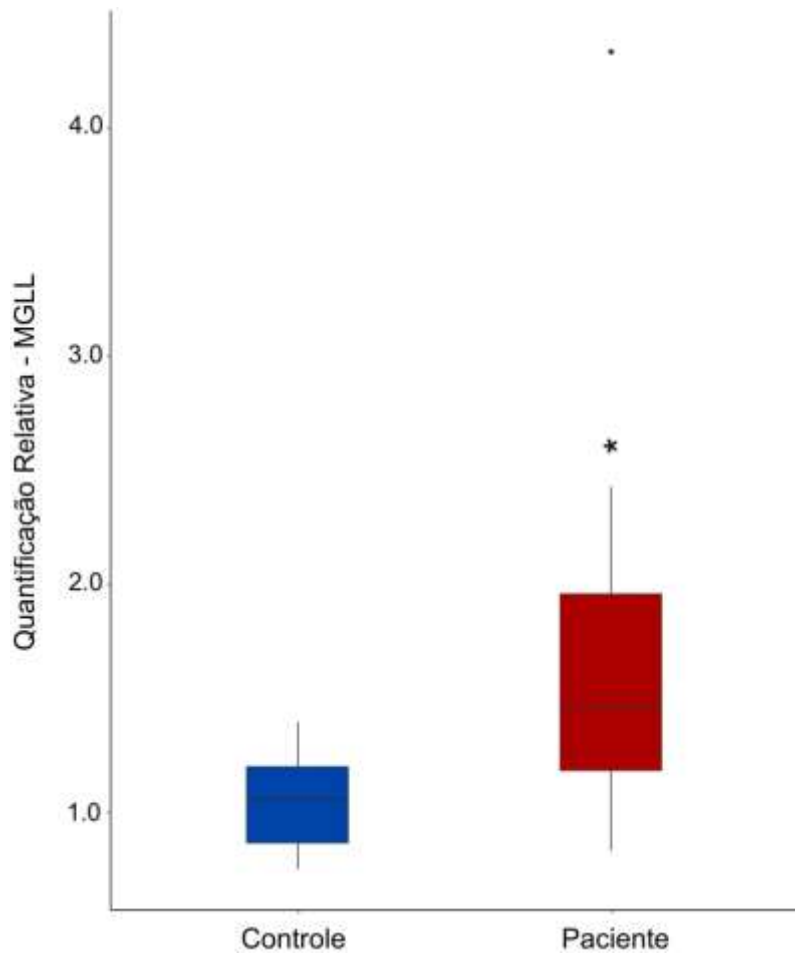
481



482

483 Figura 5

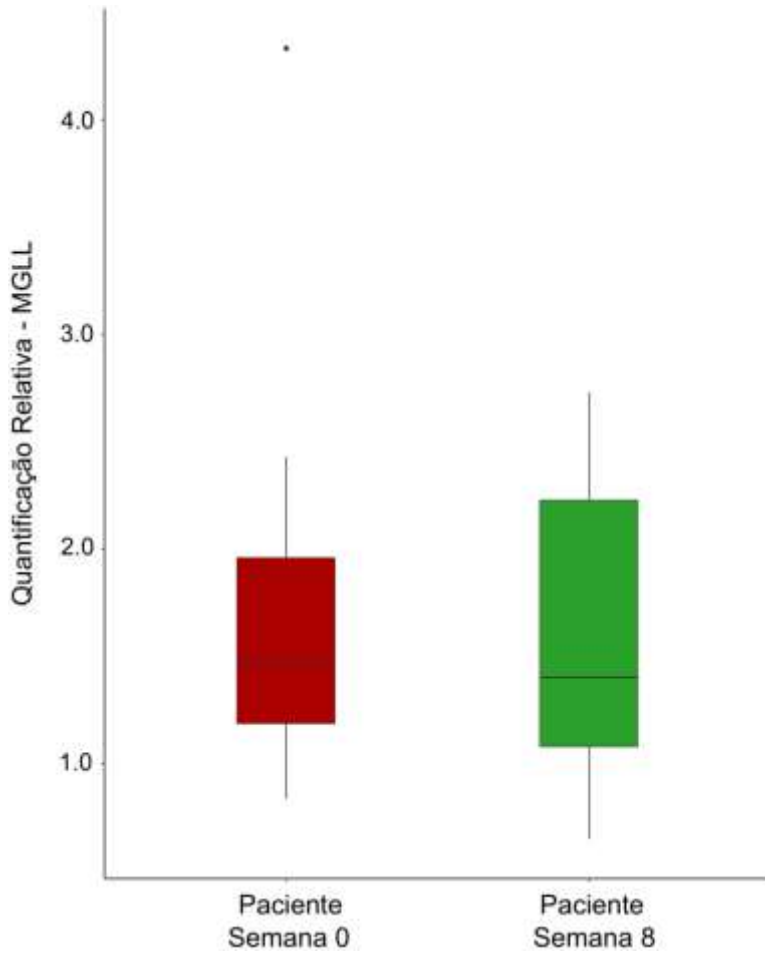
484



485

486 Figura 6

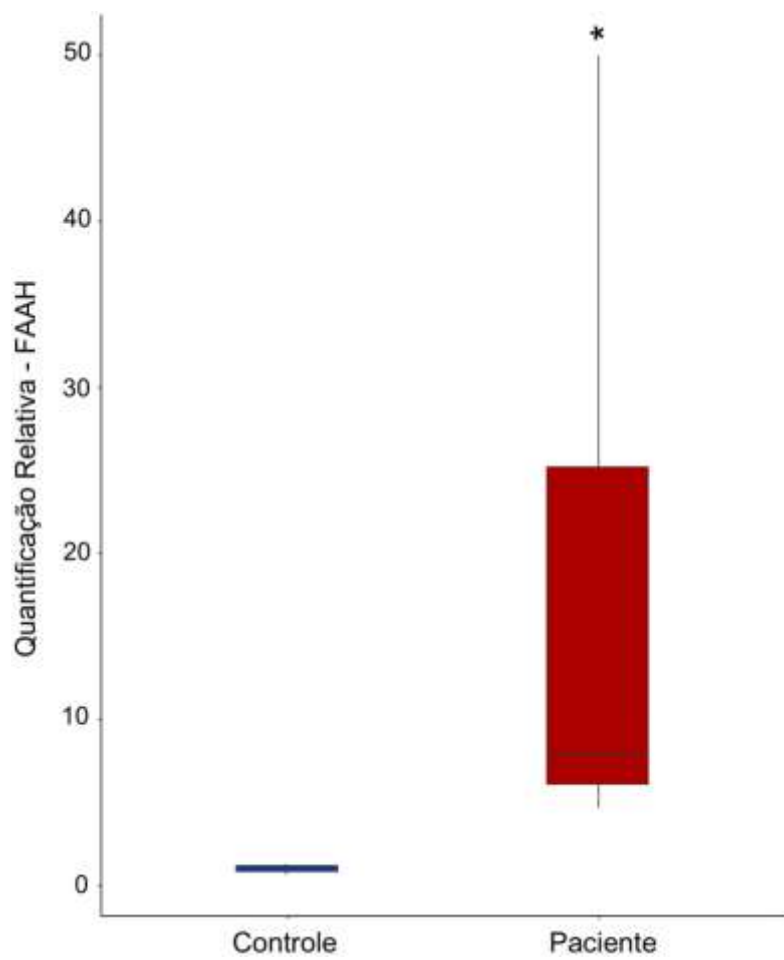
487



488

489 Figura 7

490

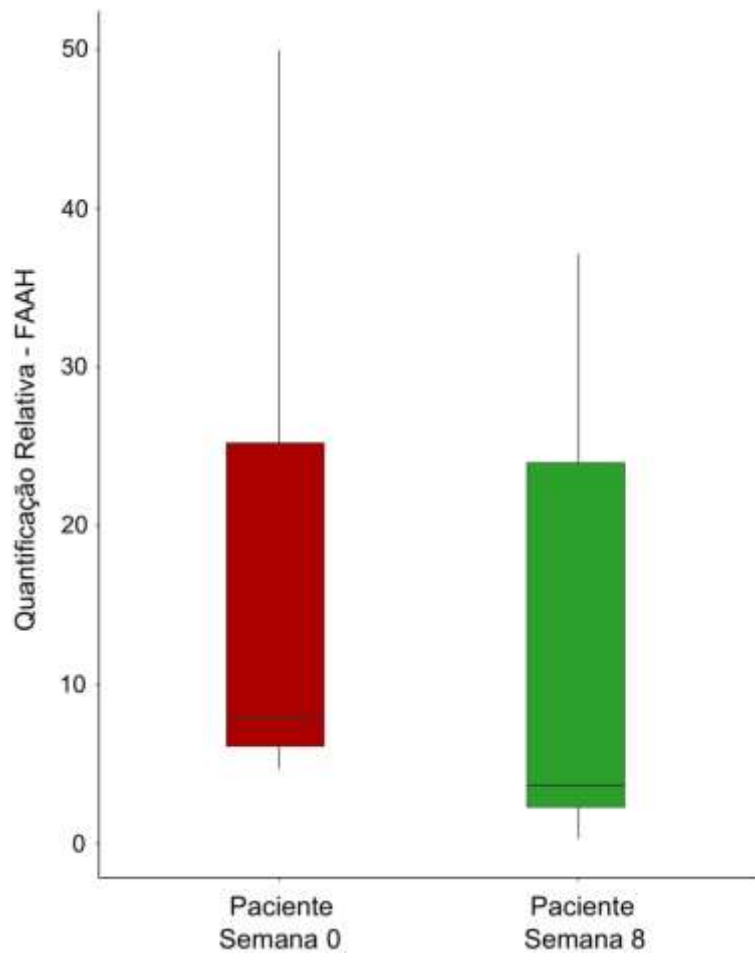


491



492 Figura 8

493



494

**Tabela 1.** Características demográficas.

	<b>Controles</b>	<b>Pacientes</b>	<b>p</b>
	<b>n = 28</b>	<b>n = 28</b>	
<b>Idade (anos)</b>	45 (33,5 – 53,5)	42.5 (37 - 47)	0.561 <sup>a</sup>
<b>Gênero (F)</b>	75% (21)	64% (18)	0.538 <sup>b</sup>

Colunas mostram a mediana  $\pm$  intervalo interquartílico (25<sup>o</sup> e 75<sup>o</sup> percentis) para idade. Os dados são apresentados % (n) para a variável categórica. F: feminino. <sup>a</sup> = teste chi-quadrado de Pearson, <sup>b</sup> = teste de Mann-Whitney.

### 3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados preliminares apresentados neste trabalho mostram uma tendência de melhora dos pacientes, uma vez que NF- $\kappa$ B teve seus níveis equilibrados com Nrf2. Além disso, o tratamento (CBD ou placebo) reduziu a expressão desses genes, próximo aos seus níveis no estado saudável. No entanto, a fim de respeitar a metodologia proposta – ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo (NCT 03310593) – não foi possível quebrarmos o cegamento do estudo neste momento, dividindo os pacientes com TB em grupo placebo e grupo tratado com CBD.

Além disso, diversas amostras não apresentaram detecção no qPCR em tempo real. A ausência de detecção não implica necessariamente em ausência da expressão do gene, mas que pode estar expresso em níveis muito baixos. Isso porque devemos considerar que se pudéssemos ter usado uma quantidade maior de RNA para realizar a síntese de cDNA, ou um volume maior de amostra de cDNA nos ensaios do qPCR, talvez haveríamos observado amplificação dos genes nessas amostras. Desta forma, as amostras nas quais não foi observada detecção para determinado gene não puderam ser usadas nos cálculos de quantificação relativa pelo método de  $\Delta\Delta C_t$ . Sendo assim, a fim de melhorar nossos resultados, temos como perspectivas futuras:

- 1) Aumentar o tamanho amostral do estudo, principalmente para o grupo de pacientes. Como trata-se de um estudo em andamento, já é previsto um aumento no número de inclusões. Dessa forma, ainda que algumas amostras não sejam detectadas no qPCR em tempo real, o número de amostras será grande o suficiente para mostrar um desfecho próximo do real e mais confiável.
- 2) Após a quebra do cegamento no desfecho do estudo, separar o grupo paciente em grupo tratado com CBD e grupo placebo, identificando assim o causador da redução significativa nos níveis de expressão gênica de NF- $\kappa$ B e Nrf2. Uma vez dividido em grupo tratado com CBD e grupo placebo, também podemos comparar novamente os grupos W00 e W08 e verificar se os pacientes com placebo não estão impedindo que haja diferença significativa em relação aos genes MGLL e FAAH.
- 3) Avaliar a expressão gênica dos principais receptores endocanabinoides – CB1 e CB2 – no sistema periférico, a fim de compreender melhor os possíveis mecanismos de ação do CBD.
- 4) Após o desfecho do estudo, correlacionar os dados de expressão de mRNA dos genes estudados com os dados clínicos dos pacientes (tempo de doença, número de episódios,

pontuação nas principais escalas padronizadas na psiquiatria, por exemplo). Além disso, avaliar a segurança e a tolerabilidade do CBD como adjuvante no tratamento do TB.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, G. et al. Bipolar Disorder: The Role of the Kynurenine and Melatonergic Pathways. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 8, p. 987–1012, 2016.
- ANDREAZZA, A. C. et al. Oxidative stress in older patients with bipolar disorder. **The American Journal of Geriatric Psychiatry: Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry**, v. 23, n. 3, p. 314–319, mar. 2015.
- ASHOK, A. H. et al. The dopamine hypothesis of bipolar affective disorder: the state of the art and implications for treatment. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 5, p. 666–679, 2017.
- ASHTON, C. H. et al. Cannabinoids in bipolar affective disorder: a review and discussion of their therapeutic potential. **Journal of Psychopharmacology**, v. 19, n. 3, p. 293–300, maio 2005.
- BAEUERLE, P. A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 141–179, 1994.
- BALOCH, H. A. et al. Morphology of the subgenual prefrontal cortex in pediatric bipolar disorder. **Journal of Psychiatric Research**, v. 44, n. 15, p. 1106–1110, nov. 2010.
- BALON, R. Old but still gold: Lithium in stabilizing the mood. **Indian Journal of Psychiatry**, v. 51, n. 2, p. 157, 2009.
- BARBOSA, I. G. et al. Chemokines in bipolar disorder: trait or state? **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 263, n. 2, p. 159–165, mar. 2013.
- BASTIAMPILLAI, T. et al. NICE guidance: why not clozapine for treatment-refractory bipolar disorder? **The Lancet. Psychiatry**, v. 3, n. 6, p. 502–503, 2016.
- BAUER, M.; PFENNIG, A. Epidemiology of bipolar disorders. **Epilepsia**, v. 46 Suppl 4, p. 8–13, 2005.
- BERK, M. et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 804–817, jan. 2011.
- BIENVENU, O. J.; DAVYDOW, D. S.; KENDLER, K. S. Psychiatric “diseases” versus behavioral disorders and degree of genetic influence. **Psychological Medicine**, v. 41, n. 1, p. 33–40, jan. 2011.
- BIERNACKI, M. et al. PP22 - Liver antioxidant defense after FAAH inhibitor - URB-597 administration to DOCA-salt-induced hypertension in rats. **Free Radical Biology and Medicine**, SFRR-E/SNFS Conference Abstracts, Stuttgart 2015. v. 86, p. S26, 1 set. 2015.
- BOOZ, G. W. Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 5, p. 1054–1061, 1 set. 2011.

- BRAMNESS, J. G. et al. Amphetamine-induced psychosis - a separate diagnostic entity or primary psychosis triggered in the vulnerable? **BMC Psychiatry**, v. 12, p. 221, 5 dez. 2012.
- BRIETZKE, E. et al. Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 116, n. 3, p. 214–217, ago. 2009.
- BUCKLEY, N. E. et al. Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 396, n. 2–3, p. 141–149, 19 maio 2000.
- BURNETT-ZEIGLER, I.; BOHNERT, K. M.; ILGEN, M. A. Ethnic identity, acculturation and the prevalence of lifetime psychiatric disorders among black, Hispanic, and Asian adults in the U.S. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 1, p. 56–63, jan. 2013.
- CABRAL, G. A. et al. Anandamide inhibits macrophage-mediated killing of tumor necrosis factor-sensitive cells. **Life Sciences**, v. 56, n. 23–24, p. 2065–2072, 1995.
- CALKIN, C. V. et al. The relationship between bipolar disorder and type 2 diabetes: more than just co-morbid disorders. **Annals of Medicine**, v. 45, n. 2, p. 171–181, mar. 2013.
- CHEN, C.-H.; LIN, S.-K. Carbamazepine treatment of bipolar disorder: a retrospective evaluation of naturalistic long-term outcomes. **BMC psychiatry**, v. 12, p. 47, 23 maio 2012.
- CHIU, C.-T. et al. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 1, p. 105–142, jan. 2013.
- CHIURCHIÙ, V. Endocannabinoids and Immunity. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 1, n. 1, p. 59–66, 2016.
- CINGI YIRÜN, M. et al. Evaluation of Oxidative Stress in Bipolar Disorder in terms of Total Oxidant Status, Total Antioxidant Status, and Oxidative Stress Index. **Noro Psikiyatri Arsivi**, v. 53, n. 3, p. 194–198, set. 2016.
- CLAY, H. B.; SILLIVAN, S.; KONRADI, C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. **International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 3, p. 311–324, maio 2011.
- COOPMAN, K. et al. Temporal variation in CB2R levels following T lymphocyte activation: evidence that cannabinoids modulate CXCL12-induced chemotaxis. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 3, p. 360–371, mar. 2007.
- CRIPPA, J. A. et al. Translational Investigation of the Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD): Toward a New Age. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2009, 21 set. 2018.
- DE SOUSA, R. T. et al. Oxidative stress in early stage Bipolar Disorder and the association with response to lithium. **Journal of Psychiatric Research**, v. 50, p. 36–41, mar. 2014.
- DEROCQ, J. M. et al. The endogenous cannabinoid anandamide is a lipid messenger activating cell growth via a cannabinoid receptor-independent pathway in hematopoietic cell lines. **FEBS letters**, v. 425, n. 3, p. 419–425, 3 abr. 1998.

DEVANE, W. A. et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 34, n. 5, p. 605–613, nov. 1988.

DI MARZO, V. New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 17, n. 9, p. 623–639, 2018.

DI MARZO, V.; BIFULCO, M.; DE PETROCELLIS, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 771–784, set. 2004.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; ABRAMOV, A. Y. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 88, n. Pt B, p. 179–188, nov. 2015.

DREVETS, W. C.; SAVITZ, J.; TRIMBLE, M. The subgenual anterior cingulate cortex in mood disorders. **CNS spectrums**, v. 13, n. 8, p. 663–681, ago. 2008.

ELHAIK, E.; ZANDI, P. Dysregulation of the NF- $\kappa$ B pathway as a potential inducer of bipolar disorder. **Journal of Psychiatric Research**, v. 70, p. 18–27, nov. 2015.

ERDEM, M. et al. Bipolar disorder and oxidative stress. **Journal of Mood Disorders**, v. 4, n. 2, p. 70, 2014.

FRIES, G. R. et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction and illness progression in bipolar disorder. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 1, 31 out. 2014.

FRIES, G. R. et al. Revisiting inflammation in bipolar disorder. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 177, p. 12–19, 2019.

GARRETT, A.; CHANG, K. The role of the amygdala in bipolar disorder development. **Development and Psychopathology**, v. 20, n. 4, p. 1285–1296, 2008.

HARRISON, P. J.; GEDDES, J. R.; TUNBRIDGE, E. M. The Emerging Neurobiology of Bipolar Disorder. **Trends in Neurosciences**, v. 41, n. 1, p. 18–30, 2018.

HWANG, J. et al. Basal ganglia shape alterations in bipolar disorder. **The American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 2, p. 276–285, fev. 2006.

JACOBY, A. S. et al. Increased DNA and RNA damage by oxidation in patients with bipolar I disorder. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 8, p. e867, 09 2016.

JONES, L. D. et al. Temporal lobe volume in bipolar disorder: relationship with diagnosis and antipsychotic medication use. **Journal of Affective Disorders**, v. 114, n. 1–3, p. 50–57, abr. 2009.

JUN, C. et al. Disturbance of the glutamatergic system in mood disorders. **Experimental Neurobiology**, v. 23, n. 1, p. 28–35, mar. 2014.

KAMEYAMA, M. et al. Frontal lobe function in bipolar disorder: a multichannel near-infrared spectroscopy study. **NeuroImage**, v. 29, n. 1, p. 172–184, 1 jan. 2006.

KAPCZINSKI, F. et al. Brain-derived neurotrophic factor and neuroplasticity in bipolar disorder. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 8, n. 7, p. 1101–1113, jul. 2008.

KAPCZINSKI, F.; FREY, B. N.; ZANNATTO, V. [Physiopathology of bipolar disorders: what have changed in the last 10 years?]. **Revista Brasileira De Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil: 1999)**, v. 26 Suppl 3, p. 17–21, out. 2004.

KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. **Transtorno Bipolar: Teoria e Clínica**. 2<sup>a</sup> ed. [s.l.] Artmed Editora, 2015.

KAUER-SANT'ANNA, M. et al. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 447–458, maio 2009.

KEENER, M. T.; PHILLIPS, M. L. Neuroimaging in bipolar disorder: a critical review of current findings. **Current Psychiatry Reports**, v. 9, n. 6, p. 512–520, dez. 2007.

KENDALL, D. A.; YUDOWSKI, G. A. Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System: Their Signaling and Roles in Disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, p. 294, 2016.

KESSLER, R. C. et al. The epidemiology of DSM-III-R bipolar I disorder in a general population survey. **Psychological Medicine**, v. 27, n. 5, p. 1079–1089, set. 1997.

KHOURY, J. M. et al. Is there a role for cannabidiol in psychiatry? **The World Journal of Biological Psychiatry: The Official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry**, v. 20, n. 2, p. 101–116, 2019.

KOZELA, E. et al. Cannabinoids Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 3, p. 1616–1626, 15 jan. 2010.

KREUTZ, S. et al. 2-Arachidonoylglycerol elicits neuroprotective effects on excitotoxically lesioned dentate gyrus granule cells via abnormal-cannabidiol-sensitive receptors on microglial cells. **Glia**, v. 57, n. 3, p. 286–294, fev. 2009.

KUNZ, M. et al. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. **Revista Brasileira De Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil: 1999)**, v. 33, n. 3, p. 268–274, set. 2011.

KURITA, M. Noradrenaline plays a critical role in the switch to a manic episode and treatment of a depressive episode. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 12, p. 2373–2380, 2016.

LEBOYER, M. et al. Age at onset in bipolar affective disorders: a review. **Bipolar Disorders**, v. 7, n. 2, p. 111–118, abr. 2005.

LEE, M.; YANG, K. H.; KAMINSKI, N. E. Effects of putative cannabinoid receptor ligands, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, on immune function in B6C3F1 mouse splenocytes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 275, n. 2, p. 529–536, nov. 1995.



LI, B. et al. Endogenous 2-Arachidonoylglycerol Alleviates Cyclooxygenases-2 Elevation-Mediated Neuronal Injury From SO<sub>2</sub> Inhalation via PPAR $\gamma$  Pathway. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 147, n. 2, p. 535–548, out. 2015.

LI, H. et al. Inhibition of fatty acid amide hydrolase activates Nrf2 signalling and induces heme oxygenase 1 transcription in breast cancer cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 170, n. 3, p. 489–505, out. 2013.

LI, Y.; KIM, J. Distinct roles of neuronal and microglial CB<sub>2</sub> cannabinoid receptors in the mouse hippocampus. **Neuroscience**, v. 363, p. 11–25, 5 nov. 2017.

LIMEBEER, C. L. et al. Nausea-Induced 5-HT Release in the Interoceptive Insular Cortex and Regulation by Monoacylglycerol Lipase (MAGL) Inhibition and Cannabidiol. **eneuro**, v. 5, n. 4, p. ENEURO.0256-18.2018, 2018.

LIU, T. et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, 2017.

LU, H.-C.; MACKIE, K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 7, p. 516–525, abr. 2016.

MA, Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, p. 401–426, 2013.

MACHADO-VIEIRA, R. et al. As bases neurobiológicas do transtorno bipolar. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 32, p. 28–33, 2005.

MANDOLINI, G. M. et al. Pharmacological properties of cannabidiol in the treatment of psychiatric disorders: a critical overview. **Epidemiology and Psychiatric Sciences**, v. 27, n. 4, p. 327–335, ago. 2018.

MANENSCHIJN, L. et al. Long-term cortisol in bipolar disorder: associations with age of onset and psychiatric co-morbidity. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 12, p. 1960–1968, dez. 2012.

MARLINGE, E.; BELLIVIER, F.; HOUENOU, J. White matter alterations in bipolar disorder: potential for drug discovery and development. **Bipolar Disorders**, v. 16, n. 2, p. 97–112, mar. 2014.

MCALLISTER, S. D.; GLASS, M. CB(1) and CB(2) receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 66, n. 2–3, p. 161–171, mar. 2002.

MECHAWAR, N.; SAVITZ, J. Neuropathology of mood disorders: do we see the stigmata of inflammation? **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 11, p. e946, 08 2016.

MECHOULAM, R.; PARKER, L. A.; GALLILY, R. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. S1, p. 11S-19S, 2002.

- MERIKANGAS, K. R. et al. Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. **Archives of General Psychiatry**, v. 68, n. 3, p. 241–251, mar. 2011.
- MERIKANGAS, K. R.; PATO, M. Recent Developments in the Epidemiology of Bipolar Disorder in Adults and Children: Magnitude, Correlates, and Future Directions. **Clinical Psychology: Science and Practice**, v. 16, n. 2, p. 121–133, 2009.
- MIKLOWITZ, D. J. et al. Inflammatory cytokines and nuclear factor-kappa B activation in adolescents with bipolar and major depressive disorders. **Psychiatry Research**, v. 241, p. 315–322, 30 jul. 2016.
- MOLINA-HOLGADO, F.; LLEDÓ, A.; GUAZA, C. Anandamide suppresses nitric oxide and TNF-alpha responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. **Neuroreport**, v. 8, n. 8, p. 1929–1933, 27 maio 1997.
- MOLINA-HOLGADO, F.; MOLINA-HOLGADO, E.; GUAZA, C. The endogenous cannabinoid anandamide potentiates interleukin-6 production by astrocytes infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus by a receptor-mediated pathway. **FEBS letters**, v. 433, n. 1–2, p. 139–142, 14 ago. 1998.
- MORENO, D. H.; ANDRADE, L. H. The lifetime prevalence, health services utilization and risk of suicide of bipolar spectrum subjects, including subthreshold categories in the São Paulo ECA study. **Journal of Affective Disorders**, v. 87, n. 2–3, p. 231–241, ago. 2005.
- MUNEER, A. Bipolar Disorder: Role of Inflammation and the Development of Disease Biomarkers. **Psychiatry Investigation**, v. 13, n. 1, p. 18, 2016a.
- MUNEER, A. The Treatment of Adult Bipolar Disorder with Aripiprazole: A Systematic Review. **Cureus**, v. 8, n. 4, p. e562, 7 abr. 2016b.
- MURASE, R. et al. Targeting multiple cannabinoid anti-tumour pathways with a resorcinol derivative leads to inhibition of advanced stages of breast cancer. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 19, p. 4464–4477, out. 2014.
- NAKAJIMA, Y. et al. Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF-kappaB pathway inhibition. **FEBS letters**, v. 580, n. 2, p. 613–619, 23 jan. 2006.
- NARASIMHAN, M.; BRUCE, T. O.; MASAND, P. Review of olanzapine in the management of bipolar disorders. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 3, n. 5, p. 579–587, 2007.
- NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH. Bipolar Disorder. p. 8, 2018.
- NAVARRETE, M.; DÍEZ, A.; ARAQUE, A. Astrocytes in endocannabinoid signalling. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 369, n. 1654, p. 20130599, 19 out. 2014.
- NOMURA, D. K. et al. Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6057, p. 809–813, 11 nov. 2011.

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 4, p. a000034, out. 2009.

ORNOY, A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? **Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 28, n. 1, p. 1–10, jul. 2009.

PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6853–6866, 22 nov. 1999.

PANDEY, R. et al. Endocannabinoids and immune regulation. **Pharmacological Research**, v. 60, n. 2, p. 85–92, ago. 2009.

PANIKASHVILI, D. et al. CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-kappa B inhibition. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 25, n. 4, p. 477–484, abr. 2005.

PARKER, G. B. Comorbidities in bipolar disorder: models and management. **The Medical Journal of Australia**, v. 193, n. S4, p. S18-20, 16 2010.

PEARLSON, G. D. et al. Clinical correlates of lateral ventricular enlargement in bipolar affective disorder. **The American Journal of Psychiatry**, v. 141, n. 2, p. 253–256, fev. 1984.

PERTWEE, R. G. **Endocannabinoids**. [s.l.] Springer, 2015.

PFAFFENSELLER, B. et al. EGR3 Immediate Early Gene and the Brain-Derived Neurotrophic Factor in Bipolar Disorder. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, p. 15, 2018.

PHILLIPS, M. L.; KUPFER, D. J. Bipolar disorder diagnosis: challenges and future directions. **Lancet (London, England)**, v. 381, n. 9878, p. 1663–1671, 11 maio 2013.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 873–884, nov. 2003.

POST, R. M. The New News about Lithium: An Underutilized Treatment in the United States. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 5, p. 1174–1179, 2018.

PRABHAVALKAR, K. S.; POOVANPALLIL, N. B.; BHATT, L. K. Management of bipolar depression with lamotrigine: an antiepileptic mood stabilizer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 242, 2015.

RAMEZANI, A.; NAHAD, M. P.; FAGHIHLOO, E. The role of Nrf2 transcription factor in viral infection. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 8, p. 6366–6382, 2018.

REEKIE, T. A.; SCOTT, M. P.; KASSIOU, M. The evolving science of phytocannabinoids. **Nature Reviews Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 20 dez. 2017.

ROBINS, L. N.; REGIER, D. A. **Psychiatric disorders in America: the epidemiologic catchment area study**. New York; Toronto; New York; Oxford: Free Press; Collier Macmillan Canada; Maxwell Macmillan International, 1991.

SAITO, V. M.; WOTJAK, C. T.; MOREIRA, F. A. Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. suppl 1, p. 57–514, maio 2010.

SAJATOVIC, M.; SUBRAMONIAM, M.; FULLER, M. A. Risperidone in the treatment of bipolar mania. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 2, n. 2, p. 127–138, jun. 2006.

SANCHO, R. et al. Anandamide inhibits nuclear factor-kappaB activation through a cannabinoid receptor-independent pathway. **Molecular Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 429–438, fev. 2003.

SARRAZIN, S. et al. Corpus callosum area in patients with bipolar disorder with and without psychotic features: an international multicentre study. **Journal of psychiatry & neuroscience: JPN**, v. 40, n. 5, p. 352–359, set. 2015.

SCHAFFER, A. et al. Community survey of bipolar disorder in Canada: lifetime prevalence and illness characteristics. **Canadian Journal of Psychiatry. Revue Canadienne De Psychiatrie**, v. 51, n. 1, p. 9–16, jan. 2006.

SEEDAT, S. et al. Cross-national associations between gender and mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. **Archives of General Psychiatry**, v. 66, n. 7, p. 785–795, jul. 2009.

SEVERUS, E.; BAUER, M.; GEDDES, J. Efficacy and Effectiveness of Lithium in the Long-Term Treatment of Bipolar Disorders: An Update 2018. **Pharmacopsychiatry**, v. 51, n. 5, p. 173–176, set. 2018.

SHAMSAEI, F. et al. Family Care giving in Bipolar disorder: Experiences of Stigma. **Iranian Journal of Psychiatry**, v. 8, n. 4, p. 188–194, out. 2013.

SHIM, I. H. et al. Mixed-state bipolar I and II depression: time to remission and clinical characteristics. **Journal of Affective Disorders**, v. 152–154, p. 340–346, jan. 2014.

SKAPER, S. D.; DI MARZO, V. Endocannabinoids in nervous system health and disease: the big picture in a nutshell. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 367, n. 1607, p. 3193–3200, 5 dez. 2012.

SOARES, J. C.; MANN, J. J. The anatomy of mood disorders--review of structural neuroimaging studies. **Biological Psychiatry**, v. 41, n. 1, p. 86–106, 1 jan. 1997.

STEFANO, G. B. et al. 2-arachidonyl-glycerol stimulates nitric oxide release from human immune and vascular tissues and invertebrate immunocytes by cannabinoid receptor 1. **Pharmacological Research**, v. 42, n. 4, p. 317–322, out. 2000.

STELLA, N. Endocannabinoid signaling in microglial cells. **Neuropharmacology**, v. 56 Suppl 1, p. 244–253, 2009.

STERTZ, L.; MAGALHÃES, P. V. S.; KAPCZINSKI, F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 26, n. 1, p. 19–26, jan. 2013.

SUGIURA, T. et al. Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 1, p. 605–612, 7 jan. 2000.

SWANN, A. C. et al. Severity of bipolar disorder is associated with impairment of response inhibition. **Journal of Affective Disorders**, v. 116, n. 1–2, p. 30–36, jul. 2009.

SWAYZE, V. W. et al. Structural brain abnormalities in bipolar affective disorder. Ventricular enlargement and focal signal hyperintensities. **Archives of General Psychiatry**, v. 47, n. 11, p. 1054–1059, nov. 1990.

TANG, V.; WANG, J.-F. Oxidative Stress in Bipolar Disorder. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 02, n. 02, 2013.

THASE, M. E. Quetiapine monotherapy for bipolar depression. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 4, n. 1, p. 11–21, fev. 2008.

TONDO, L.; VÁZQUEZ, G. H.; BALDESSARINI, R. J. Depression and Mania in Bipolar Disorder. **Current Neuropharmacology**, v. 15, n. 3, p. 353–358, 2017.

TONELLI, C.; CHIO, I. I. C.; TUVESON, D. A. Transcriptional Regulation by Nrf2. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 29, n. 17, p. 1727–1745, 10 2018.

TSUBOI, K. et al. Endocannabinoids and related N-acyl ethanolamines: biological activities and metabolism. **Inflammation and Regeneration**, v. 38, p. 28, 2018.

TULLY, A. et al. Interventions for the management of obesity in people with bipolar disorder. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2018, n. 4, 12 abr. 2018.

TURCOTTE, C. et al. The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 73, n. 23, p. 4449–4470, 2016.

VAN DEN AMEELE, S. et al. Markers of Inflammation and Monoamine Metabolism Indicate Accelerated Aging in Bipolar Disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 9, p. 250, 2018.

VANNACCI, A. et al. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol decreases the immunological activation of Guinea pig mast cells: involvement of nitric oxide and eicosanoids. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, n. 1, p. 256–264, out. 2004.

VELICHKOVA, M.; HASSON, T. Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 11, p. 4501–4513, jun. 2005.

VIETA, E. et al. Bipolar disorders. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 4, p. 18008, 08 2018.

WAGECK, A. R. et al. Cardiovascular risk and bipolar disorder: factors associated with a positive coronary calcium score in patients with bipolar disorder type 1. **Revista Brasileira De Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil: 1999)**, v. 40, n. 2, p. 163–168, jun. 2018.

WANG, X. et al. A Polymorphic Antioxidant Response Element Links NRF2/sMAF Binding to Enhanced MAPT Expression and Reduced Risk of Parkinsonian Disorders. **Cell Reports**, v. 15, n. 4, p. 830–842, 26 abr. 2016.

WARDYN, J. D.; PONSFORD, A. H.; SANDERSON, C. M. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- $\kappa$ B response pathways. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, n. 4, p. 621–626, ago. 2015.

WHITEFORD, H. A. et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 382, n. 9904, p. 1575–1586, 9 nov. 2013.

YOUNG, L. T. Is bipolar disorder a mitochondrial disease? **Journal of psychiatry & neuroscience: JPN**, v. 32, n. 3, p. 160–161, maio 2007.

ZIVANOVIC, O.; NEDIC, A. Kraepelin's concept of manic-depressive insanity: one hundred years later. **Journal of Affective Disorders**, v. 137, n. 1–3, p. 15–24, mar. 2012.

ZOJA, C.; BENIGNI, A.; REMUZZI, G. The Nrf2 pathway in the progression of renal disease. **Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 29 Suppl 1, p. i19–i24, fev. 2014.

## ANEXO A – CARTAS DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES

Nº do projeto CAAE: 63811317.3.0000.5327

Título do Projeto: Ensaio clínico duplo-cego, randomizado e controlado por placebo para avaliar a eficácia do canabidiol como tratamento adjuvante para depressão bipolar.

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é conhecer a eficácia da medicação canabidiol para o tratamento dos episódios de depressão dos pacientes com transtorno bipolar. Também temos como objetivo testar a tolerância dos pacientes a esta medicação e a avaliar seu impacto no tratamento. Esta medicação é derivada da planta *Cannabis sativa* e já está liberada para o tratamento de epilepsia no Brasil. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Psiquiatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pelo Programa de Pós-graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes:

Será realizado um sorteio para definir a sua participação em um dos grupos do estudo (esse processo chama-se randomização).

Em um dos grupos os participantes receberão cápsulas com a medicação canabidiol e no outro grupo os participantes receberão cápsulas sem a medicação canabidiol este grupo é chamado de grupo placebo).

Você receberá a medicação da pesquisa (canabidiol ou placebo) e deverá tomar duas cápsulas diárias, além de seus medicamentos de uso contínuo conforme indicação de seu médico psiquiatra.

Como é um sorteio, você não poderá escolher o grupo. Você e o pesquisador que realizar as avaliações não saberão em que grupo você foi incluído (esse processo chama-se “cegamento”). Apenas o farmacêutico saberá em que grupo cada participante entrou.

Você também deverá participar de cinco encontros que serão realizados no Centro de Pesquisa Clínica do HCPA:

1º Encontro: Será realizada uma entrevista pelo pesquisador na qual você responderá perguntas sobre informações pessoais de endereço, aproveitamento escolar, renda da sua família e sobre seu trabalho. Além disso, serão realizadas perguntas sobre seu histórico de saúde e saúde atual em relação ao transtorno bipolar e qualidade de vida. Serão realizados ao todo nove questionários para avaliação dessas informações com duração de aproximadamente duas horas. Serão realizadas também medidas de seu peso, sua altura e sua pressão-arterial. Após estes testes e medidas será coletada uma amostra de 10 mL de sangue (equivalente a uma colher de sopa) para avaliação de algumas informações em relação ao seu tratamento atual e posterior comparação com resposta ao tratamento com canabidiol desta pesquisa.

2º Encontro (duas semanas após o primeiro encontro): você retornará para avaliação da sua tolerância à medicação e a resposta ao tratamento através da resposta aos mesmos nove questionários. Esse encontro levará em torno de 40 minutos.

3º Encontro (duas semanas após o segundo encontro): você retornará ao centro de pesquisas para novamente ser avaliado como está o seu tratamento do estudo e se há algum efeito colateral da medicação. Você responderá aos mesmos nove questionários. Este encontro terá duração de aproximadamente 40 minutos. Neste mesmo dia também será coletada uma amostra de 10 mL sangue (equivalente a uma colher de sopa) para verificação da sua resposta ao medicamento e serão realizadas também medidas de seu peso, sua altura e sua pressão-arterial.

4º Encontro (quatro semanas após o terceiro encontro): será realizada uma avaliação igual à realizada no 3º encontro. Você retornará para avaliação da sua tolerância à medicação e a resposta ao tratamento através da resposta aos mesmos nove questionários dos encontros anteriores. Esse encontro levará em torno de 40 minutos e novamente serão coletados 10mL (equivalente a uma colher de sopa) de sangue para realização de exames para avaliar sua resposta ao tratamento e serão realizadas também medidas de seu peso, sua altura e sua pressão-arterial.

5º Encontro (quatro semanas após o quarto encontro): será realizada uma avaliação igual à do 4º encontro. Você retornará ao ambulatório para novamente avaliar como está o seu tratamento e se há algum efeito colateral da medicação. Você responderá aos mesmos nove questionários das demais visitas. Este encontro terá duração de aproximadamente 40 minutos. Neste mesmo dia também será coletada uma amostra de 10 mL sangue (equivalente a uma colher de sopa) para verificação da sua resposta ao medicamento e serão realizadas também medidas de seu peso, sua altura e sua pressão-arterial.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para consentir com o uso do material.

- Aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.  
 Não aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Os possíveis desconfortos decorrentes da participação na pesquisa estão relacionados às perguntas dos questionários, tempo de duração das visitas, e possível dor ou mancha roxa no local da coleta de sangue. O canabidiol é considerado uma medicação segura, bem tolerada e com poucos efeitos colaterais, mesmo em doses mais altas do que as que serão usadas nesse estudo. Alguns dos efeitos colaterais já descritos são sensação de boca seca, sonolência, fadiga e aumento do apetite.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são os efeitos esperados pelo tratamento com canabidiol para o transtorno bipolar, como melhora do humor e da ansiedade. Além disso, através dos questionários e exames de laboratório, pode-se identificar algum problema de saúde não antes conhecido. Nestes casos, você será encaminhado para o tratamento adequado. Esta pesquisa também poderá ajudar a desenvolver maior conhecimento sobre o transtorno bipolar e de seu tratamento.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.



Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Kauer Sant'Anna, pelo telefone (51) 3359.8845, com o pesquisador Jairo Vinícius Pinto, pelo telefone (51) 3359.8845 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

---

Nome do participante da pesquisa

---

Assinatura

---

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

---

Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CONTROLES

Gostaríamos de convidá-lo a participar do estudo: “**Avaliação dos mecanismos de ruminação nos Transtornos Mentais: abordagem RDoC (Research Domain Criteria)**”. Em caso de qualquer dúvida quanto ao estudo você poderá contatar o pesquisador executor Érico de Moura Silveira Júnior ou a pesquisadora supervisora Marcia Sant’Anna pelo telefone (51) 3359-8845 (Laboratório de Psiquiatria Molecular – HCPA) ou o Comitê de Ética pelo telefone (51) 3359-8304, das 8h às 17h.

### O que é o grupo controle, nesse estudo?

É um grupo de pessoas sem doença psiquiátrica e que se disponibiliza a contribuir fornecendo seus dados que serão usados como referência padrão no estudo.

### Qual o objetivo desta pesquisa?

Esse estudo tem por objetivo entender melhor como funciona a relação entre a ruminação (pensamentos repetitivos) e as doenças psiquiátricas. Ou seja, conhecer melhor como a ruminação altera a capacidade de concentração, atenção, memória e execução de tarefas.

### Justificativa para fazer a pesquisa

Um maior conhecimento sobre os mecanismos bioquímicos, genéticos, neurológicos e psicológicos envolvidos na ruminação (pensamentos repetitivos que duram muito tempo) poderá contribuir para o tratamento deste sintoma, a fim de reduzir o risco de desenvolvimento de episódios psicóticos, depressivos e maníacos e a consequente piora da capacidade em realizar tarefas de lazer e trabalho e isolamento social. Assim, o tratamento da ruminação poderá vir a ser considerado uma ferramenta que melhora a capacidade do indivíduo em encontrar alternativas para realizar seus projetos de vida.

### O que acontecerá neste estudo?

Depois que você responder às questões em estudo através de questionários, será feito um exame de sangue, um eletroencefalograma com a aplicação de tarefas que avaliam a sua atenção e uma Ressonância Magnética Cerebral. O exame de sangue será utilizado para observar se há alterações de substâncias encontradas no seu sangue e pesquisar possíveis alterações genéticas. O eletroencefalograma avaliará a relação entre a ruminação e as áreas cerebrais envolvidas. E a Ressonância Magnética Cerebral avaliará a anatomia do seu cérebro.

### Quais os benefícios em participar deste estudo?

A sua participação neste estudo poderá, no âmbito pessoal, permitir identificar se você apresenta estes pensamentos repetitivos e duradouros (ruminação) que o levam a perder tempo e o impedem de realizar alguma tarefa importante. Caso a ruminação seja identificada, você será contatado e informado a respeito e lhe informaremos como encontrar um estabelecimento de saúde para que possa lhe ajudar a tratar este sintoma. E no âmbito coletivo, pretendemos ajudar

você a desenvolver maior conhecimento sobre o como são definidos os diagnósticos em psiquiatria e o tratamento destas doenças.

Quais são os direitos dos participantes?

Os pesquisadores desse estudo talvez precisem examinar os seus registros, a fim de verificar informações. No entanto, os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados desse estudo poderão ser enviados para publicação em um jornal científico, mas você não será identificado pelo nome. Sua participação no estudo é voluntária, de forma que caso você decida, em qualquer momento do estudo, não participar, isto não afetará o tratamento normal a que você tem direito. Os procedimentos da pesquisa não serão cobrados de você, e você ainda receberá a segunda via desse Termo para arquivo em documentos pessoais.

Quais são os riscos que envolvem este estudo?

Este estudo possui riscos mínimos que são inerentes do procedimento de punção venosa, como mal-estar passageiro e/ou manchas roxas no local. Além disso, você poderá sentir-se desconfortável ao responder o questionário proposto, pois no mesmo constam perguntas relativas à sua vida pessoal.

Quais são as responsabilidades dos participantes?

Os participantes desse estudo comprometem-se a responder os questionários sem omitir informações.

Declaro que:

1. Concordo voluntariamente em fazer parte desse estudo. Estou ciente de que tenho total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento. Concordo em liberar as informações dos meus registros médicos sob o entendimento de que ela será tratada confidencialmente.

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura do Participante

Data: (   /   /   )

Nome do responsável legal (se aplicado): \_\_\_\_\_

Assinatura do Responsável

Data: (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

Assinatura do pesquisador

Data: (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

## ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA *FRONTIERS IN PSYCHIATRY*

### Author Guidelines

- 1. Summary Table
- 2. Manuscript Guidelines
  - 2.1. Open access and copyright
  - 2.2. Registration with Frontiers
  - 2.3. Manuscript Requirements and Style Guide
    - 2.3.1. General standards
    - 2.3.2. References
    - 2.3.3. Disclaimer
    - 2.3.4. Supplementary Material
    - 2.3.5. File Requirements
    - 2.4. Figure and Table Guidelines
      - 2.4.1. CC-BY Licence
      - 2.4.2. General Style Guidelines for Figures
      - 2.4.3. General Style Guidelines for Tables
      - 2.4.4. Figure and Table Requirements
      - 2.4.5. Format
    - 2.5. Funding disclosure
    - 2.6. Materials and Data Policies

- 2.6.1. Availability of Materials
- 2.6.2. Availability of Data
- 2.6.3. Data Citation Guidelines
- 2.6.4. Data Availability Statements
- 2.6.5. Recommended and Required Repositories
- 2.6.6. Inclusion of Zoological Nomenclature
- 2.6.7. Inclusion of RNAseq Data
- 2.6.8. Inclusion of Proteomics Data
- 2.7. Statistics
- 3. Editorial Policies and Publication Ethics
  - 3.1. Authorship and Author Responsibilities
  - 3.2. Research Integrity
  - 3.3. Translations
  - 3.4. Plagiarism and Duplication
  - 3.5. Image Manipulation
  - 3.6. Conflicts of Interest
  - 3.7. Bioethics
    - 3.7.1. Studies involving animal subjects
    - 3.7.2. Studies involving human subjects
    - 3.7.3. Inclusion of identifiable human data
    - 3.7.4. Clinical Trials
  - 3.8. Corrections
  - 3.9. Retractions
  - 3.10. Support and Ethical concerns

## 1. Summary Table

Please view the table below for a summary on currently accepted article types and general manuscript style guidelines. Article types may vary depending on journal.

	<b>Abstract (max. length)</b>	<b>Running title (5 words)</b>	<b>Figures and/or tables (combined)</b>	<b>Manuscript (max. length)</b>	<b>Peer review</b>	<b>Author fees</b>	<b>Submitted to PubMed Central or other indexing databases</b>
Original Research	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓
Review	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓
Book Review	✗	✗	1	1'000 words	✓	✗	✓

Brief Research Report	250 words	✓	4	4'000 words	✓	✓	✓
Case Report	350 words	✓	4	3'000 words	✓	✓	✓
Clinical Trial	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓
Community Case Study	350 words	✓	5	5'000 words	✓	✓	✓
Conceptual Analysis	350 words	✓	10	8'000 words	✓	✓	✓
Curriculum, Instruction, and	350 words	✓	5	5'000 words	✓	✓	✓

Pedagogy							
Data Report	✘	✔	2	3'000 words	✔	✔	✔
Editorial	✘	✘	0	1'000 words*	✔	✘	✔
Field Grand Challenge	✘	✔	1	2'000 words	✔	✘	✔
General Commentary	✘	✘	1	1'000 words	✔	✔	✔
Hypothesis and Theory	350 words	✔	15	12'000 words	✔	✔	✔



Methods	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓
Mini Review	250 words	✓	2	3'000 words	✓	✓	✓
Opinion	✗	✓	1	2'000 words	✓	✓	✓
Policy & Practice Review	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓
Policy Brief	125 words	✓	5	3'000 words	✓	✓	✓
Perspective	250 words	✓	2	3'000 words	✓	✓	✓

Registered Report	350 words	✓	15	12,000 words	✓	✓	✓
Specialty Grand Challenge	✗	✓	1	2'000 words	✓	✗	✓
Systematic Reviews	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓
Study Protocol	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓
Technology and Code	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓

\* Editorials for Research Topics with 5 to 10 published articles have a maximum of 1'000 words, for Research Topics with more than 10 published articles the following applies: 1'100 words for 11 articles, 1'200 for 12 articles, 1'300 for 13 articles etc. up to maximum 5'000 words, for 50 or more papers.

Appendices and footnotes will be considered in the total length and word count of the article.

## **2. Manuscript Guidelines**

### **2.1. Open access and copyright**

All Frontiers articles from July 2012 onwards are published with open access under the CC-BY Creative Commons attribution license (the current version is CC-BY, version 4.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). This means that the author(s) retain copyright, but the content is free to download, distribute and adapt for commercial or non-commercial purposes, given appropriate attribution to the original article.

Upon submission, author(s) grant Frontiers an exclusive license to publish, including to display, store, copy and reuse the content. The CC-BY Creative Commons attribution license enables anyone to use the publication freely, given appropriate attribution to the author(s) and citing Frontiers as the original publisher. The CC-BY Creative Commons attribution license does not apply to third-party materials that display a copyright notice to prohibit copying. Unless the third-party content is also subject to a CC-BY Creative Commons attribution license, or an equally permissive license, the author(s) must comply with any third-party copyright notices.

### **Preprint Policy**

Frontiers' supportive preprint policy encourages full open access at all stages of a research paper, to share and generate the knowledge researchers need to support their work. Authors publishing in Frontiers journals may share their work ahead of submission to a peer-reviewed journal, as well as during the Frontiers review process, on repositories or pre-print servers (such as ArXiv, PeerJ Preprints, OSF and others), provided that the server imposes no restrictions upon the author's full copyright and re-use rights. Also note that any manuscript files shared after submission to Frontiers journals, during the review process, must not contain the Frontiers logo or branding.

Correct attribution of the original source in repositories or pre-print servers must be included on submission, or added at re-submission if the deposition is done during the review process.

If the article is published, authors are then strongly encouraged to link from the preprint server to the Frontiers publication to enable readers to find, access and cite the final peer-reviewed version. Please note that we cannot consider for publication content that has been previously published, or is already under review, within a scientific journal, book or similar entity.

## 2.2. Registration with Frontiers

Please note that the corresponding and all submitting authors **MUST** register with Frontiers before submitting an article. You must be logged in to your personal Frontiers Account to submit an article.

For any co-author who would like his/her name on the article abstract page and PDF to be linked to a Frontiers profile on the Loop network, please ensure to register before the final publication of the paper.

## 2.3. Manuscript Requirements and Style Guide

### 2.3.1. General standards

#### CrossMark Policy

CrossMark is a multi-publisher initiative to provide a standard way for readers to locate the current version of a piece of content. By applying the CrossMark logo Frontiers is committing to maintaining the content it publishes and to alerting readers to changes if and when they occur. Clicking on the CrossMark logo will tell you the current status of a document and may also give you additional publication record information about the document.

#### Word Files

If working with Word please use Frontiers Word templates.

#### LaTeX Files

If you wish to submit your article as LaTeX, we recommend our Frontiers LaTeX templates. These templates are meant as a guide, you are of course welcome to use any style or formatting and Frontiers journal style will be applied during typesetting.

## Experiments

Authors are required to specifically state in their legends how many times experiments were performed (in general we require  $n=3$  as a minimum) and what specific statistical analysis was performed.

### 2.3.1.1. Article Type

Frontiers requires authors to carefully select the appropriate article type for their manuscript, and to comply with the article-type descriptions defined in the journal's "Article Types", which can be seen from the "For Authors" menu on any Frontiers journal page. Please note that not all articles types are available for all journals/specialties. Please contact us if you have any questions. **Please pay close attention to the word count limits.**

### 2.3.1.2. Manuscript Length

Frontiers encourages its authors to closely follow the article word count lengths given in the Summary Table. The manuscript length includes only the main body of the text, footnotes and all citations within it, and excludes abstract, section titles, figure and table captions, funding statements, acknowledgments and references in the bibliography. Please indicate the number of words and the number of figures included in your manuscript on the first page.

### 2.3.1.3. Language Editing

Frontiers requires manuscripts submitted to meet international standards for English language to be considered for publication.

For authors who would like their manuscript to receive language editing or proofing to improve the clarity of the manuscript and help highlight their research, Frontiers recommends the language-editing services provided by the following external partners:

## **Editage**

Frontiers is pleased to recommend language-editing service provided by our external partner Editage to authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing. These services may be particularly useful for researchers for whom English is not the primary language. They can help to improve the grammar, syntax and flow of your manuscripts prior to submission. Frontiers authors will receive a 10% discount by visiting the following link: <http://editage.com/frontiers/>

### **The Charlesworth Group**

Frontiers recommends the Charlesworth Group Author Services, who has a long standing track record in language editing and proofing. This is a third-party service for which Frontiers authors will receive a discount by visiting the following link: <http://www.charlesworthauthorservices.com/~Frontiers>.

Note that sending your manuscript for language editing does not imply or guarantee that it will be accepted for publication by a Frontiers journal. Editorial decisions on the scientific content of a manuscript are independent of whether it has received language editing or proofing by the partner services, or other services.

#### 2.3.1.4. Language Style

The default language style at Frontiers is American English. If you prefer your article to be formatted in British English, please specify this on your manuscript first page. For any questions regarding style Frontiers recommends authors to consult the Chicago Manual of Style.

#### 2.3.1.5. Search Engine Optimization (SEO)

There are a few simple ways to maximize your article's discoverability. Follow the steps below to improve search results of your article:

- Include a few of your article's keywords in the title of the article;
- Do not use long article titles;
- Pick 5 to 8 keywords using a mix of generic and more specific terms on the article subject(s);
- Use the maximum amount of keywords in the first 2 sentences of the abstract;

- Use some of the keywords in level 1 headings.

#### 2.3.1.6. Title

The title is written in title case, centred, and in 16 point bold Times New Roman font at the top of page.

The title should be concise, omitting terms that are implicit and, where possible, be a statement of the main result or conclusion presented in the manuscript. Abbreviations should be avoided within the title.

Witty or creative titles are welcome, but only if relevant and within measure. Consider if a title meant to be thought-provoking might be misinterpreted as offensive or alarming. In extreme cases, the editorial office may veto a title and propose an alternative.

Authors should try to avoid, if possible:

- Titles that are a mere question without giving the answer.
- Unambitious titles, for example starting with "Towards", "A description of", "A characterization of", "Preliminary study on".
- Vague titles, for example starting with "Role of...", "Link between...", "Effect of..." that do not specify the role, link, or effect.
- Include terms that are out of place, for example the taxonomic affiliation apart from species name.

**For Corrigenda, Book Reviews, General Commentaries and Editorials, the title of your manuscript should have the following format:**

- "Corrigendum: Title of original article"
- "Book Review: Title of book"
- General Commentaries
  - "Commentary: Title of original article" (This does not apply to Frontiers Commentaries)

- "Response: Commentary: Title of original article"
- "Editorial: Title of Research Topic"

For article types requiring it, the running title should be a maximum of 5 words in length. (see Summary Table)

#### 2.3.1.7. Authors and Affiliations

All names are listed together and separated by commas. Provide exact and correct author names as these will be indexed in official archives. Affiliations should be keyed to the author's name with superscript numbers and be listed as follows: Laboratory, Institute, Department, Organization, City, State abbreviation (USA, Canada, Australia), and Country (without detailed address information such as city zip codes or street names).

Example: Max Maximus, Department of Excellence, International University of Science, New York, NY, USA.

The Corresponding Author(s) should be marked with an asterisk. Provide the exact contact email address of the corresponding author(s) in a separate section.

Correspondence:

Dr. Max Maximus  
maximus@gmail.com

If any authors wish to include a change of address, list the present address(es) below the correspondence details using a unique superscript symbol keyed to the author(s) in the author list.

#### 2.3.1.8. Consortium/Group and Collaborative Authors



Consortium/group authorship should be listed in the manuscript with the other author(s). In cases where authorship is retained by the consortium/group, the consortium/group should be listed as an author separated by “;” or “and”. Consortium/group members can be listed in a separate section at the end of the manuscript.

Example: John Smith, Barbara Smith and The Collaborative Working Group.

In cases where work is presented by the author(s) on behalf of a consortium/group, it should be included in the manuscript author list separated with the wording “for” or “on behalf of”. The consortium/group will not retain authorship.

Example: John Smith and Barbara Smith on behalf of The Collaborative Working Group.

#### 2.3.1.9. Headings and Sub-headings

Except for special names (e.g. GABAergic), capitalize only the first letter of headings and subheadings. Headings and subheadings need to be defined in Times New Roman, 12, bold. You may insert up to 5 heading levels into your manuscript (not more than for example: 3.2.2.1.2 **Heading title**).

#### 2.3.1.10. Abstract

As a primary goal, the abstract should render the general significance and conceptual advance of the work clearly accessible to a broad readership. In the abstract, minimize the use of abbreviations and do not cite references. The text of the abstract section should be in 12 point normal Times New Roman. See Summary Table for abstract requirement and length according to article type.

For Clinical Trial article types, please include the Unique Identifier and the URL of the publicly accessible website on which the trial is registered.

#### 2.3.1.11. Keywords

All article types: you may provide up to 8 keywords; at least 5 are mandatory.

### 2.3.1.12. Text

The entire document should be single-spaced and must contain page and line numbers in order to facilitate the review process. Your manuscript should be written using either LaTeX or MS-Word.

Templates are available (see above)

### 2.3.1.13. Nomenclature

- The use of abbreviations should be kept to a minimum. Non-standard abbreviations should be avoided unless they appear at least four times, and defined upon first use in the main text. Consider also giving a list of non-standard abbreviations at the end, immediately before the Acknowledgments.
- Equations should be inserted in editable format from the equation editor.
- Italicize Gene symbols and use the approved gene nomenclature where it is available. For human genes, please refer to the HUGO Gene Nomenclature Committee ([HGNC](#)). New gene symbols should be submitted [here](#). Common Alternative gene aliases may also be reported, but should not be used alone in place of the HGNC symbol. Nomenclature committees for other species are listed [here](#). Protein products are not italicized.
- We encourage the use of Standard International Units in all manuscripts.
- Chemical compounds and biomolecules should be referred to using systematic nomenclature, preferably using the recommendations by IUPAC.
- Astronomical objects should be referred to using the nomenclature given by the International Astronomical Union provided [here](#).
- Life Science Identifiers (LSIDs) for ZOOBANK registered names or nomenclatural acts should be listed in the manuscript before the keywords. An LSID is represented as a uniform resource name (URN) with the following format:  
urn:lsid::[:]

For more information on LSIDs please see [Inclusion of Zoological Nomenclature](#) section.

#### 2.3.1.14. Sections

Your manuscript is organized by headings and subheadings. The section headings should be those appropriate for your field and the research itself. For Original Research Articles, it is recommended to organize your manuscript in the following sections or their equivalents for your field:

##### Introduction

Succinct, with no subheadings.

##### Materials and Methods

This section may be divided by subheadings. This section should contain sufficient detail so that when read in conjunction with cited references, all procedures can be repeated. For experiments reporting results on animal or human subject research, an ethics approval statement should be included in this section (for further information, see [section Materials and Data Policies](#))

##### Results

This section may be divided by subheadings. Footnotes should not be used and have to be transferred into the main text.

##### Discussion

This section may be divided by subheadings. Discussions should cover the key findings of the study: discuss any prior art related to the subject so to place the novelty of the discovery in the appropriate context; discuss the potential short-comings and limitations on their interpretations; discuss their integration into the current understanding of the problem and how this advances the current views; speculate on the future direction of the research and freely postulate theories that could be tested in the future.

For further information, please see Additional Requirements for specific article types including General Commentaries, Case Reports and Data Reports amongst others or you can check the descriptions defined in the journal's "Article Types", which can be seen from the "For Authors" menu on any Frontiers journal page.

#### 2.3.1.15. Acknowledgments

This is a short text to acknowledge the contributions of specific colleagues, institutions, or agencies that aided the efforts of the authors.

#### 2.3.1.16. Author Contributions Statement

The Author Contributions Statement is mandatory and should represent all the authors. It can be up to several sentences long and should briefly describe the tasks of individual authors. Please list only 2 initials for each author, without full stops, but separated by commas (e.g. JC, JS). In the case of two authors with the same initials, please use their middle initial to differentiate between them (e.g. REW, RSW). The Author Contributions Statement should be included at the end of the manuscript before the References.

#### 2.3.1.17. Conflict of Interest Statement

A Conflict of Interest Statement needs to be included at the end of the manuscript before the references. Here, the authors need to declare whether or not the submitted work was carried out in the presence of any personal, professional or financial relationships that could potentially be construed as a conflict of interest. For more information on conflicts of interest, see our Editorial Policies.

#### 2.3.1.18. Contribution to the Field Statement

When you submit your manuscript, you will be required to briefly summarize in 200 words your manuscript's contribution to, and position in, the existing literature of your field. This should be written avoiding any technical language or non-standard acronyms. The aim should be to convey the meaning and importance of this research to a non-expert. While Frontiers evaluates articles using objective criteria, rather than impact or novelty, your statement should frame the question(s) you have addressed in your work in the context of the current body of knowledge, providing evidence that the findings - whether positive or negative - contribute to progress in your research discipline. This will assist the Chief Editors to determine whether your manuscript fits within the scope of a specialty as defined in its mission statement; a detailed statement will also facilitate the identification of the Editors and Reviewers most appropriate to evaluate your work, ultimately expediting your manuscript's initial consideration.

Example Statement on: Markram K and Markram H (2010) The Intense World Theory – a unifying theory of the neurobiology of autism. *Front. Hum. Neurosci.* 4:224. doi: 10.3389/fnhum.2010.00224

*Autism spectrum disorders are a group of neurodevelopmental disorders that affect up to 1 in 100 individuals. People with autism display an array of symptoms encompassing emotional processing, sociability, perception and memory, and present as uniquely as the individual. No theory has suggested a single underlying neuropathology to account for these diverse symptoms. The Intense World Theory, proposed here, describes a unifying pathology producing the wide spectrum of manifestations observed in autists. This theory focuses on the neocortex, fundamental for higher cognitive functions, and the limbic system, key for processing emotions and social signals. Drawing on discoveries in animal models and neuroimaging studies in individuals with autism, we propose how a combination of genetics, toxin exposure and/or environmental stress could produce hyper-reactivity and hyper-plasticity in the microcircuits involved with perception, attention, memory and emotionality. These hyper-functioning circuits will eventually come to dominate their neighbors, leading to hyper-sensitivity to incoming stimuli, over-specialization in tasks and a hyper-preference syndrome. We make the case that this theory of enhanced brain function in autism explains many of the varied past results and resolves conflicting findings and views and makes some testable experimental predictions.*

### 2.3.2. References

All citations in the text, figures or tables must be in the reference list and vice-versa. The references should only include articles that are published or accepted. Data sets that have been deposited to an online repository should be included in the reference list, include the version and unique identifier when available. For accepted but unpublished works use "in press" instead of page numbers. Unpublished data, submitted manuscripts, or personal communications should be cited within the text only, for the article types that allow such inclusions. Personal communications should be documented by a letter of permission. Website urls should be included as footnotes. Any inclusion of verbatim text must be contained in quotation marks and clearly reference the original source. Preprints can be cited as long as a DOI or archive URL is available, and the citation clearly mentions that the contribution is a preprint. If a peer-reviewed journal publication for the same preprint exists, the official journal publication is the preferred source.

The following formatting styles are meant as a guide, as long as the full citation is complete and clear, Frontiers referencing style will be applied during typesetting.

- **SCIENCE, ENGINEERING, and HUMANITIES: For articles submitted in the domains of SCIENCE, ENGINEERING and HUMANITIES please apply Author-Year system for in-text citations.**

Reference list: provide the names of the first six authors followed by et al. and doi when available.

In-text citations should be called according to the surname of the first author, followed by the year. For works by 2 authors include both surnames, followed by the year. For works by more than 2 authors include only the surname of the first author, followed by et al., followed by the year. For Humanities and Social Sciences articles please include page numbers in the in-text citations.

Article in a print journal:

Sondheimer, N., and Lindquist, S. (2000). Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol. Cell.* 5, 163-172.

Article in an online journal:

Tahimic, C.G.T., Wang, Y., Bikle, D.D. (2013). Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front. Endocrinol.* 4:6. doi: 10.3389/fendo.2013.00006

Article or chapter in a book:

Sorenson, P. W., and Caprio, J. C. (1998). "Chemoreception," in *The Physiology of Fishes*, ed. D. H. Evans (Boca Raton, FL: CRC Press), 375-405.

Book:

Cowan, W. M., Jessell, T. M., and Zipursky, S. L. (1997). *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York: Oxford University Press.

Abstract:

Hendricks, J., Applebaum, R., and Kunkel, S. (2010). A world apart? Bridging the gap between theory and applied social gerontology. *Gerontologist* 50, 284-293. Abstract retrieved from Abstracts in Social Gerontology database. (Accession No. 50360869)

Patent:

Marshall, S. P. (2000). Method and apparatus for eye tracking and monitoring pupil dilation to evaluate cognitive activity. U.S. Patent No 6,090,051. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Data:

Perdiguero P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. Data from: Massive sequencing of Ulms minor's transcriptome provides new molecular tools for a genus under the constant threat of Dutch elm disease. Dryad Digital Repository. (2015)  
<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837>

Theses and Dissertations:

Smith, J. (2008) Post-structuralist discourse relative to phenomological pursuits in the deconstructivist arena. [dissertation/master's thesis]. [Chicago (IL)]: University of Chicago

Preprint:

Smith, J. (2008). Title of the document. Preprint repository name [Preprint]. Available at: <https://persistent-url> (Accessed March 15, 2018).

For examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer to the [Chicago Manual of Style](#).

[Frontiers Science Endnote Style](#)

[Frontiers Science, Engineering and Humanities Bibstyle](#)

- **HEALTH, PHYSICS AND MATHEMATICS: For articles submitted in the domain of HEALTH or the journal Frontiers in Physics and Frontiers in Applied Mathematics and Statistics please apply the Vancouver system for in-text citations.**

Reference list: provide the names of the first six authors followed by et al. and doi when available.

In-text citations should be numbered consecutively in order of appearance in the text – identified by Arabic numerals in the parenthesis for Health articles, and in square brackets for Physics and Mathematics articles.

Reference examples

Article in a print journal:

Sondheimer N, Lindquist S. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol Cell* (2000) 5:163-72.

Article in an online journal:

Tahimic CGT, Wang Y, Bikle DD. Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front Endocrinol* (2013) 4:6. doi: 10.3389/fendo.2013.00006

Article or chapter in a book:

Sorenson PW, Caprio JC. "Chemoreception,". In: Evans DH, editor. *The Physiology of Fishes*. Boca Raton, FL: CRC Press (1998). p. 375-405.

Book:

Cowan WM, Jessell TM, Zipursky SL. *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York: Oxford University Press (1997). 345 p.

Abstract:



Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, editor. Genetic Programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3–5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer (2002). p. 182–91.

Patent:

Pagedas AC, inventor; Ancel Surgical R&D Inc., assignee. Flexible Endoscopic Grasping and Cutting Device and Positioning Tool Assembly. United States patent US 20020103498 (2002).

Data:

Perdiguero P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. Data from: Massive sequencing of Ulms minor's transcriptome provides new molecular tools for a genus under the constant threat of Dutch elm disease. Dryad Digital Repository. (2015) <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837>

Theses and Dissertations:

Smith, J. (2008) Post-structuralist discourse relative to phenomological pursuits in the deconstructivist arena. [dissertation/master's thesis]. [Chicago (IL)]: University of Chicago

Preprint:

Smith, J. Title of the document. Preprint repository name [Preprint] (2008). Available at: <https://persistent-url> (Accessed March 15, 2018).

For examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer to [Citing Medicine](#).

[Frontiers Health Endnote Style](#)

[Frontiers Health and Physics Bibstyle](#)

### 2.3.3. Disclaimer

Any necessary disclaimers which must be included in the published article should be clearly indicated in the manuscript.

### 2.3.4. Supplementary Material

Frontiers journals do not support pushing important results and information into supplementary sections. However, data that are not of primary importance to the text, or which cannot be included in the article because it is too large or the current format does not permit it (such as movies, raw data traces, power point presentations, etc.) can be uploaded during the submission procedure and will be displayed along with the published article. All supplementary files are deposited to FigShare for permanent storage, during the publication stage of the article, and receive a DOI.

The Supplementary Material can be uploaded as Data Sheet (word, excel, csv, cdx, fasta, pdf or zip files), Presentation (power point, pdf or zip files), Supplementary Image (cdx, eps, jpeg, pdf, png or tif), Supplementary Table (word, excel, csv or pdf), Audio (mp3, wav or wma) or Video (avi, divx, flv, mov, mp4, mpeg, mpg or wmv).

Supplementary material is not typeset so please ensure that all information is clearly presented, the appropriate caption is included in the file and not in the manuscript, and that the style conforms to the rest of the article. To avoid discrepancies between the published article and the supplementary material, please do not add the title, author list, affiliations or correspondence in the supplementary files. For Supplementary Material templates (LaTeX and Word) see [Supplementary Material for Frontiers](#).

### **Suggested Fonts**

The title is written in title case, centred, and in 16 point bold Times New Roman font at the top of page.

Headings and subheadings need to be defined in Times New Roman, 12, bold.

The text of the abstract section should be in 12 point normal Times New Roman.

The body text is in 12 point normal Times New Roman.

### 2.3.5. File Requirements

For Latex Files, when submitting your article please ensure to upload all relevant manuscript files including:

- tex file
- PDF
- .bib file (if the bibliography is not already included in the .tex file)

Figures should be included in the provided pdf. In case of acceptance, our Production Office might require high resolution files of the figures included in the manuscript in eps, jpg or tif format. In order to be able to upload more than one figure at a time, save the figures (labeled in order of appearance in the manuscript) in a zip file, and upload them as ‘Supplementary Material Presentation’.

To facilitate the review process, please include a Word Count at the beginning of your manuscript, one option is teXcount which also has an online interface.

During the Interactive Review, authors are encouraged to upload versions using ‘Track Changes’. Editors and Reviewers can only download the PDF file of the submitted manuscript .

## 2.4. Figure and Table Guidelines

### 2.4.1. CC-BY Licence

All figures, tables, and images will be published under a Creative Commons CC-BY licence and permission must be obtained for use of copyrighted material from other sources (including re-published/adapted/modified/partial figures and images from the internet). It is the responsibility of the authors to acquire the licenses, to follow any citation instructions requested by third-party rights holders, and cover any supplementary charges.

#### 2.4.2. General Style Guidelines for Figures

The maximum number of figures and tables for all article types are shown in the [Summary Table](#). Frontiers requires figures to be submitted individually, in the same order as they are referred to in the manuscript, the figures will then be automatically embedded at the end of the submitted manuscript. Kindly ensure that each table and figure is mentioned in the text and in numerical order.

For graphs, there must be a self-explanatory label (including units) along each axis. For figures with more than one panel, panels should be clearly indicated using labels (A), (B), (C), (D), etc. However, do not embed the part labels over any part of the image, these labels will be added during typesetting according to Frontiers journal style. Please note that figures which are not according to the guidelines will cause substantial delay during the production process.

Permissions may be necessary in the following scenarios:

- Republishing
- Modifying/adapting
- Partial Figures

It is the responsibility of the authors to acquire the licenses, to follow any citation instructions requested by third-party rights holders, and cover any supplementary charges.

#### 2.4.3. General Style Guidelines for Tables

Tables should be inserted at the end of the manuscript. If you use a word processor, build your table in word. If you use a LaTeX processor, build your table in LaTeX. An empty line should be left before and after the table.

Please note that large tables covering several pages cannot be included in the final PDF for formatting reasons. These tables will be published as supplementary material on the online article abstract page at the time of acceptance. The author will be notified during the typesetting of the final article if this is the case. A link in the final PDF will direct to the online material.

For additional information, please see our Editorial Policies: 3.5 Image Manipulation.

#### 2.4.4. Figure and Table Requirements

##### Legends

Legends should be preceded by the appropriate label, for example "Figure 1" or "Table 4". Figure legends should be placed at the end of the manuscript (for supplementary images you must include the caption with the figure, uploaded as a separate file). Table legends must be placed immediately before the table. Please use only a single paragraph for the legend. Figure panels are referred to by bold capital letters in brackets: (A), (B), (C), (D), etc.

##### Image Size

Figure images should be prepared with the PDF layout in mind, individual figures should not be longer than one page and with a width that corresponds to 1 column or 2 columns.

- **All articles are prepared using the 2 column layout:** 2 column articles can contain images 85 mm or 180 mm wide.

#### 2.4.5. Format

The following formats are accepted:

TIFF (.tif) TIFF files should be saved using LZW compression or any other non-lossy compression method.

JPEG (.jpg)

EPS (.eps) EPS files can be uploaded upon acceptance

##### Color Image Mode

Images must be submitted in the color mode RGB.

## Resolution Requirements

All images must be uploaded separately in the submission procedure and have a resolution of **300 dpi at final size**. Check the resolution of your figure by enlarging it to 150%. If the resolution is too low, the image will appear blurry, jagged or have a stair-stepped effect.

Please note saving a figure directly as an image file (JPEG, TIF) can greatly affect the resolution of your image. To avoid this, one option is to export the file as PDF, then convert into TIFF or EPS using a graphics software. EPS files can be uploaded upon acceptance.

## Chemical Structures

Chemical structures should be prepared using ChemDraw or a similar program. If working with ChemDraw please use Frontiers ChemDraw Template, if working with another program please follow the guidelines given below:

Drawing settings: chain angle, 120° bond spacing, 18% of width; fixed length, 14.4 pt; bold width, 2.0 pt; line width, 0.6 pt; margin width 1.6 pt; hash spacing 2.5 pt. Scale 100% Atom Label settings: font, Arial; size, 8 pt.

Assign all chemical compounds a bold, Arabic numeral in the order in which the compounds are presented in the manuscript text. Figures containing chemical structures should be submitted in a size appropriate for incorporation into the manuscript.

## Legibility

Figures must be legible. Check the following:

- The smallest visible text is no less than 8 points in height, when viewed at actual size.
- Solid lines are not broken up.
- Image areas are not pixilated or stair stepped.
- Text is legible and of high quality.
- Any lines in the graphic are no smaller than 2 points width.

## 2.5. Funding disclosure

Details of all funding sources must be provided in the funding section of the manuscript including grant numbers, if applicable. All Frontiers articles are published with open access under the CC-BY Creative Commons attribution license. Articles published with Frontiers automatically fulfil or exceed the requirements for open access mandated by many institutions and funding bodies, including the National Institutes of Health, the Medical Research Council, Research Councils UK, and the Wellcome Trust. Frontiers submits funding data to the Open Funder Registry which is a funder identification service from CrossRef resulting from collaboration between scholarly publishers and funding agencies.

## 2.6. Materials and Data Policies

Frontiers is committed to open science and open data, we require that authors make available all data relevant to the conclusions of the manuscript. Generated data should be publicly available and cited in accordance with our [data citation guidelines](#). We aim to achieve the best community standards regarding data availability, ensuring increased levels of transparency and reproducibility in our published articles.

Our policies on data availability are informed by community-driven standards, which Frontiers endorses, such as the [Transparency and Openness \(TOP\)](#) guidelines, and the joint declaration of data citation principles produced by [FORCE 11](#).

### 2.6.1. Availability of Materials

Authors are required to make all materials used to conduct their research available to other researchers. Research materials necessary to enable the reproduction of an experiment should be clearly indicated in the Materials and Methods section. Relevant materials such as protocols, analytic methods, and study material should preferably be uploaded to an online repository providing a global persistent link/identifier. If this is not possible, authors are strongly encouraged to make this material available upon request to interested researchers, and this should be stated in the manuscript.

Resource Identification Initiative

Authors wishing to participate in the Resource Identification Initiative should cite antibodies, genetically modified organisms, software tools, data, databases, and services using the corresponding catalog number and RRID in your current manuscript. For more information about the project and for steps on how to search for an RRID, please click [here](#).

### 2.6.2. Availability of Data

Frontiers requires that authors make the “minimal data set” underlying the findings described and used to reach the conclusions of the manuscript, available to any qualified researchers. The data should be FAIR – findable, accessible, interoperable, and reusable – so that other researchers can locate and use the data. However, exceptions are granted if data cannot be made publicly available for legal or ethical reasons.

To comply with best practice in their field of research, authors are required to make certain types of data available to readers at time of publication in specific stable, community-supported repositories such as those listed below. Authors are encouraged to contact our data availability office at [datapolicy@frontiersin.org](mailto:datapolicy@frontiersin.org) prior to submission with any queries concerning data reporting.

#### 2.6.2.1 Exceptions related to Availability of Data

We strongly encourage sharing the maximal amount of data, however where ethical, legal or privacy issues are present the data should not be shared. In cases where some or all data cannot be shared for legal, ethical or privacy restrictions, the authors should make these limitations clear in the Data Availability Statement at the time of submission.

Possible limitations to making data publicly available include patient confidentiality and participant privacy. Authors should ensure that the data shared are in accordance with the ethical consent provided by participants on the use of confidential/identifiable human data. We require that the authors demonstrate that publication of such data does not compromise the anonymity of the participants or breach local data protection laws.



In situations where access is restricted to protect confidential or proprietary information, authors are required to explain the restrictions on the dataset and make the data available upon request with permission of the third party. The Data Availability statement should include all necessary contact information to request access to the dataset.

### 2.6.3. Data Citation Guidelines

Authors are encouraged to cite all datasets generated or analyzed in the study. Where datasets are cited, they should be included in the references list to maximize future usability. The following format should be used:

[Dataset] Author names. (year) Data Title. Repository name. Version. Persistent identifier

### 2.6.4. Data Availability Statements

Data availability statements are required for all manuscripts published with Frontiers. During the submission process, authors will be asked to detail the location of the raw data underlying the conclusions made in the manuscript, and whether it will be made available to other researchers following publication. Authors will also be asked for the details of any existing datasets that have been analysed in the manuscript. These datasets should be cited in accordance with our data citation guidelines.

A statement will be automatically generated using the information provided in the submission form; however, manuscripts containing incomplete or incorrect statements will be prevented from entering the review process.

Examples of acceptable statements

#### **55. Datasets are in a publicly accessible repository:**

The datasets [GENERATED/ANALYZED] for this study can be found in the [NAME OF REPOSITORY] [LINK]

#### **56. Datasets are available on request:**

<b>Data-type</b>	<b>Required Repositories</b>	<b>Metadata Standard</b>
Genetic and genomic sequence (DNA/ RNA)^	GenBank DNA Data Bank of Japan (DDBJ) European Nucleotide Archive (ENA)	MiXS
Metagenomic sequence	EBI Metagenomics	MiXS
DNA and RNA trace or short-read sequencing data	NCBI Trace Archive NCBI Sequence Read Archive	MiXS

Genetic polymorphism data, including SNP and CNV data	dbSNP dbVar European Variation Archive DGVa	MiXS
Gene expression data; chromatin immunoprecipitation data (deep-sequencing or microarray)	ArrayExpress Gene Expression Omnibus (GEO)	MIAME / MINSEQE
Data linking genotype to phenotype	dbGaP	
Protein sequence data	UniProt	
Proteome profiling data	PRIDE PeptideAtlas	MIAPE

	ProteomeXchange	
Small molecule, protein, protein complex data structural data	Crystallography Open Database Cambridge Structural Database wwPDB (Protein DataBank) Electron Microscopy Databank	CIF
Taxonomy data	Zoobank	

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

**57. All relevant data is contained within the manuscript:**

All datasets [GENERATED/ANALYZED] for this study are included in the manuscript/supplementary files.

**58. Restrictions apply to the datasets:**

The datasets for this manuscript are not publicly available because: [VALID REASON]. Requests to access the datasets should be directed to [NAME, EMAIL].

**59. Data has been obtained from a third party:**

<b>Data-type</b>	<b>Recommended Repositories</b>	<b>Metadata Standard</b>
------------------	---------------------------------	--------------------------

The data analyzed in this study was obtained from [SOURCE], the following licenses/restrictions apply [RESTRICTIONS]. Requests to access these datasets should be directed to [NAME, EMAIL].

**60. No datasets were generated for this study**

2.6.5. Mandatory data and Required Repositories

Authors are required to deposit the following mandatory data-types in public, community-supported repositories, such as those listed below, prior to publication of an associated Frontiers manuscript:

^ Genetic sequence variants should be annotated according to the guidelines established by the Human Variome Project.

Authors are encouraged to consider deposition in public, community-supported repositories of the data-types listed below:

Protein-protein interaction data	Database of Interacting Proteins (DIP)	MIMIx
Metabolite and metabolome profiling data	MetaboLights Human Metabolome Database	MSI
Small-molecule screening data, chemical compound data	PubChem	CIF
Flow cytometry data	Flow Repository	
Brain Imaging data / Neuroimaging data	OpenNeuro INDI NITRC NeuroVault [Statistical maps]	BIDS

Trait data	TRY database	
Phenology data	National Phenology Network	
Any data	FigShare Dryad Digital Repository	None

### 2.6.6 Code

Frontiers is committed to open science and open data, we require that authors make available all code used to conduct their research available to other researchers. Code necessary to enable the reproduction of an experiment should be clearly indicated in the Materials and Methods section, and where possible code should be uploaded to an online repository (such as github.com or code ocean) providing a global persistent link/identifier.

Our policies on code availability are informed by community-driven standards, which Frontiers endorses, such as the [Transparency and Openness \(TOP\)](#) guidelines, and the joint declaration of data citation principles produced by [FORCE 11](#).

### 2.6.7. Inclusion of RNAseq Data

Studies employing RNASeq for comparative transcriptomic analyses must contain at least 3 biological replicates (unless otherwise justified). Each biological replicate should be represented in an independent library, each with a unique barcode if libraries are multiplexed for sequencing. Validation on a number of key transcripts highlighted in the study is also highly recommended.

Full data accompanying these experiments must be made available to reviewers at the time of submission in a freely accessible resource e.g the [sequence read archive \(SRA\)](#) or [European Nucleotide Archive \(ENA\)](#). Depending on the question addressed in a manuscript, de novo assemblies of transcriptomes may also require multiple replicates and assembled sequences together with sequence annotation must be made freely available e.g [figshare](#) or [dryad](#).

#### 2.6.8 Inclusion of Proteomics Data

Authors should provide relevant information relating to how peptide/protein matches were undertaken, including methods used to process and analyse data, false discovery rates (FDR) for large-scale studies and threshold or cut-off rates for peptide and protein matches. Further information should include software used, mass spectrometer type, sequence database and version, number of sequences in database, processing methods, mass tolerances used for matching, variable/fixed modifications, allowable missed cleavages, etc.

Authors should provide as supplementary material information used to identify proteins and/or peptides. This should include information such as accession numbers, observed mass (m/z), charge, delta mass, matched mass, peptide/protein scores, peptide modification, miscleavages, peptide sequence, match rank, matched species (for cross-species matching), number of peptide matches, etc. Ambiguous protein/peptide matches should be indicated.

For quantitative proteomics analyses, authors should provide information to justify the statistical significance, including biological replicates, statistical methods, estimates of uncertainty, and the methods used for calculating error.

For peptide matches with biologically relevant post-translational modifications (PTMs) and for any protein match that has occurred using a single mass spectrum, authors should include this information as raw data or annotated spectra, or submit data to an online repository (recommended option; see table below).



Raw or matched data and 2-DE images should be submitted to public proteomics repositories such as those participating in ProteomeXchange. Submission codes and/or links to data should be provided within the manuscript.

## 2.7. Statistics

Frontiers requires that all statements concerning quantitative differences should be based on quantitative data and statistical testing. For example, if a quantitative statement is made regarding the abundance of a certain protein based on a western blot, we request that the blot be scanned and the abundance assessed quantitatively using the correct analytic software (e.g. ImageJ) and statistics in order to support that statement.

Statistics should/must be applied for independent experiments. The number of independent samples and the deviation parameters (e.g. Standard Error of the Mean, Standard Deviation, Confidence Intervals) should be clearly stated in the Methods or the Figure legends. In general, technical replicates within a single experiment are not considered to be independent samples. Where multiple comparisons are employed (e.g. microarray data or Genome-wide association studies), any analysis should correct for false positive results. Descriptions of statistical procedures should include the software and analysis used, and must be sufficiently detailed to be reproduced.

## 3. Editorial Policies and Publication Ethics

Frontiers' ethical policies are a fundamental element of our commitment to the scholarly community. These policies apply to all the Frontiers in journal series. Frontiers has been a member of the Committee of Publication Ethics since January 2015 and follows COPE guidelines where applicable.

### 3.1. Authorship and Author Responsibilities

Frontiers follows the International Committee of Medical Journal Editors guidelines which state that, in order to qualify for authorship of a manuscript, the following criteria should be observed:

- Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis or interpretation of data for the work;

- Drafting the work or revising it critically for important intellectual content;
- Provide approval for publication of the content;
- Agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributors, who do not meet these criteria, but nonetheless provided important contributions to the final manuscript should be included in the acknowledgements section. It is the authors responsibility to get written approval by persons named in the acknowledgement section. In order to provide appropriate credit to all authors, as well as assigning responsibility and accountability for published work, individual contributions should be specified as an Author Contributions statement. This should be included at the end of the manuscript, before the References. The statement should specify the contributions of all authors. You may consult the Frontiers manuscript guidelines for formatting instructions. Please see an example here:

AB, CDE and FG contributed conception and design of the study; AB organized the database; CDE performed the statistical analysis; FG wrote the first draft of the manuscript; HIJ, KL, AB, CDE and FG wrote sections of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision, read and approved the submitted version.

The corresponding author takes primary responsibility for communication with the journal and editorial office during the submission process, throughout peer review and during publication. The corresponding author is also responsible for ensuring that the submission adheres to all journal requirements including, but not exclusive to, details of authorship, study ethics and ethics approval, clinical trial registration documents and conflict of interest declaration. The corresponding author should also be available post-publication to respond to any queries or critiques.

Requests to modify the authors list after submission should be made to the editorial office using the [authorship changes form](#).

### 3.2. Research Integrity

Material submitted to Frontiers must comply with the following policies to ensure ethical publication of academic work:

- lxv. *Original content and duplicate publication:* Frontiers only publishes original content. Authors confirm the submission of original content in the Terms & Conditions upon submission. Manuscripts submitted to Frontiers must not have been previously published or be under consideration for publication elsewhere, either in whole or in part. If an article has been previously submitted for publication elsewhere, Frontiers will only consider publication if the article has been definitively rejected by the other publisher(s) at the point of submission to Frontiers.
- lxvi. *Redundant publication:* Frontiers considers the submission and publication of very similar articles based on the same experiment or study to be unethical.
- lxvii. *Fabrication and falsification:* Frontiers opposes both the fabrication of data or images (i.e. fake or made up data) and the falsification of data or images (i.e. the intentional misrepresentation or deceptive manipulation of data).
- lxviii. *Plagiarism:* Plagiarism occurs when an author attempts to present previously published work as original content. Every manuscript submitted to Frontiers is screened for textual overlap by the software CrossCheck, powered by iThenticate. Manuscripts found to contain textual overlap are not considered for publication by Frontiers. For more details on what constitutes plagiarism, please see [here](#).

We reserve the right to contact the affiliated institutions of authors, who have not acted according to good research and publication practices.

### 3.3. Translations

Frontiers accepts manuscript submissions that are exact translations of previously published work. This should be clearly stated in the manuscript upon submission. Permission from the original publisher and authors needs to be sought and also stated in the manuscript, and the relevant documents should be provided as supplementary data for verification by the Editor and the editorial office. The original work from which the manuscript has been translated should be clearly referenced.

- *"This is a ('language') language translation/reprint of ('insert title here') originally published in ('insert name here'). ('Insert name here') prepared this translation with support from (insert name of funding source, if any). Permission was granted by ('Insert name here')."*

Please note that Frontiers may request copies of related publications if there are any concerns about overlap or possible redundancy.

### 3.4. Plagiarism and Duplication

Frontiers checks all submitted manuscripts for plagiarism and duplication, and publishes only original content. Those manuscripts where plagiarism or duplication is shown to have occurred will not be considered for publication in a Frontiers journal. It is required that all submissions must consist as far as possible of content that has not been published previously. In accordance with [COPE guidelines](#), we expect that "original wording taken directly from publications by other researchers should appear in quotation marks with the appropriate citations." This condition also applies to an author's own work.

For submissions adapted from theses, dissertations, conference abstracts or proceedings papers, please see the following sections for more information.

#### **Theses and Dissertations**

Frontiers allows the inclusion of content which first appeared in an author's thesis so long as this is the only form in which it has appeared, is in line with the author's university policy, and can be accessed online. If the thesis is not archived online, it is considered as original unpublished data and thus is subject to the unpublished data restrictions of some of our article types. This inclusion should be noted in the Acknowledgements section of the manuscript and the thesis should be cited and referenced accordingly in the Reference list. For some examples, please check our in Manuscript Requirements and Style Guide at 2.3.1

#### **Conferences, Proceedings and Abstracts**

Manuscripts that first appeared as conference papers must be expanded upon if they are to be considered as original work. You are required to add a substantial amount of original content in the form of new raw material (experiments, data) or new treatment of old data sets which lead to original discussion and/or conclusions, providing value that significantly exceeds the original conference version. As a rule of thumb, at least 30% of content must be original. Authors submitting such work are required to:

- Seek permission for reuse of the published conference paper if the author does not hold the copyright (proof of permission should be submitted as supplementary material or sent to [editorial.office@frontiersin.org](mailto:editorial.office@frontiersin.org) with the manuscript ID upon submission).
- Cite the conference in the Acknowledgements section, or the references section if applicable.

### **Blogs**

Although permissible, extended manuscript content which previously appeared online in non-academic media, e.g. blogs, should be declared at the time of submission in the acknowledgements section of the manuscript.

### 3.5. Image Manipulation

Frontiers takes concerns regarding image manipulation seriously. We request that no individual features within an image are modified (e.g. enhanced, obscured, moved, recycled, removed or added). Image processing methods (e.g. changes to the brightness, contrast or color balance) must be applied to every pixel in the image and the changes should not alter the information illustrated in the figure. Where cropped images of blots are shown in figures, a full scan of the entire original gel(s) must be submitted as part of the supplementary material. Where control images are re-used for illustrative purposes, this must be clearly declared in the figure legend. If any form of image processing is legitimately required for the interpretation of the data, the software and the enhancement technique must be declared in the methods section of the manuscript. Image grouping and splicing must be clearly stated in the manuscript and the figure text. Any concerns raised over undeclared image modifications will be investigated and the authors will be asked to provide the original images.

### 3.6. Conflicts of Interest

A conflict of interest can be anything potentially interfering with, or that could reasonably be perceived as interfering with, full and objective peer review, decision-making or publication of articles submitted to Frontiers. Personal, financial and professional affiliations or relationships can be perceived as conflicts of interest.

All authors and members of Frontiers Editorial Boards are required to disclose any actual and potential conflicts of interest at submission or upon accepting an editorial or review assignment.

The Frontiers review system is designed to guarantee the most transparent and objective editorial and review process, and because handling editor and reviewers' names are made public upon the publication of articles, conflicts of interest will be widely apparent.

Failure to declare competing interests can result in the rejection of a manuscript. If an undisclosed competing interest comes to light after publication, Frontiers will take action in accordance with internal policies and Committee on Publication Ethics guidelines.

### **What Should I Disclose?**

As an author, disclosure of any potential conflicts of interest should be done during the submission process. Consider the following questions and make sure you disclose any positive answers:

70. Did you or your institution at any time receive payment or services from a third party for any aspect of the submitted work?
71. Do you have financial relationships with entities that could be perceived to influence, or that give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work?
72. Do you have any patents and copyrights, whether pending, issued, licensed and/or receiving royalties related to the research?
73. Do you have other relationships or activities that readers could perceive to have influenced, or that give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work?

If you failed to disclose any of the potential conflicts of interest above during submission, or in case of doubt, please contact as soon as possible the Frontiers Editorial Office at [editorial.office@frontiersin.org](mailto:editorial.office@frontiersin.org) with the details of the potential conflicts.

Example statement: “Author xxx was employed by company xxxx. All other authors declare no competing interests.”

The handling editors and reviewers will be asked to consider the following potential conflicts of interest before accepting any editing or review assignment:

<p><b>FAMILY</b></p>	<p>1. Are any of the authors a spouse or significant other, a member of the same family or a very close personal friend? Review Editors should also not be a member of the same family as the handling editor.</p>
<p><b>COLLABORATIONS</b></p>	<p>2. Are you currently hosting or have hosted a Frontiers Research Topic with any of the authors within the past 2 years? Are you currently hosting a Frontiers Research Topic with the Editor?</p> <p>3. Are you currently collaborating or have you collaborated on a research project or a publication with any of the authors within the past 2 years?</p> <p>4. Are you currently collaborating or have you collaborated with any of the authors as an advisor or in any other direct supervisory capacity in the past five years?</p> <p>5. Are you currently collaborating or have you collaborated with any of the authors as a student or in any other direct subordinate capacity in the past five years?</p> <p>Note: Review Editors should not accept assignments if they have a close professional relationship with the handling editor, which in their view could affect the objectivity of the review.</p>

<p><b>AFFILIATION</b></p>	<p>6. Are you affiliated with the same institution as the editor? Are you affiliated with the same institution as any of the authors? If so, has this resulted in interactions, collaborations, or mutual interests with the authors that would compromise your impartiality in conducting this review?</p> <p>7. Are you a current member of a committee or department that coincides with an affiliation with the editor or any of the authors?</p>
<p><b>FINANCIAL</b></p>	<p>8. Do you have a business or professional partnership with any author?</p> <p>9. Do you have financial interests or business relations with any organization involved in this research or in the preparation of the manuscript?</p> <p>10. Do you have any financial interest or competing interests in the content of the manuscript that might affect your ability to perform an objective review?</p>

3.7. Bioethics

All research submitted to Frontiers for consideration must have been conducted in accordance with Frontiers guidelines on study ethics. In accordance with COPE guidelines, Frontiers reserves the right to reject any manuscript that editors believe does not uphold high ethical standards, even if authors have obtained ethical approval or if ethical approval is not required.

3.7.1. Studies involving animal subjects

All research involving regulated animals (i.e. all live vertebrates and higher invertebrates) must be performed in accordance with relevant institutional and national guidelines and regulations. Frontiers follows [International Association of Veterinary Editors guidelines](#) for publication of studies including animal research. Approval of research involving regulated animals must be obtained from the relevant institutional review board or ethics committee prior to commencing the study. Confirmation of this approval is required upon submission



of a manuscript to Frontiers; authors must provide a statement identifying the full name of the ethics committee that approved the study. For most article types, this statement should appear in the Materials and Methods section. An example ethics statement:

*This study was carried out in accordance with the principles of the Basel Declaration and recommendations of [name of guidelines], [name of committee]. The protocol was approved by the [name of committee].*

Should the study be exempt from ethics approval, authors need to clearly state the reasons in the declaration statement and in the manuscript. Studies involving privately owned animals should demonstrate the best practice veterinary care and confirm that informed consent has been granted by the owner/s, or the legal representative of the owner/s. Frontiers supports and encourages authors to follow the ARRIVE guidelines for the design, analysis and reporting of scientific research.

#### Humane Endpoints

All manuscripts describing studies where death is an endpoint will be subject to additional ethical considerations. Frontiers reserves the right to reject any manuscripts lacking in appropriate justification.

#### 3.7.2. Studies involving human subjects

Research involving human subjects is expected to have been conducted in accordance with the World Medical Association's Declaration of Helsinki. Studies involving human participants must be performed in accordance with relevant institutional and national guidelines, with the appropriate institutional ethics committee's prior approval and informed written consent from all human subjects involved in the study including for publication of the results. Conformation of this approval is required upon submission of a manuscript to Frontiers; authors must provide a statement identifying the full name of the ethics committee that approved the work and confirm that study subjects (or when appropriate, parent or guardian) have given written informed consent. For most article types, this statement should appear in the Materials and Methods section. An example ethics statement:

*This study was carried out in accordance with the recommendations of [name of guidelines], [name of committee]. The protocol was approved by the [name of committee]. All subjects gave **written informed consent** in accordance with the Declaration of Helsinki.*

Should the study be exempt from ethics approval, authors need to clearly state the reasons in the declaration statement and in the manuscript. In order to protect subject anonymity, identifying information should not be included in the manuscript unless such information is absolutely necessary for scientific purposes AND explicit approval has been granted by the subjects.

### 3.7.3. Inclusion of identifiable human data

Frontiers follows the ICMJE recommendations on the protection of research participants, which state that patients have a right to privacy that should not be violated without informed consent. We require non-essential identifiable details to be omitted from all manuscripts, and written informed consent will be required if there is any doubt that anonymity can be maintained.

It is the responsibility of the researchers and authors to ensure that these principles are complied with, including the obtaining of written, informed consent.

Written informed consent can be documented on a form provided by an institution or ethics committee, and it must clearly state how the identifiable data will be used. Frontiers also makes available its own form, which may be used for this purpose, but use of the Frontiers form is not required if a suitable alternative form of consent, meeting the ICMJE recommendations, is used. We consider it to be the author's duty to encourage participants or patients whose consent for publication is required to read and understand the ICMJE guidelines, for their information prior to completing the consent form. Participants should also be encouraged to ask any questions and to ensure they are comfortable before they sign the consent form.

The completed consent forms should be stored by authors or their respective institutions, in accordance with institutional policies. Frontiers does not need to view the completed form, and this should not be included with the submission. The completed form should be made available on request from the editor or editorial office, both during the review process and post-publication.

The determination of what constitutes identifiable data lies with our editors and editorial office staff, and manuscripts may be rejected if the required consent documents cannot be provided. Please note that written informed consent for publication is required for all case report articles where the patient or subject is identified or identifiable.

#### 3.7.4. Clinical Trials

The World Health Organization defines a clinical trial as "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes." In accordance with the Clinical Trial Registration Statement from the International Committee of Medical Journal Editors (ICMEJ), all clinical trials must be registered in a public trials registry at or before the onset of participant enrolment. This requirement applies to all clinical trials that begin enrolment after July 1, 2005. To meet the requirements of the ICMJE, and Frontiers', clinical trials can be registered with any Primary Registry in the WHO Registry Network or an ICMJE approved registry.

Clinical trial reports should be compliant with the Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) both in terms of including a flow diagram presenting the enrolment, intervention allocation, follow-up, and data analysis with number of subjects for each and taking into account the CONSORT Checklist of items to include when reporting a randomized clinical trial.

The information on the clinical trial registration (Unique Identifier and URL) must be included in the abstract.

#### 3.8. Corrections

Frontiers recognizes our responsibility to correct errors in previously published articles. If it is necessary to communicate important, scientifically relevant errors or missing information, and compelling evidence can be shown that a major claim of the original article was incorrect, a Correction should be submitted detailing the reason(s) for and location(s) of the change(s) needed using the below template. Corrections can be submitted if a small portion of an otherwise reliable publication proves to be misleading, e.g. an error in a figure that does not alter conclusions OR an error in statistical data not altering conclusions OR mislabeled figures OR wrong slide of microscopy provided, or if the author / contributor list is incorrect when a deserving author has been omitted or somebody who does not meet authorship criteria has been included. The contribution to the field statement should be used to clearly state the reason for the Correction. Please note, a correction is not intended to replace the original manuscript.

The title of the submission should have the following format: "Corrigendum: Title of original article". It is advised to use the corrigendum [Word and LaTeX templates](#).

If the error was introduced during the publishing process, the [Frontiers Production Office](#) should be contacted.

### 3.9. Retractions

As a member of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#), Frontiers abides by their guidelines and recommendations in cases of potential retraction.

Frontiers also abides by two other key principles, as recommended by COPE:

- Retractions are not about punishing authors.
- Retraction statements should be public and linked to the original, retracted article.

While all potential retractions are subject to an internal investigation and will be judged on their own merits, Frontiers considers the following reasons as giving cause for concern and potential retraction:

- Clear evidence that findings are unreliable, either as a result of misconduct (e.g. data fabrication) or honest error (e.g. miscalculation or experimental error)
- Findings have previously been published elsewhere without proper attribution, permission or justification (i.e. cases of redundant publication)
- Major plagiarism
- The reporting of unethical research, the publication of an article that did not have the required ethics committee approval
- Legal issues pertaining to the content of the article e.g. libellous content
- Major authorship issues i.e. proven or strongly suspected cases of ghostwriting or sold ('gift') authorship
- Politically-motivated articles where objectivity is a serious concern

- The singling out of individuals or organizations for attack
- Faith issues (e.g. intelligent design)
- Papers that have made extraordinary claims without concomitant scientific or statistical evidence (e.g. pseudoscience)

Readers who would like to draw the editors' attention to published work that might require retraction should contact the authors of the article and write to the journal, making sure to include copies of all correspondence with authors.

Please find more details on our comments and complaints policy [here](#)

### 3.10. Support and Ethical concerns

In our commitment to continuously improve our website, we welcome your feedback, questions and suggestions. Please visit our Help Center to find guidance on our platform or contact us at [support@frontiersin.org](mailto:support@frontiersin.org).

For any ethical concerns, please contact us at [editorial.office@frontiersin.org](mailto:editorial.office@frontiersin.org).