UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CB_1 NOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E PRÓ-NEUROGÊNICOS DA VENLAFAXINA

MELISSA RIBEIRO DE ARAÚJO

Ribeirão Preto
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

MELISSA RIBEIRO DE ARAÚJO

Envolvimento dos receptores CB_1nos efeitos comportamentais e pró-neurogênicos da Venlafaxina

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

Orientador: Profª Drª Alline Cristina de Campos

Ribeirão Preto
2019

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

de Araújo, Melissa Ribeiro

Envolvimento dos receptores CB_1nos efeitos comportamentais e pró-neurogênicos da Venlafaxina . Ribeirão Preto, 2019.

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

Orientador: Campos, Alline Cristina de

1.Neurogênese. 2. Estresse. 3. Antidepressiivo 4.Sistema endocanabinoide

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: de Araújo, Melissa Ribeiro

Título: Envolvimento dos receptores CB_1nos efeitos comportamentais e pró-neurogênicos da Venlafaxina

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

Aprovado em: / /2019

Banca Examinadora

Profª Drª Alline Cristina de Campos FMRP/USP

Julgamento: Assinatura:

Membro 2: Instituição:

Julgamento: Assinatura:

Membro 3: Instituição:

Julgamento: Assinatura:

Dedico este trabalho a minha mãe, por sempre me incentivar a incessante tentativa de oferecer o meu melhor, e aos meus amigos, por me acompanharem ao longo de toda a caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao Divino Criador por iluminar os meus caminhos e promover sempre a sustentação para que eu possa aproveitar a beleza da vida.

Aos meus pais Jô e Jürg por todo amor e apoio em minha caminhada. Obrigada pela dedicação constante em se fazerem presentes em todos os aspectos da minha vida, por abrirem todas as portas do mundo para mim e por terem escolhido ser a minha família. Mãe, texto algum poderia descrever a minha gratidão, mas obrigada por absolutamente tudo, desde os sucos verdes horrorosamente amargos, aos diálogos existenciais que varam as madrugadas e, principalmente, pelos mais reconfortantes e doces abraços do mundo. Amo vocês infinitamente.

À minha orientadora Alline Campos por ter aceitado me guiar nesta jornada e por todos os ensinamentos científicos, políticos e históricos. Obrigada por ser esta cientista apaixonada e dedicada, pelo exemplo de mulher determinada e pela empatia de sempre. Sou muito grata por você acreditar em mim, mesmo nos momentos em que eu mesma não consigo. Muito obrigada também por sempre nos oferecer a oportunidade de observar o mundo através de outra perspectiva.

Aos meus atuais colegas de laboratório Davi, Gabriel, Franciele, Karla, Maria Adriele, Maria José e Giuliana; e também àqueles que não estão mais no laboratório Eduardo, Erika, Mariana, Rafael, Fernanda, Cláudia e Vinícius por terem me acolhido desde o primeiro dia, por todos os ensinamentos e por tornarem a caminhada mais tranquila. Especialmente à Fran por me ajudar em tudo desde o primeiro contato e por ter se tornado essa grande amiga, conselheira e irmã.

Ao Professor Francisco Guimarães por gentilmente compartilhar sua sabedoria em termos científicos, geográficos, históricos ou artísticos. Agradeço também a todos os membros de seu laboratório por ceder espaço físico, reagentes e ajuda sempre que necessário. Especialmente à Nay pela gentileza constante em me ensinar e me ajudar, pelas conversas reconfortantes sobre a vida e por sempre iluminar nossos dias com um sorriso radiante.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto Edu, Fran, Paula, Fê, Nay e Rafa por terem iluminado meus dias com tanta amizade, amor e cuidado. Obrigada por me darem a alegria de compartilhar com vocês tantos momentos felizes tomando açaí, café ou cerveja. Especialmente ao Edu, que desde os primeiros dias foi meu conselheiro, melhor amigo e irmão. Vocês são pura Luz e um presente de Deus na minha vida.

Aos meus amigos de São Paulo, Eve, Lu, Nicolli, Nishida, Pah, Pedro e Plin por fazerem parte da minha história, atravessando comigo a graduação e permanecendo em minha vida após ela. Obrigada por terem se tornado minha segunda casa e por dividirem comigo todas as alegrias e conquistas da vida.

Às minhas queridas Vanessa e Cauane que mesmo à distância se fazem presentes sempre em minha vida por meio de longas conversas. Obrigada por serem as amigas e parceiras incríveis de vida e por dedicarem a mim tanto amor e cuidado.

A todos os professores que passaram pela minha formação e que dedicaram grande parte de suas vidas a iluminar o caminho de outros seres humanos com a luz do conhecimento, da curiosidade e do pensamento crítico.

A toda pós-graduação do departamento de Farmacologia da FMRP, incluindo docentes, funcionários, técnicos, secretários e alunos pela dedicação em fazer esta grande roda continuar a girar, mesmo que em um momento histórico do país em que a ciência, a educação e a saúde cada dia mais estejam sendo desvalorizadas.

A toda equipe de limpeza e manutenção do Campus por manterem as condições físicas necessárias para o funcionamento desta Universidade. E aos funcionários do Restaurante Universitário dos campi de São Paulo e de Ribeirão Preto, por todo esforço e dedicação em preparar as refeições que nos sustentam durante todos estes anos.

À Alexandra Elbakyan pela coragem e determinação em democratizar o acesso ao conhecimento científico.

Ao Dirigente espiritual Reinaldo Oliveira por toda a dedicação, cuidado e gentis ensinamentos. E à toda família CAE pelo acolhimento e amizade.

À CAPES, FAPESP e Instituto L'oreal pelo financiamento da pesquisa

De nuestros miedos
nacen nuestros corajes
y en nuestras dudas
viven nuestras certezas.
Los sueños anuncian
otra realidad posible
y los delirios otra razón.
En los extravios nos
esperan hallazgos,
porque es preciso perderse
para volver a encontrarse.

Eduardo Galeano

RESUMO

RESUMO

de Araújo, M.R; **Envolvimento dos receptores CB1 nos efeitos comportamentais e pró-neurogênicos da venlafaxina**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Nos últimos anos, houve grande avanço na farmacoterapia de transtornos de humor, como no caso da Depressão Maior. Desde a década de 50, a incorporação de novos antidepressivos, como é o caso da Venlafaxina (VFX), promoveu melhores perfis de eficácia clínica e menores incidências de efeitos adversos,. Mesmo com os avanços, clinicamente, entretanto, ainda são observadas muitas limitações inerentes a essa classe de fármacos, caracterizadas principalmente pela alta taxa de refratariedade e baixa adesão ao tratamento por parte dos pacientes. Portanto, surge a necessidade de entender mecanismos de ação paralelos aos mecanismos monoaminérgicos conhecidos, como o envolvimento vias de neurotransmissão não-monoaminérgicas, bem como vias intracelulares ativadas por esta classe de fármacos. No presente estudo, trabalhamos a hipótese de que os efeitos comportamentais e pró-neurogênicos evocados pelo tratamento crônico com VFX em camundongos estressados são dependentes da ativação dos receptores CB_1. Para isto, submetemos camundongos CB57BL/6 a um protocolo de estresse crônico imprevisível durante 21 dias, entre os quais os animais foram aleatoriamente expostos a uma série de estressores. Para definir a dose de VFX utilizada, inicialmente construímos uma curva dose-resposta com as doses de 10, 20 e 40mg/kg e os animais foram testados quanto ao comportamento do tipo ansioso no teste de *Novelty Supressed Feeding* (NSF) e do tipo depressivo, no *Splash-test* (ST). Em seguida aos testes, os animais foram anestesiados, decapitados e tiveram o encéfalo removido para dissecção do hipocampo e análises de expressão proteica dos receptores CB1, TRPV1, da enzima MAGL e da neurotrofina BDNF. O tratamento crônico com VFX foi capaz de reduzir o comportamento tipo ansioso e depressivo nos camundongos em todas as doses. Já as doses de 10 e de 20mg/Kg foram capazes de modular a expressão proteica do receptor CB_1 , da enzima MAGL e da neurotrofina BDNF no hippcampo, indicando uma possível facilitação da sinalização canabinoide. Definimos, então, que a dose de 20mg/Kg de VFX seria utilizada na próxima etapa. Neste protocolo, os animais foram submetidos ao protocolo de CUS por 21 dias e paralelamente tratados intraperitonealmente com VFX 20 mg/Kg e/ou com AM251 0,3mg/Kg e/ou Salina. Os resultados indicaram que o AM251 não bloqueou os efeitos comportamentais da VFX. Com relação à neuroplasticidade, observamos que o estresse foi capaz de reduzir o número de células BrdU+ no GD dos animais estressados, em relação aos animais controle. O tratamento crônico com AM251 foi capaz de reverter este prejuízo na proliferação, de maneira semelhante ao efeito da VFX. Curiosamente, quando precedido de tratamento com AM251, os efeitos proliferativos promovidos pela VFX e AM251 são atenuados. A imunomarcação de células DCX positivas não foi diferente entre os grupos com relação ao número total ou à porcentagem de células em estágio de migração. Em conjunto, nossos resultados parecem ir parcialmente contra nossa hipótese inicial. Concluímos que a ativação de CB_1 não parece ser necessária paria para os efeitos tipo ansiolítico e tipo antidepressivo do tratamento crônico com VFX, mas é recrutado nos efeitos pró-proliferativos desse antidepressivo.

Palavras-chave: neurogênese, hipocampo, estresse , venlafaxina, sistema endocanabinoide.

ABSTRACT

Involvement of CB1 receptors in the behavioral and the proneurogenic effects of venlafaxine. 2018. Master thesis. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019

In the last decades, great progress has been achieved in the treatment of Psychiatric Disorders, like Major Depressive Disorder. The incorporation of new antidepressants, such as Venlafaxine, is associated with better clinic efficacy profiles and lower incidences of adverse effects. However, even with the progress, several limitations inherent to this class of drugs, characterized mainly by the high rates of treatment resistance and low treatment adherence, are still observed in the clinical practice. Since the monoaminergic based mechanism of action of the ADs does not seem to be enough to explain all the behavioral and neuroplastic effects evoked by chronic treatment observed after Ads treatment, there is a need to understand mechanisms in parallel, such as the involvement of non-monoaminergic neurotransmission pathways as well as intracellular pathways activated by this class of drugs. In the present study, we hypothesized that the behavioral and the pro-neurogenic effects evoked by chronic treatment with VFX in stressed mice are dependent on CB_1 receptor activation. In order to test this, we subject CB57BL6 mice to the Chronic Unpredictable Stress (CUS) during 21 days. Aiming to establish a dose of VFX, initially, we performed a dose-response curve with doses range of 10, 20 or 40mg/kg, injected daily via intraperitonaelly. The animals were tested to measure anxiety-like behavior in the Novelty Supressed Feeding (NSF) test and in the Splash-test (ST), to screen depressive-like behaviors. Following the tests, the animals were anesthetized, decapitate their brains removed and, hippocampus dissected for protein expression analysis via western blotting. The treatment with VFX was able to reduce anxiety- and depressive-like behavior in mice in all the doses tested. Also, the doses of 10 and 20mg/kg of VFX were able to enhance the protein expression of the CB_1 receptor, the MAGL enzyme and the neurotrophin BDNF in the hippocampus, suggesting a possible facilitation of cannabinoid signaling. We then defined the dose of 20mg/kg of VFX to be tested in the next step. In the next protocol, mice were submitted to a 21-day CUS and treated intraperitoneally daily with VFX 20 mg/kg and/or with AM251 and/or Saline. The results indicated that the AM251 did not block the behavioral effects of VFX. Regarding neuroplasticity, we observed that stress was able to reduce the number of BrdU+ cells in the GD of stressed animals compared to control animals. Chronic treatment with VFX or AM251 was able to reverse this impairment in the proliferation. Interestingly, when in combination with AM251, the pro-proliferative effect of VFX are attenuated. No effects in the total number of DCX+ cells or percentage of DCX+ migrating cells was found in the tested groups. Taken together, our results seem to partial refute our initial hypothesis. In conclusion, the CB_1 receptor antagonism does not seem to be necessary for anxiolytic-like effect evoked by VFX in stressed mice, but are involved in the pro-proliferative effects of VFX.

Key-Words: Neurogenesis; Hippocampus, Stress; Endocannabinoid System

Sumário

FOLHA DE APROVAÇÃO 3
LISTA DE FIGURAS 6
LISTA DE ABREVIAÇÕES 8
1. INTRODUÇÃO 21
1.1 A PARTICIPAÇÃO DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL NAS RESPOSTAS AO ESTRESSE E NA NEUROBIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE HUMOR 3
1.2 A NEUROGÊNESE ADULTA 7
1.3 PAPEL DA NEUROGÊNESE NA RESPOSTA AO ESTRESSE E NA PATOFISIOLOGIA DE TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS 12
1.4 NEUROGÊNESE E RESPOSTA AOS AD´S 14
1.5 SISTEMA ENDOCANABINOIDE E RESPOSTA AOS AD´S 15
1.6 SISTEMA ENDOCANABINOIDE E NEUROGÊNESE ADULTA 19
1.7 VENLAFAXINA: UM FÁRMACO PROMISSOR E CONTRADITÓRIO 20
2 OBJETIVOS 23
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23
3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 25
3.1 Experimento I: 25
3.2 Experimento II 25
3.3 Experimento III: 25
4. MATERIAL E MÉTODOS 27
4.1 ANIMAIS 27
4.2 DROGAS E TRATAMENTO 27
4.4 PERFUSÃO E PRESERVAÇÃO DOS TECIDOS 28
4.5 DETERMINAÇÃO DE CÉLULAS BRDU POSITIVAS POR IMUNOHISTOQUÍMICA 28
4.6 DETERMINAÇÃO DE CÉLULAS DCX POSITIVAS POR IMUNOHISTOQUÍMICA 29
4.7 SPLASH-TEST (ST) 30
4.8 TESTE DA ALIMENTAÇÃO SUPRIMIDA PELA NOVIDADE (NOVELTY SUPRESSED FEEDING, NSF) 31
4.9 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS 31
4.10 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOT 32
4.11- ANÁLISE ESTATÍSTICA 33

5 RESULTADOS 36
5.1) EXPERIMENTO I: CURVA DOSE-RESPOSTA PARA A VFX 36
- Não foi observado efeito tipo antidepressivo no Splash-test após tratamento crônico com VFX em nenhuma das doses testadas 36
- A Venlafaxina atenua os efeitos ansiogênicos do estresse em todas as doses administradas 38
- A Venlafaxina modula expressão de componentes do Sistema Endocanabinoide e da Neurotrofina BDNF 40
5.2 EXPERIMENTO III 44
- Os tratamentos crônicos com AM251 provoca efeito anorexigênico nos animais estressados tratados com veículo, mas não nos animais tratados posteriormente com VFX 44
5.3) Alterações comportamentais após CUS e tratamento com VFX e/ou AM251 47
Efeito tipo antidepressivo da VFX na presença do antagonista de receptores CB_1, AM251 47
- A VFX apresenta efeito tipo ansiolítico, porém este efeito apresenta-se de maneira independente da ativação do receptor CB_1 49
5.4) Análises moleculares das amostras hipocampais dos camundongos submetidos ao CUS e tratados com VFX e/ou AM251 52
- O antagonismo de CB_1 pelo tratamento crônico com AM251 apresentou efeito proliferativo, entretanto, o tratamento crônico com VFX não alterou a marcação para células BrdU+ 55
- Não houve efeito do estresse ou do tratamento em relação ao número total de células DCX na SGZ dos camundongos 58
6 DISCUSSÃO 62
7. CONCLUSÃO 77
8. Referências Bibliográficas 79
9. APÊNDICE 1 95
9.1 INTRODUÇÃO 95
9.2 RESULTADOS 95
- Experimento II: Efeitos do estresse e dos tratamentos com venlafaxina e AM251 nos animais gerados e criados com a ração AGROMIX 95
- Os animais alimentados com a ração AGROMIX não apresentam diferenças no ganho de peso independentemente do fator estresse ou do tratamento 95

- Os animais alimentados com a ração AGROMIX não apresentam diferenças no comportamento do tipo depressivo..... 98

- Os animais alimentados com a ração AGROMIX não apresentam diferenças nos comportamentos tipo ansioso independentemente do fator estresse ou do tratamento 100

- Os animais alimentados com a ração AGROMIX não apresentam diferenças no comportamento do tipo depressivo..... 102

9.3. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO..... 104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das etapas da neurogênese hipocampal adulta, ressaltando suas fases de desenvolvimento, os tipos celulares de cada etapa e alguns exemplos de seus respectivos e marcadores.

Figura 2: Delineamento experimental do experimento I, mostrando o esquema de estresse e tratamento, seguido dos testes comportamentais realizados.

Figura 3: Delineamento experimental dos experimentos II e III, mostrando o esquema de estresse e tratamento, seguido dos testes comportamentais realizados.

Figura 4: Efeitos comportamentais do estresse crônico em animais tratados com veículo ou diferentes doses de VFX sobre os comportamentos de autolimpeza.

Figura 5: Efeitos comportamentais do estresse crônico em animais tratados cronicamente com veículo ou com VFX submetidos ao modelo do Novelty Supressed Feeding.

Figura 6: Efeitos comportamentais do estresse crônico em animais tratados com veículo e do tratamento repetido com VFX sobre a expressão proteica de componentes do ECS.

Figura 7: Efeitos comportamentais do estresse crônico em animais tratados com veículo e do tratamento repetido com VFX sobre a expressão proteica do receptor TRPV1 e da neurotrofina BDNF.

Figura 8: Acompanhamento semanal da variação de peso corporal em animais submetidos ao estresse crônico e tratados com AM251 e/ou VFX.

Figura 9: Efeitos comportamentais do estresse crônico em animais tratados AM251 e/ou VFX submetidos ao modelo do Novelty Supressed Feeding.

Figura 10: Comportamentos de autolimpeza em animais estressados cronicamente e tratados com AM251 e/ou VFX.

Figura 11: Efeitos comportamentais do estresse crônico em animais tratados com veículo e do tratamento repetido com VFX e/ouAM251 sobre a expressão proteica de componentes do ECS.

Figura 12: Proliferação celular no GD de camundongos cronicamente estressados e submetidos aos tratamentos com AM251 e/ou VFX durante 21 dias.

Figura 13: Fotomicrografia representativa de células BrdU positivas ($BrdU^+$) localizadas no giro denteado do hipocampo de camundongos não estressados tratados com salina ou estressados durante 21 dias e tratados com salina, com AM251/Sal, com Sal/VFX ou com AM251/VFX.

Figura 14: Células positivamente marcadas para DCX na SGZ de camundongos cronicamente estressados e tratados com AM251 e/ou VFX.

Figura 15: Fotomicrografia representativa de células doublecortin positivas (DCX^+) localizadas no giro denteado do hipocampo de camundongos não estressados ou submetidos ao protocolo de 21 dias de CUS, tratados com salina ou com salina, com AM251/Sal, com Sal/VFX ou com AM251/VFX (e).

Figura 16: Acompanhamento semanal da variação de peso corporal em animais submetidos ao estresse crônico, alimentados com a ração AGROMIX e tratados com AM251 e/ou VFX.

Figura 17: Comportamentos de autolimpeza em animais estressados cronicamente, alimentados com a ração AGROMIX e tratados com AM251 e/ou VFX.

Figura 18: Efeitos comportamentais do estresse crônico em animais alimentados com a ração AGROMIX e tratados AM251 e/ou VFX submetidos ao modelo do Novelty Supressed Feeding

LISTA DE ABREVIAÇÕES

2-AG: 2-araquidonoilglicerol

5-HT: Serotonina

5-HT_{1a}: Receptor serotoninérgico tipo 1

AD: Antidepressivo

AEA: Anandamida

ANOVA: *Analysis of Variance*

BLA: Amídala Basolateral

BO: Bulbo Olfatório

BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine

CA: *Cornu Ammonis*

CB1: Receptor canabinoide tipo 1

CUS: *Chronic Unpredictable Stress*

DA: Dopamina

DAGL: Diacilglicerol lipase

DCX: *Doublecortin*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

eCB: Endocanabinoides

ECS: *Endocannabinoid System*

EPM: Erro Padrão da Média

ESC: Escitalopram

FAAH: *Fatty Acid Amide Hydrolysis*

FBS: Soro Fetal Bovino

FDA: *Food and Drug Administration*

FLX: Fluoxetina

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GD: Giro Denteado

GFAP: Proteína Glial Fibrilar Ácida

HPA: Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

IRSN: Inibidor da Recaptação de Serotonina e de Noradrenalina

ISRS: Inibidor Seletivo da Recaptação da Serotonina

KO: *Knockout*

LC: *Locus Coeruleus*

MAGL: Monoacilglicerol lipase

MAO: Monoamina Oxidases

MDD: *Major Depression Disorder*

NA: Noradrenalina

NPC: *Neural Progenitor Cell*

NSC: *Neural Stem Cell*

NSF: *Novelty Supressed Feeding*

PBS: Salina Fosfatada e Tamponada

PFC: *Prefrontal Cortex*

PTSD: *Post-Traumatic Severe Disorder*

PVN: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

SGZ: Subgranular Zone

SNC: Sistema Nervoso Central

ST: *Splash-test*

SVZ: *Subventricular Zone*

TAG: Transtorno de Ansiedade Generalizada

VFX: Venlafaxina

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Após a Segunda Guerra Mundial, com o desenvolvimento da indústria farmacêutica e a introdução de vários fármacos na prática clínica, não era raro que um fármaco inicialmente sintetizado para uma doença ou transtorno específico, falhava em produzir uma determinada resposta clínica, mas mostrava-se inesperadamente efetivo em outros contextos patológicos. Nesse sentido, dois exemplos clássicos estão diretamente relacionados à classe dos antidepressivos. Na tentativa de produzir um novo fármaco para o tratamento da tuberculose, a Iproniazida, demostrou-se capaz de melhorar o humor e a interação social dos pacientes, o que foi, mais tarde, associado à sua capacidade de inibir a enzima monoamina oxidase (MAO) (HILLHOUSE; PORTER, 2015). No mesmo período, com o intuito de gerar um novo antipsicótico, a imipramina, que carecia de tal eficácia clínica, foi produzida. Curiosamente, em 1957, a mesma imipramina era introduzida como o primeiro medicamento especificamente antidepressivo.(DOMINO, 1999; HILLHOUSE; PORTER, 2015). Esses achados "serendipite", levaram ao desenvolvimento de uma nova classe de drogas, os fármacos antidepressivos (AD´s). Na década de 1980, o desenvolvimento da Fluoxetina, um Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina (ISRS), obteve grande sucesso clínico (RICHELSON, 1994; WONG et al., 1974). Em seguida, surgiram outras classes de AD´s com estrutura heterocíclica, conhecidos como Segunda e Terceira Geração, sendo alguns exemplos, em ordem de desenvolvimento: bupropiona, sertralina, paroxetina, clomipramina e fluvoxamina (RICHELSON, 1994). Os AD´s consolidaram-se como primeira escolha no tratamento da MDD, constando na liderança da lista dos Fármacos mais prescritos mundialmente (HILLHOUSE; PORTER, 2015; RICHELSON, 1994).

Paralela à descoberta desta classe de fármacos, e tendo por base os mecanismos de ação destes fármacos, a Teoria Monoaminérgica da Depressão Maior começava a ser estabelecida. Esta presumia que a Depressão Maior (MDD, do inglês: *Major Depression Disorder*) seria o resultado da redução da disponibilidade de monoaminas (como a serotonina (5-HT), a noradrenalina (NA) e dopamina (DA)) nas fendas sinápticas de regiões do sistema Nervoso Central classicamente associadas ao controle das emoções, tais como Córtex Pré-Frontal (PFC do inglês: *prefrontal cortex*), hipocampo (HP) entre outras (DELGADO, 2000; HIRSCHFELD,

2000; SCHILDKRAUT, 1965). Embora a maioria dos AD´s atuem primariamente por facilitar a neurotransmissão monoaminérgica de maneira quase imediata, clinicamente seus efeitos principais são observados apenas após um período superior a três semanas de administração (HIRSCHFELD, 2000). Além disso, esta teoria também não agrega informações necessárias para explicar o porque a facilitação da transmissão serotoninérgica ou noradrenérgica não necessariamente refletir-se em eficácia clínica no tratamento da MDD. Importante ressaltar que os mesmo ocorre no tratamento de outros transtornos psiquiátricos em que o AD's são os fármacos de escolha, tais como o Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC), o Transtornos de Pânico ou o Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG) (HIRSCHFELD, 2000). Sendo assim, a simples facilitação da neurotransmissão monoaminérgica não seria suficiente para explicar todos os efeitos comportamentais evocados pelos AD´s e nem explicaria a ausência de efeitos terapêuticos quando o tratamento é aplicado de maneira aguda. Na tentativa de desvendar esta incongruência entre a administração de AD´S e a latência para o surgimento de seus efeitos, surgiram teorias complementares à Teoria Monoaminérgica e, consequentemente, aos mecanismos de ação dessa classe de fármacos.

Entre elas, por exemplo, a teoria de Mongeau, Blier e Montigny (1997) postula que o tratamento agudo com AD´s, ao elevar os níveis 5-HT e NA em todo SNC, facilitariam a ação dessas monoaminas em autoreceptores (acoplados à proteínas G inibitórias) localizados nos corpos celulares dos núcleos da rafe e cerúleo. Essa modulação inibitória, levaria à uma redução ainda maior nos níveis de 5-HT e NA nas áreas de projeção prosencefálicas desses núcleos depois dos tratamento agudo ou de curto prazo com os AD's. Entretanto, na situação de tratamento crônico, os AD's levariam à dessensibilização dos autorreceptores 5-HT_{1A} e dos receptores a_2-adrenérgicos, respectivamente, aumentando os níveis hipocampais e corticais destes neurotransmissores, por exemplo (MONGEAU; BLIER; DE MONTIGNY, 1997). Outras teorias ainda levam em consideração que as alterações em diversas vias de sinalização intracelulares envolvidas em fenômenos de plasticidade neural, tais como o aumento de sobrevivência neuronial, o remodelamento dendrítico e o aumento na produção de neurotrofinas, como *Nerve Growth Factor* (NGF) e *Brain Derived Neurotrophic* Factor (BDNF), seriam necessários para o aparecimento dos efeitos terapêuticos dos AD's (BESSA et al., 2009; SANTARELLI et al., 2003).

Nos últimos anos, houve grande avanço na farmacoterapia de transtornos de humor, como no caso da MDD, por meio da incorporação de novos antidepressivos com melhores perfis de eficácia e com menores incidências de efeitos adversos, os quais aumentaram a aderência dos pacientes (CIPRIANI et al., 2018). Nessa realidade, encontram-se o Escitalopram, um ISRS, e a Venlafaxina, um inibidor seletivo da receptação de serotonina e noradrenalina (IRSN). No entanto, mesmo com a supostas vantagens clínicas, ainda são observadas muitas limitações inerentes a esses fármacos, uma vez que ainda existe uma taxa de resistência ao tratamento de, aproximadamente, 40% dos pacientes (FAVA, 2000; TRIVEDI et al., 2006) bem como o fato de que a latência observada para o início dos efeitos clínicos não diferem significativamente dos outros AD's (CIPRIANI et al., 2018).

Dentro desta problemática, surge a necessidade de entender melhor os mecanismos de ação paralelos à modulação monoaminérgica evocada por quase todos os ADs conhecidos na atualidade. Neste sentido, é essencial compreender a complexidade da neurobiologia dos transtornos de Depressão Maior e ansiedade, de modo que possam ser esclarecidos o envolvimento de outras vias de neurotransmissão, bem como de vias intracelulares ativadas por esta classe de fármacos

1.1 A PARTICIPAÇÃO DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL NAS RESPOSTAS AO ESTRESSE E NA NEUROBIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE HUMOR

Considerando a vastidão de transtornos psiqui[atricos e a complexidade envolvida em sua patofisiologia, nosso trabalho se concentra nos aspectos neurobiológicos da MDD, e, principalmente, em sua farmacoterapia atual. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a depressão é a principal causa de incapacidade no mundo, sua prevalência apresenta um risco próximo a 20% ao longo da vida e, atualmente, são contabilizadas mais de 300 milhões de pessoas atingidas por este transtorno em todo o mundo. Os últimos 50 anos foram marcados pelo surgimento de uma gama de teorias que alegavam ter descoberto o ponto central da etiologia da MDD, tendo como algumas perspectivas das causas genética, bioquímica e até mesmo social. No entanto, resultados interessantes surgiram no sentido de desvendar a capacidade do cérebro em interagir de maneira dinâmica com o ambiente, tal capacidade foi denominada neuroplasticidade.

Dentre os principais eventos ambientais com os quais o cérebro interage de maneira mais rebuscada, podemos citar o estresse, cuja relação com a ocorrência de complexas alterações plásticas e com desencadeamento de transtornos de humor parece bem estabelecida na literatura. A evolução do conceito de "estresse" ganhou notoriedade no campo da neurociência após os estudos de Walter Cannon, pioneiro em associar o aumento de liberação de adrenalina à situações de "emergência", e, posteriormente aos estudos de Hans Selye, que caracterizou os estágios de resposta do organismo quando expostos a eventos estressores. Os estudos desenvolvidos por Cannon indicavam que quando o organismo era desafiado por um insulto, havia ativação de mecanismos de retroalimentação visando a manutenção da estabilidade do meio interno, o que foi definido, portanto, como homeostasia. Assim, durante situações de potencial perigo, haveria ativação da glândula adrenal, consequente liberação de adrenalina e ativação do eixo-HPA, gerando respostas fisiológicas ditas de "luta ou fuga" (GOLDSTEIN; KOPIN, 2007). Contemporâneo a Cannon, Selye também desenvolveu estudos visando explicar como o corpo gerenciava eventos estressores. Este pesquisador propôs a compreensão de três estágios de respostas, que em conjunto formariam o que ele denominou de Síndrome da Adaptação Geral (SELYE, 1946). O primeiro estágio consistiria em um estado de alerta, mediado pelo Sistema Nervoso Autonômico Simpático, no qual o organismo recruta uma resposta inicial, com o intuito de enfrentar o agente estressor. O segundo estágio seria caracterizado por uma fase de resistência com mecanismos mediados pelo Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) através do hormônio esteroide cortisol. Neste estágio, ocorreria o máximo de recrutamento de respostas fisiológicas e comportamentais visando neutralizar o agente estressor e retornar à homeostase. Por fim, o terceiro estágio ocorreria quando os sistemas estivessem em um estado de exaustão, caso houvesse uma falha em neutralizar o agente estressor(SELYE, 1946). Este conjunto de respostas do organismo, posteriormente, foi resumido como "Resposta inespecífica do organismo a qualquer demanda imposta a ele" (Selye, 1936), definição que alguns anos depois ficou conhecida meramente pelo termo físico, "estresse".

Ao longo dos anos, estas teorias foram sendo refinadas. Estudos de Sterling e Eyer definiram o termo alostasia, para referir-se à capacidade do cérebro de retornar à homeostase por meio de alterações fisiológicas ou comportamentais (Sterling; Eyer; DiCarlo, 1988). Desta maneira, o cérebro atuaria como um sensor que capta os sinais e orquestra uma resposta aos agentes estressores, de modo que aspectos individuais de cognição, expectativas e experiencias

prévias determinariam como o indivíduo seria capaz de avaliar a ameaça gerada pelo evento (MCEWEN, 2003; MCEWEN; SEEMAN, 1999). Entretanto, perante um estímulo estressor persistente ou quando há falha em desativar os recursos que promovem alostasia, os sistemas recrutados podem ter sua atividade sobrecarregada e sofrerem danos, culminando na chamada sobrecarga alostática (MCEWEN, 1998, 2003).

O hipocampo compreende um importante substrato neural envolvido nestas respostas, pois se configura como uma região altamente sensível às respostas elaboradas pelo eixo-HPA, principalmente em relação aos glicocorticoides que são liberados quando este eixo está ativado(JARRARD, 1995). Esta estrutura está inserida bilateralmente no lobo medial temporal e é parte de uma estrutura funcional maior denominada formação hipocampal, na qual incluem-se o Giro Denteado (GD) e o Subículo (AMARAL; WITTER, 1989). Ele é dividido três principais regiões: Cornu Ammonis (CA) 1, CA2 e CA3, compostas principalmente por neurônios piramidais(AMARAL; WITTER, 1989). O GD, por sua vez, apresenta três camadas principais: a molecular, composta pelos dendritos apicais das células granulares; a granular, formada pelos corpos celulares das células granulares; e o hílus, que apresenta principalmente células musgosas e projeções de células granulares(AMARAL; SCHARFMAN; LAVENEX, 2007).Utilizando a técnica de coloração de prata de Golgi, Santiago Ramón y Cajal observou que as fibras provenientes do córtex entorrinal formavam as principais aferências do GD por se conectarem aos dendritos das células granulares, na camada molecular. Nesta camada, os neurônios estabelecem conexões com fibras musgosas presentes no hílus e se projetam para células piramidais da região CA3, as quais são projetadas através dos colaterais de Schaeffer em direção à região CA1. Por fim, os neurônios(AMARAL; SCHARFMAN; LAVENEX, 2007; DENG; AIMONE; GAGE, 2010) presentes na região CA1, se conectam com o subículo e córtex entorrinal, completando uma circuitaria unilateral denominada circuito tri-sináptico.

Diversas evidências correlacionam a participação do hipocampo na elaboração de respostas aos estresse Estudos com animais lesionados na região do hipocampo indicaram que a perda de função desta região estava associada a um aumento nos níveis basais de glicocorticoides (GC) (FENDLER et al., 1961). Paralelamente a estes achados, as alterações comportamentais encontradas em animais expostos a situações de estresse, reforçam a ideia de que o hipocampo exerça papel central na modulação da resposta ao estresse (HERMAN et al., 1998). Deste modo,

as alterações endócrinas associadas ao estresse crônico, podem prejudicar o *feedback* negativo exercido pelo hipocampo sobre o eixo HPA (MIZOGUCHI et al., 2003), participando, em última instância da patofisiologia de transtornos do humor, como a MDD, o PTSD e os transtornos de ansiedade (JURUENA, 2014). Neste sentido, existe a hipótese de que a efetividade dos AD´s esteja associada à sua capacidade de normalização das funções do eixo HPA. Um estudo demonstrou, por exemplo, que o tratamento crônico com AD´s revertem as alterações endócrinas promovidas pela desregulação do eixo-HPA, normalizando suas consequências sobre estruturas límbicas, como PFC e núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), dentre outros (BARDEN, 2004).

Evidências indicam, ainda, que estas alterações endócrinas promovidas pelo eixo-HPA poderiam levar a uma série de eventos plásticos, que envolveriam remodelamentos ao longo do tempo (MCEWEN; GIANAROS, 2011). Estes eventos justificariam, por exemplo, as alterações na arborização dendrítica de neurônios piramidais do hipocampo encontradas em modelos animais de estresse (MCEWEN, 2002; VYAS, 2002), ou ainda a redução do volume hipocampal encontrados em transtornos de humor como MDD e PTSD (BREMMER, 1995; VIDEBECH, 2015). Dentre os eventos de plasticidade, a formação de novas células, ou neurogênese, se configura como um dos mais interessantes processos.

Até o presente momento, apenas duas regiões do SNC são reconhecidas como nichos neurogênicos, isto é, regiões onde há presença de células tronco neurais (do inglês: *Neural Stem Cells*, NSC´s) e progenitores dotados de multipotência que dão origem a neurônios novos: a zona subgranular (SGZ) do GD, e na zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais (CONOVER; NOTTI, 2008; KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1997; MING; SONG, 2005). Entretanto, algumas linhas de evidência indicam que possam existir outros nichos neurogênicos, como hipotálamo e amígdala (FOWLER; LIU; WANG, 2008). Embora o hipocampo seja alvo de diversos tipos de plasticidade, como remodelamento dendrítico, formação de novas sinapses ou enfraquecimento das mesmas (BARTSCH; WULFF, 2015), neste trabalho daremos enfoque principalmente à neurogênese hipocampal adulta, haja vista sua singularidade perante os outros eventos neuroplásticos.

1.2 A NEUROGÊNESE ADULTA

Desde os estudos do grande neurocientista Santiago Ramón y Cajal tinha-se o conceito do cérebro como um órgão estático e desprovido de capacidade de renovação ou de mudança. Em seu ensaio "Degeneração e regeneração do Sistema Nervoso Central" Cajal postulava que:

> "Mas a especialização funcional do cérebro impôs aos neurônios duas grandes lacunas; incapacidade proliferativa e irreversibilidade da diferenciação intraprotoplasmática. Por esse motivo, terminado o desenvolvimento, as fontes de crescimento e regeneração dos axônios e dendritos secam irrevogavelmente (...) nos centros adultos, os caminhos nervosos são algo fixo, terminado, imutável. Tudo pode morrer, nada pode ser regenerado. Cabe à ciência do futuro mudar, se possível, este severo decreto." (Ramón e Cajal, 1928).

Assim como uma profecia cumprida, de fato a ciência modificou o severo decreto. Contemporâneo à Ramón y Cajal, o neurocientista Ezra Allen reportou a ocorrência de figuras mitóticas na região dos ventrículos laterais de ratos albinos com idade superior a 4 meses de vida, indicando pela primeira vez a possibilidade de que o cérebro adulto poderia ser capaz de gerar novas células (ALLEN, 1912). Com o avanço das técnicas, Joseph Altman e Gopal Das foram pioneiros em demonstrar alterações anatômicas que indicavam a existência de novas células no cérebro adulto. Por meio da técnica de autorradiografia, Altman e Das (1965) observaram a existência de células positivamente marcadas com timidina H-3, um marcador que se acopla ao DNA durante a replicação do material genético de células em proliferação, no neocórtex e em células granulares hipocampais de ratos na idade de 1 a 8 meses de idade (ALTMAN; DAS, 1965). Fortalecendo os achados prévios, em 1977 Kaplan e Hinds também demonstraram a formação de novos neurônios em ratos adultos ao empregaram a técnica de micrografia eletrônica para análise da incorporação de timidina H3 em populações celulares contidas em regiões do encéfalo como Bulbo Olfatório (BO) e no GD (KAPLAN; HINDS, 1977).

Complementando os achados, em 1984 Paton e Notebohm demonstraram, utilizando a mesma técnica de timidina H3, que os novos neurônios eram capazes de se integrar à rede neural pré-existente em canários adultos (PATON; NOTTEBOHM, 1984). Além disso, Cameron e colaboradores conseguiram determinar a posição dos novos neurônios no giro denteado do hipocampo, sugerindo então que as células recém-formadas tinham a curiosa capacidade de migrar através da camada granular do GD durante o seu desenvolvimento (CAMERON et al., 1993). Por fim, a descoberta da neurogênese adulta em primatas (GOULD et al., 1998) e até mesmo em humanos (ERIKSSON et al., 1998) foram determinantes para que a neurogênese hipocampal adulta fosse aceita como um evento importante e evolutivamente conservado no cérebro adulto (KEMPERMANN, 2015). Em conjunto, estes estudos possibilitaram que a capacidade plástica e dinâmica do SNC fosse comtemplada, abrindo novas possibilidades de se explicarem eventos observados no cérebro e mudando para sempre os rumos da neurociência.

O entendimento atual que se tem sobre a neurogênese é de que ela não pode ser descrita simplesmente como um evento isolado, mas sim como conjunto de processos altamente complexos e dinâmicos (CONOVER; NOTTI, 2008; GAGE et al., 1998; KEMPERMANN; SONG; GAGE, 2015). Usualmente, divide-se os processos neurogênicos em quatro etapas principais, sendo elas a) Proliferação das células precursoras; b) Sobrevivência inicial e migração; c) Maturação pós-mitótica; e d) Sobrevivência tardia (KEMPERMANN; SONG; GAGE, 2015). Na SGZ, as células precursoras com propriedades gliais, tipo 1, podem se dividir de maneira simétrica, gerando duas células filhas idênticas, responsáveis pela manutenção do potencial neurogênico. Elas ainda podem se dividir de maneira assimétrica, originando uma célula filha idêntica à matriz e um progenitor amplificado transitório, tipo 2a. Após esta fase proliferativa, as células podem migrar através da camada granular do hipocampo, por onde se diferenciam em células comprometidas com fenótipos neuroniais, tipos 2a/b (KEMPERMANN; SONG; GAGE, 2015). Estas últimas originam células tipo 3, conhecidas como neuroblastos, com alta capacidade de migração e que marcam a transição entre um estado proliferativo e um pós-mitótico Ao longo de todo o processo muitas células morrem, no entanto, as que conseguem se maturar até um estágio de neurônio imaturo podem estabelecer conexões funcionais por meio de crescimento de axônios e dendritos e formação de sinapses, completando a integração à rede sinaptica pré- existente, onde são diferenciadas em células granulares glutamatérgicas (KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1997; KEMPERMANN; SONG; GAGE, 2015).

É interessante notar que, apesar de a neurogênese ser explicada em etapas, esta divisão é meramente didática, uma vez que fisiologicamente as células formam grupos heterogêneos, que fazem com que o estudo destes processos seja altamente complexo. Entre os ensaios de Altman e a atualidade, muitas técnicas foram sendo aprimoradas, como é o caso das imunomarcações e da microscopia, e facilitaram o estudo dos processos neurogênicos. Uma estratégia utilizada para se ter um indício do estágio da neurogênese em que a célula se encontra é o mapeamento da expressão de marcadores neurais em populações celulares distintas. Por exemplo, na transição de células tipo 2a para 2b, perde-se a expressão de GFAP e permanece a expressão de Sox2, desta forma, uma dupla marcação GFAP/Sox2 pode ser utilizada para diferenciação entre células progenitoras e precursoras amplificadas. Após a fase proliferativa, as células se diferenciam e caso sobrevivam, expressam *doublecortin* (DCX), proteína associada à microtúbulos que é expressa somente na linhagem com comprometimento neuronal e cujo papel se relaciona ao processo de migração e de iniciação da diferenciação neuronal, caracterizando a transição entre células tipo 2 e 3 (KEMPERMANN; SONG; GAGE, 2015) . Visando detectar células que se encontram em um período mais avançado, é possível detectar células granulares imaturas por meio da tripla marcação com 5-Bromo-2’-deoxiuridina (BrdU), uma molécula sintética análoga da timidina capaz de se incorporar ao material genético durante a fase S da replicação celular, NeuN, proteína expressa por neurônios maduros e Calretinina, uma proteína ligante de cálcio que marca o início da fase pós-mitótica. Já para a identificação de células granulares maduras, pode-se realizar a tripla marcação para BrdU, NeuN e Calbindina, proteína ligante de cálcio expressa após completa integração estrutural da célula (KEMPERMANN; SONG; GAGE, 2015). Um breve resumo dos processos celulares envolvidos em cada uma das fases da neurogênese com seus respectivos marcadores pode ser encontrado na Figura 1.

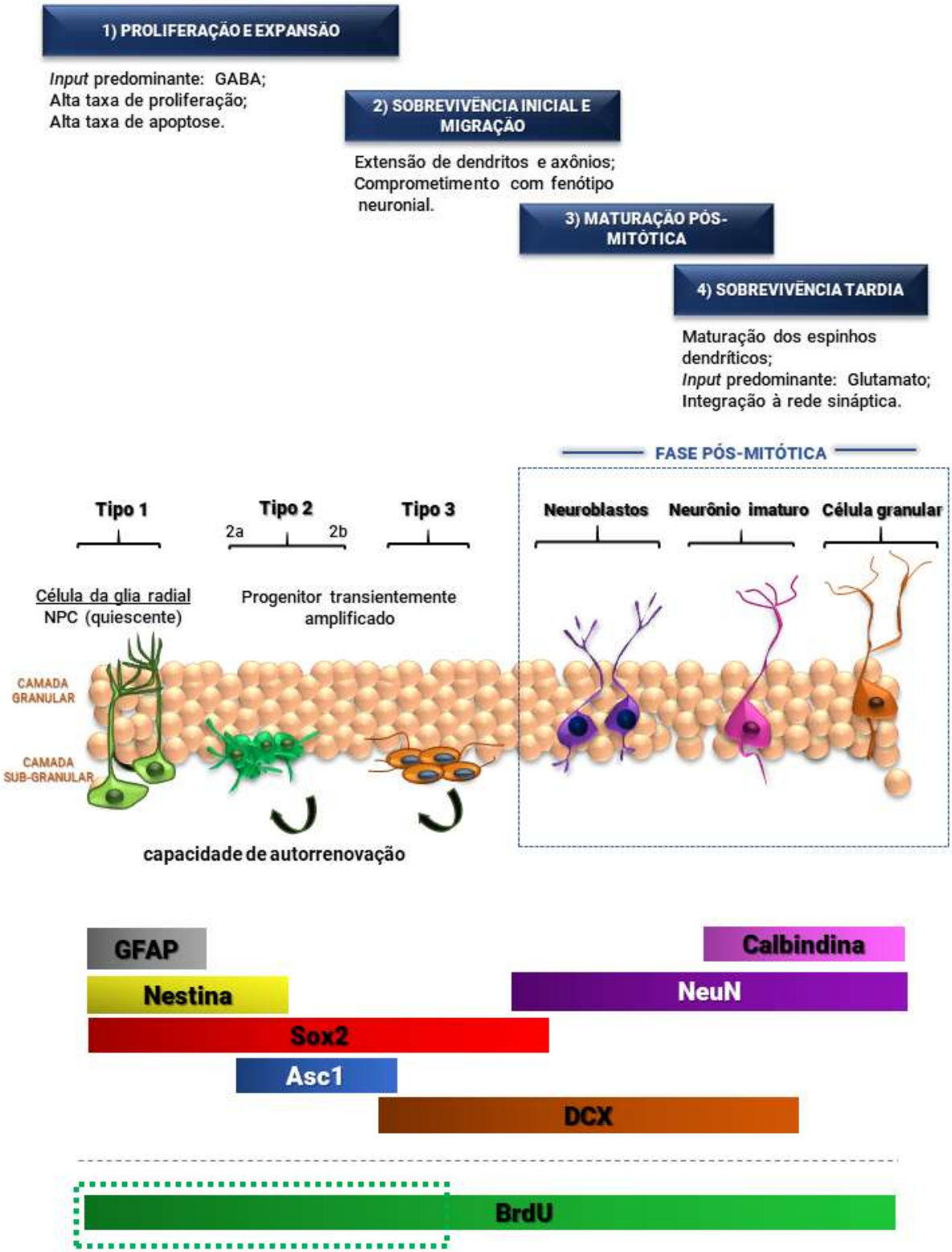


Figura 1: Representação esquemática das etapas da neurogênese hipocampal adulta, ressaltando suas fases de desenvolvimento, os tipos celulares de cada etapa e alguns exemplos de seus respectivos e

marcadores. Para diferenciar dos marcadores endógenos, representamos o BrdU sob a linha tracejada em cinza. Esta ferramenta de estudo pode ser identificada em todas as etapas de neurogênese, entretanto, sua incorporação ao material genético celular só ocorre durante a fase S da mitose. Sendo assim, representamos os tipos celulares capazes de incorporar BrdU em um retângulo pontilhado em verde. Modificado de *(BOLDRINI et al., 2018; KEMPERMANN; SONG; GAGE, 2015; VADODARIA; GAGE, 2014)*.

Além da presença das NSC´s, os nichos neurogênicos compõem um microambiente favorável à ocorrência da neurogênese, uma vez que compreendem uma matriz extracelular formada a partir de uma gama complexa de populações celulares como astrócitos, micróglias e células endoteliais. Esta complexa rede facilita a ocorrência de contatos específicos entre diferentes tipos celulares que modulam o balanço celular entre quiescência versus proliferação e entre diferenciação em neurônios versus células da glia. Além disso, a rede é responsável por promover condições energéticas adequadas para a ocorrência dos eventos neurogênicos (CONOVER; NOTTI, 2008; KEMPERMANN, 2011).

Embora os eventos neurogênicos que ocorrem na região da SVZ sejam similarmente interessantes, é no hipocampo que encontramos as correlações mais bem elucidadas com relação à patofisiologia dos transtornos psiquiátricos e à resposta aos AD´s, desta maneira, neste estudo nosso foco principal será a neurogênese hipocampal adulta, sendo referida a partir de então apenas como neurogênese.

1.3 PAPEL DA NEUROGÊNESE NA RESPOSTA AO ESTRESSE E NA PATOFISIOLOGIA DE TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS

Os trabalhos desenvolvidos por Gould e colaboradores foram pioneiros em associar a possível relação entre os hormônios esteroidais, estresse e a neurogênese. Inicialmente, foi observado que a administração sistêmica de glicocorticoides era capaz de reduzir o número de células granulares precursoras no GD ratos adultos (GOULD et al., 1992). Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que a exposição de um primata não humano adulto a outro animal intruso, considerado um agente estressor, promovia a redução da proliferação de células granulares no hipocampo destes animais (GOULD et al., 1998).

A descoberta da ocorrência de neurogênese em humanos (ERIKSSON et al., 1998) juntamente aos estudos clínicos, que evidenciavam uma redução no volume hipocampal de pacientes com depressão, e aos estudos pré-clínicos que indicavam facilitação da neurogênese após tratamento com AD´s (ENCINAS; VAAHTOKARI; ENIKOLOPOV, 2006; KEMPERMANN; KRONENBERG, 2003) embasou a teoria de que déficits neurogênicos poderiam estar relacionados a transtornos psiquiátricos, especialmente a MDD. Estudos mais

recentes demonstraram em humanos uma redução tanto no número de células granulares do GD, quanto uma redução no volume da SGZ em pacientes com depressão não medicados. Além disso, nos pacientes depressivos medicados havia aumento do número de células granulares e do volume da SGZ em relação aos pacientes não medicados (BOLDRINI et al., 2009, 2014).

Em situações de estresse prolongado, o remodelamento hipocampal acarreta consequências na regulação do eixo-HPA por reduzir a capacidade de encerramento da resposta alostática (JURUENA, 2014; MCEWEN, 2007). Neste sentido, a neurogênese seria necessária para gerenciar a resposta endócrina, por meio da regulação da resposta do hipocampo ao eixo-HPA, frente ao estresse e, assim, regular comportamentos emocionais, de aprendizado e memória no sentido de gerenciar e reduzir comportamentos que podem ser correlacionados à depressão em seres humanos (SNYDER et al., 2011). Em última instância, o estresse crônico não remediado poderia prejudicar o recrutamento neurogênico, culminando no prejuízo de uma série de fatores cognitivos (como por exemplo, prejuízos na performance de memórias declarativas, episódicas e espaciais) e comportamentais, que estariam envolvidos na patofisiologia de doenças neurodegenerativas e de transtornos mentais, como doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP), MDD, TAG, dentre outros (JURUENA, 2014; SNYDER et al., 2011).

É possível simular experimentalmente modelos de estresse que recapitulam os efeitos do estresse em diversos aspectos, inclusive seus efeitos sobre eventos fisiológicos, comportamentais e neuroplásticos. Um interessante modelo se constitui por possuir múltiplas características não debilitantes, porém inescapáveis e incontroláveis de estresse físico, psicológico e circadiano durantes algumas semanas, (daí seu nome Estresse crônico imprevisível- no inglês: *Chronic Unpredictable Stress*, CUS) capazes de evocar efeitos comportamentais e alterações fisiológicas comparáveis a sintomas de depressão observados na clínica, fator que embasa a validade de face do modelo (WILLNER, 2005). Por sua imprevisibilidade, o CUS evita a habituação do animal e o expõe à constante situação de demanda física e psicológica, a qual pode alterar sistemas neurais relacionados à manutenção da resposta ao estresse (WILLNER, 2005, 2017), de modo que os fenótipos comportamentais e moleculares induzidos por este modelo poderiam ser mais robustos em comparação aos modelos agudos ou àqueles cuja exposição ocorre a apenas um tipo de estressor, ditos estresses homotípicos. Além disso, o CUS apresenta validade etiológica e de constructo (WILLNER, 2005), bem como validade preditiva, uma vez que os efeitos

comportamentais e neuroplásticos evocados pelo CUS podem ser prevenidos pelo tratamento crônico com fármacos antidepressivos (CAMPOS et al., 2013; WILLNER, 2005)

1.4 NEUROGÊNESE E RESPOSTA AOS AD´S

No sentido contrário aos efeitos comportamentais estresse, o estudo de Hill e colaboradores demonstrou que o mero aumento da taxa neurogênica, estimulada pela deleção genética do gene BAX em camundongos, evoca comportamentos do tipo ansiolítico em camundongos estressados (HILL; SAHAY; HEN, 2015). Neste sentido, destaca-se o fato de que, paralelamente ao seus efeitos comportamentais, fármacos antidepressivos possuem papel facilitador sobre a neurogênese adulta (ENCINAS; VAAHTOKARI; ENIKOLOPOV, 2006). Os trabalhos de Mallberg e colaboradores (2000) foram os primeiros a demonstrar que apenas o tratamento crônico com Fluoxetina, um ISRS, aumentou significativamente a proliferação no GD de ratos adultos, denotado pelo aumento de células positivamente marcadas com BrdU. Neste estudo, é relevante destacar que a latência para que os antidepressivos exercessem ação pró-neurogênica era condizente com o tempo necessário para o início de seus efeitos terapêuticos, como evidenciado pelo estudo apenas em relação ao tratamento crônico, mas não no agudo. Sendo assim, o estudo estabeleceu a possibilidade de que o efeito dos AD´s fosse dependente da ocorrência de processos neuroplásticos (MALBERG et al., 2000).

Corroborando os achados de Malberg, em 2003, Santarelli e colaboradores observaram que após depletar os progenitores neurais no nicho neurogênico do GD por meio de irradiação com raios-X o efeito tipo ansiolítico observado após o tratamento com fluoxetina, um Inibidor Seletivo da Recaptação da Serotonina (ISRS), ou com imipramina, da classe dos tricíclicos, era abolido (SANTARELLI et al., 2003). Jayatissa e colaboradores (2006) demonstraram que a administração crônica de escitalopram, um ISRS, durante quatro semanas foi capaz de atenuar a anedonia induzida pelo modelo de estresse crônico variável, bem como foi capaz de prevenir a redução de proliferação celular no GD de ratos adultos (JAYATISSA et al., 2006). Em um estudo mais refinado, David e colaboradores replicaram os achados comportamentais de Santarelli e, além disso, demonstraram que apenas nos animais estressados o tratamento com Fluoxetina era capaz de aumentar a proliferação, migração e maturação celular. Portanto, este estudo demonstrou que, perante o estresse, o tratamento crônico com AD´s poderia recrutar mecanismos

neurogênicos visando prevenir os efeitos deletérios do estresse (DAVID et al., 2009). Ainda utilizando ADs da classe dos ISRS, Surget e colaboradores demonstraram em camundongos machos, que o tratamento com fluoxetina e imipramina administradas durante 5 semanas era capaz de atenuar os efeitos tipo-depressivo e tipo ansiogênico promovidos pelo CUS, como observado nos testes comportamentais de *Splash-test* (ST) e Novelty Supressed Feeding (NSF), respectivamente (SURGET et al., 2008). Paralelamente a estes efeitos comportamentais, em outro estudo do mesmo grupo, foi demonstrado, utilizando o mesmo modelo, aumento no número de células positivamente marcadas com BrdU, indicando um efeito proliferativo da fluoxetina perante o estresse (SURGET et al., 2011).

Deve-se considerar que, além da modulação pelo estresse e pelos AD´s, a neurogênese é alvo de inúmeras outras fontes de modulação, como o exercício físico voluntário, o estado nutricional do indivíduo, o envelhecimento, dentre outros (BARTSCH; WULFF, 2015; KEMPERMANN, 2011). Nas últimas décadas houve crescente interesse em estudar a modulação exercida pelo Sistema endocanabinoide (ECS) sobre os parâmetros fisiológicos que modulam a neuroplasticidade.

1.5 SISTEMA ENDOCANABINOIDE E RESPOSTA AOS AD´S

A partir das pesquisas que buscavam elucidar os mecanismos pelos quais a *Cannabis sativa* promovia seus efeitos no SNC, foi possível acumular evidências que indicavam a existência de um novo sistema de neurotransmissão. No início dos anos 60, Mechoulam e colaboradores isolaram as estruturas químicas de mais de 60 compostos presentes na *Cannabis*, incluindo o THC (Δ9-tetrahidrocanabinol), principal composto psicotomimético da planta, chamados, por consequência, de canabinóides (MECHOULAM; GAONI, 1965). Posteriormente, foi demonstrado que os efeitos dos chamados canabinoides eram mediados por sua interação com possíveis receptores acoplados à uma proteína G que inibia a atividade da adenilato ciclase (proteína Gi/0) (HOWLETT; FLEMING, 1984). Com o avanço das técnicas, foi possível clonar o DNA genômico e identificar a estrutura do que conhecemos atualmente como receptor canabinóide do tipo 1, ou CB_1 (MATSUDA et al., 1990). Três anos depois, descobriu-se um segundo receptor canabinóide, CB_2, descrito pelos autores na época, como presente apenas na periferia (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). Paralelamente à descoberta de CB_1 e CB_2,

os primeiros ligantes endógenos, derivados dos fosfolipídios de membrana denominados endocanabinóides (eCB), começaram a ser descritos, sendo dois principais: a araquidonoil etanolamida, ou anandamida (AEA), agonista parcial de CB_1 e de CB_2, e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), agonista pleno destes receptores (DEVANE et al., 1992). Anos mais tarde, foram descobertas as enzimas N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipase (D-NAPE-PLD) e as isoformas α e β da diacilglicerol (DAGL), responsáveis pela síntese de AEA e 2-AG, respectivamente, e as enzimas amido hidrolase de ácido graxo (FAAH) e monoacilglicerol lipase (MAGL), principais enzimas que hidrolisam e encerram as ações da AEA e 2-AG, respectivamente (BASAVARAJAPPA, 2007; BASAVARAJAPPA et al., 2003).

No decorrer dos estudos sobre o novo sistema descoberto, os cientistas da época eram cada vez mais instigados por tal nova sinalização, uma vez que ela parecia não se comportar da maneira clássica conhecida à época. Um estudo demonstrou que a ativação de receptores CB_1 expressos no hipocampo reduzia a liberação de GABA (WILSON; NICOLL, 2001), em seguida foi demonstrado que o mesmo controle via CB_1 ocorria com neurônios serotoninérgicos e dopaminérgicos (LAU; SCHLOSS, 2008) e, por fim, glutamatérgicos (TAKAHASHI; CASTILLO, 2006). Atualmente é bem aceito que a sinalização canabinóide se comporta como um sistema de neuromodulação que é ativado “sob demanda” por enzimas específicas e que regula a liberação de outros neurotransmissores. Os receptores CB_1 estão distribuídos nos terminais pré-sinápticos de todo o SNC, nos quais os eCBs podem atuar como mensageiros retrógrados. Estes receptores são membros da família das GPCR, ligados à proteína G_i/G_0, que quando ativados, inibem a enzima adenilil ciclase e reduzem a probabilidade de abertura dos canas de Cálcio sensíveis à voltagem, levando à diminuição da probabilidade de liberação de neurotransmissores (GABA, glutamato, noradrenalina etc.), (KREITZER; REGEHR, 2001; MACKIE et al., 1995). Além disso, estes receptores são expressos nas NPC´s, potencialmente regulando os processos neurogênicos (MOLINA-HOLGADO et al., 2007). Com relação aos receptores CB_2, sua expressão foi observada em células microgliais (NÚÑEZ et al., 2004), modulando seu fenótipo de polarização para o tipo pró-resolutivo, tipo M2 (ASO; FERRER, 2016; MECHA et al., 2013; NÚÑEZ et al., 2004). No entanto, a expressão neuronial de CB_2 ainda é fonte de acirrados debates (BRUSCO et al., 2008; LI; KIM, 2015). Estudos mostram que, além de CB_1, as NSC´s e as NPC´s expressam receptores CB_2 também (MOLINA-HOLGADO et al., 2007). Estes receptores podem estar envolvidos na regulação da neurogênese, uma vez que

estudos *in vivo* e *in vitro* reportam aumento da proliferação células após estímulo das células com o agonista CB_2, HU308 (DOWNER, 2014; PALAZUELOS et al., 2006; PRENDERVILLE; KELLY; DOWNER, 2015).

Além de serem agonistas de CB_1 e CB_2, alguns eCBs interagem com outros tipos de receptores. Estudos recentes sinalizam a existência de um importante comunicação entre o ECS e o sistema endovaniloide, caracterizado principalmente devido ao fato de que AEA aparenta ser um agonista pleno do receptor $TRPV_1$ (TÓTH et al, 2009). Este receptor ionotrópico é considerado importante na modulação da nocicepção, mediada por meio estímulos como dor, calor, baixo pH e lipídios endógenos (ABDELHAMID et al, 2014). Recentemente, sua participação na modulação de comportamentos emocionais vem sendo descoberta, de modo que, curiosamente, sua ativação aparenta evocar efeitos opostos àqueles observados durante ativação de CB_1. Foi demonstrado que o pré-tratamento com capsazepina, agonista $TRPV_1$ na substância cinzenta periaquedutal (do inglês: *Periaqueductal Gray*, PAG) é capaz de evocar comportamentos do tipo ansiolítico em ratos tratados com altas doses inefetivas de Canabidiol (CBD) e de outros canabinoides, indicando que a ativação de $TRPV_1$ poderia estar envolvida nas resposta em U invertido apresentadas pelos canabinoides (CAMPOS; GUIMARÃES, 2009).

A função fisiológica dos eCBs permanece sob investigação, mas várias linhas de evidência sugerem sua íntima relação com transtornos neuropsiquiátricos, como a MDD, a esquizofrenia e os transtornos de ansiedade (ASO; FERRER, 2016; HILLARD; WEINLANDER; STUHR, 2012; VALLÉE et al., 2017). Um dos principais indícios da relação entre o ECB e tais transtornos é proveniente de observações clínicas. Foi observado que uma parcela (25%) de pacientes em tratamento com o Rimonabant, um agonista inverso de CB_1 disponibilizado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de obesidade e distúrbios metabólicos associados, bem como para o tratamento de adicção em tabaco, apresentavam sintomas ansiosos e depressivos, altamente associados à ideação suicida. Os riscos associados aos efeitos adversos do Rimonabant se mostraram tão alarmantes que culminaram na retirada do fármaco da prática médica (CHRISTENSEN et al., 2007; MOREIRA; CRIPPA, 2009).

Estudos pré-clínicos indicam que eventos estressores evocam alterações na sinalização do ECS, aumentando a suscetibilidade e influenciando o aparecimento de transtornos psiquiátricos (HILLARD, 2014; HILL et al., 2006; MORENA et al., 2016). Diversas linhas de evidência sugerem que os eCBs reduzem a ativação do eixo-HPA, facilitando o retorno à situação

homeostática perante o estresse (ARÉVALO; DE MIGUEL; HERNÁNDEZ-TRISTÁN, 2001; PAGOTTO et al., 2001; PATEL et al., 2004). No entanto, fatores como a intensidade, a duração e o tipo do estressor parecem modular as consequências observadas em relação ao ECS (CAMPOS et al., 2010; HILL et al., 2010). Neste sentido, é observado que o estresse crônico induz alterações comportamentais e neuroquímicas em roedores que podem ser correlacionados aos achados na depressão humana; alguns exemplos disso seriam: a redução nos níveis de AEA e 2-AG, bem como redução na expressão dos receptores CB_1 e CB_2 (GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2010; GORZALKA; HILL; HILLARD, 2008; MORENA et al., 2016; SCHLOSBURG et al., 2010).

Durante situações de estresse, que levariam a transtornos psiquiátricos, ocorrem desbalanços na sinalização canabinóide, portanto, seria lógico imaginar que o tratamento com AD´s é capaz de prevenir ou reverter este quadro. Ratos tratados cronicamente com desipramina, da classe dos tricíclicos, apresentaram aumento do *binding* de [3H] CP55,940 ao receptor CB_1 no hipocampo e no hipotálamo. Além disso, nos animais estressados o tratamento foi capaz de reduzir a ativação de células c-fos no PVN destes animais, no entanto, ao receberem pré-tramento com AM251 este efeito do antidepressivo se perdeu (HILL et al., 2006). Em estudo de Smaga e colaboradores, o tratamento crônico com imipramina (tricíclico), escitalopram (ISRS) e tianeptina (agonista mi-opioide) foi capaz de aumetar os níveis de AEA e 2-AG em regiões como PFC, hipocampo e estriado dorsal de ratos (SMAGA et al., 2014)

Considerando que as repostas aos AD´s são moduladas pelas vias de neurotransmissão monoaminérgica, principalmente serotoninérgica e canabinóide, é relevante destacar que estes sistemas apresentam uma complexa relação de modulação interdependente. O Estudo de Lazary e colaboradores (2009) indicou que indivíduos portadores do genótipo ‘GG’ na região promotora do gene do receptor CB_1 juntamente à homozigose ‘SS’ na região promotora da proteína transportadora de 5-HT apresentam risco 4,6 vezes maior de desenvolver ansiedade e MDD (LAZARY et al., 2009). Mato e colaboradores (2010) sugeriram que o tratamento crônico com Fluoxetina é capaz de aumentar o acoplamento de CB_1 à subunidades de proteína Gα1, facilitando sua sinalização, de maneira dependente do receptor $5\text{-}HT_{1A}$, já que a administração de WAY100635, antagonista $5\text{-}HT_{1A}$, atenuava os efeitos da fluoxetina sobre CB_1 (MATO et al., 2010). Além disso, foi demonstrado que o tratamento com WIN55,212-2, agonista CB1, é capaz de induzir aumento da atividade de neurônios serotoninérgicos no córtex pré-frontal medial

(mPFC) associado a comportamento tipo antidepressivo, avaliado pelo teste de Nado Forçado. No entanto, os efeitos da ativação do receptor CB_1 são abolidas após realização de lesões no mPFC, demonstrando que o efeito antidepressivo da atividade de CB_1 depende da integridade da sinalização serotoninérgica no PFC (BAMBICO et al., 2007).

Algumas linhas de evidência sugerem que a elaboração de respostas aos AD's via modulação do ECS seja resultado do recrutamento de mecanismos neuroplásticos promovidos por esta sinalização. Nos últimos anos, diversas linhas de evidência veem demonstrando o envolvimento da sinalização canabinóide na regulação da neurogênese no cérebro adulto durante situações fisiológicas ou patológicas.

1.6 SISTEMA ENDOCANABINOIDE E NEUROGÊNESE ADULTA

Um dos estudos mais interessantes acerca modulação da neurogênese mediada pela sinalização canabinoide foi conduzido pelo grupo de Hill e colaboradores, o qual demonstrou que o efeito do exercício físico voluntário em facilitar a proliferação das NSC´s depende da ativação do ECS e do aumento dos níveis de AEA, uma vez que o pré-tratamento com AM251 inibia este efeito pró-neurogênico do exercício (HILL et al 2010). Fortalecendo esta relação, foi observado que camundongos *Knockout* (KO) para o receptor CB_1 (CB1-/-) apresentam cerca de 50% de redução na marcação para células BrdU (JIN et al 2004). Curiosamente, estes camundongos KO apresentam maior susceptibilidade a comportamento do tipo depressivo, no teste do nado forçado, após passarem por protocolo de estrese crônico, mas não no protocolo agudo (FRIDE et al 2005). No mesmo sentido, o tratamento crônico com Rimonabant resultou em redução das células positivamente marcadas para DCX, acompanhado de uma perda de efeito tipo antidepressivo observado no tratamento agudo com a droga (LEE et al 2009). Além disso, camundongos KO para DAGL, enzima que sintetiza 2-AG, apresentavam menor número de células positvamente marcadas para Ki67 e DCX, indicando que esta sinalização canabinoide é necessária para a ocorrência de neurogênese (GAO et al 2010). Em outro estudo foi demonstrado que, além de neurogênese prejudicada, estes animais KO apresentavam mais comportamentos do tipo ansiogênico em relação aos *wide-type* (JENNICHES et al, 2016). Campos e colaboradores (2013) demonstraram que os efeitos ansiolíticos do tratamento crônico com Canabidiol (CBD), cuja regulação sobre o ECS reside principalmente na inibição da FAAH e resulta na elevação dos

níveis de AEA, dependem de uma neurogênese hipocampal preservada, uma vez que a ablação genética de progenitores neurais na SVZ impedia o efeito tipo ansiolítico do CBD. De maneira interessante, nos animais estressados e tratados com AM251 os efeitos do CBD foram abolidos, demonstrando, portanto, a participação do receptor CB_1 da modulação dos efeitos ansiolíticos do CBD (CAMPOS et al., 2013)

Por ser um sistema de neuromodulação, o ECS poderia ser relevante na elaboração de respostas durante situações de estresse. Neste sentido, utilizando o modelo CUS, o grupo de Zhang e colaboradores sugeriu que a inibição da MAGL, pelo tratamento crônico com JZL184, foi capaz de prevenir o comportamento tipo ansioso gerado pelo estresse e avaliado no teste de NSF, bem como foi capaz de reverter o prejuízo sobre a proliferação da SGZ, como observado pelo aumento da marcação para BrdU e DCX nos animais estressados e tratados (ZHANG et al 2015). Dentro deste contexto, um estudo não publicado de nosso laboratório demonstrou que, após protocolo de CUS, os tratamento com escitalopram, um ISRS, foi capaz de evocar comportamento tipo antidepressivo, no teste de *Tail suspension*, e de aumentar o número de células positivamente marcadas para BrdU, no entanto, ao receberem pré-tratamento com AM251, estes efeitos eram perdidos, demonstrando, portanto, que os efeitos do escitalopram, nesse contexto são dependentes da ativação do receptor CB_1 (AGUIAR et al.; em preparação). Estes promissores resultados abrem uma série de outras questões, como por exemplo, se este mecanismo dependente de CB_1 é comum a outros AD´s.

1.7 VENLAFAXINA: UM FÁRMACO PROMISSOR E CONTRADITÓRIO

Dentre os AD´s, a Venlafaxina (VFX) se constitui como um interessante e potente fármaco antidepressivo, seu uso é aprovado pelo FDA para quatro principais indicações: MDD, TAG, fobia social e transtorno do pânico (SANSONE, 2014; HOJEŃSKA, SUWAŁA; MACHOWSKA; WIELA-HOJEŃSKA, 2019). A VFX apresenta um perfil sequencial de inibição das monoaminas, de modo que doses de até 75mg inibem principalmente a recaptação da serotonina (5-HT), doses acima de 100mg passam a agir sobre a recaptação de noradrenalina (NA) e doses acima de 225mg são capazes de inibir a recaptação da dopamina também (HARVEY; RUDOLPH; PRESKORN, 2000) (SHANG et al., 2007). VFX é administrada como uma mistura racêmica de seus enantiômeros (R) e (S), ambos apresentando atividade

farmacológica (OTTON et al., 1996) e suas características farmacocinéticas fornecem um perfil permissivo à ampla associação com outros medicamentos, principalmente por apresentar pouca ligação às proteínas plasmáticas e por apresentar ação pouco significativa sobre as isoenzimas hepáticas do sistema P450 (OTTON et al., 1996).

Este fármaco apresenta curva de efeito ascendente, inconsistente com um mecanismo de ação único e saturável, sendo que início de seus efeitos terapêuticos ocorre de maneira mais rápida quando administrado em doses elevadas, >200mg/dia. No entanto estas elevadas doses estão associadas a desconfortáveis efeitos adversos, uma vez que a VFX modula o sistema noradrenérgico, levando a sintomas como náuseas, sudorese, taquicardia, entre outros (RUDOLPH et al., 1998). Em uma recente e ampla meta-análise utilizando 522 ensaios e comparando 21 AD´s, Cipriani e colaboradores identificaram que a VFX, juntamente à agomelatina, amitriptilina, escitalopram, mirtazapina e paroxetina, foram os fármacos clinicamente mais eficazes em comparação com Fluoxetina, Fluvoxamina e Reboxetina, por exemplo, com a razão de probabilidade (do inglês *Odd´s Ratio,* OD) de remissão dos sintomas variando entre 1:19–1:96 (CIPRIANI et al., 2018). Em um ranking de prescrições medicas nos Estados Unidos da América no ano de 2017, a VFX se posicionava entre os medicamentos mais prescritos como o 6º, entre a lista dos AD´s, e o 48º na lista geral (GUERRA, 2017)

Além de clinicamente muito promissora, a VFX também se apresenta como uma importante ferramenta de estudo para o mecanismo de ação dos AD´s, uma vez que modula a neurotransmissão monoaminérgica e orquestra seus efeitos antidepressivos de maneira complexa, como pode ser observado em estudos pré-clínicos. Em um modelo de CUS, o tratamento crônico com VFX foi capaz de prevenir a anedonia induzida pelo estresse nos ratos (MENDEZ-DAVID et al., 2017). Utilizando o mesmo modelo de estresse, foi demonstrado que a VFX também é capaz de evocar comportamento tipo ansiolítico, como avaliado pelo teste de Campo Aberto, e que é capaz de prevenir a redução das células DCX+ no hipocampo de ratas estressadas (BELOVICOVA et al., 2017) .

Considerando a problemática de que a classe dos ADs ainda apresenta muitas limitações, torna-se essencial que sejam entendidos mecanismo de ação paralelos aos monoaminérgicos, principalmente os mecanismos neuroplásticos regulados pela sinalização canabinoide. Nesse sentido, os estudos prévios de nosso laboratório sugerem que os efeitos tipo antidepressivo e próneurogênico do ESC dependem da ativação do receptor CB_1. Dentro deste contexto, a VFX se

constitui, não apenas como um importante fármaco na clínica, mas também como uma interessante ferramenta de estudo, uma vez que sua modulação ampla sobre a neurotransmissão monoaminérgica permite a comparação com fármacos com mecanismos seletivos, como o ESC. Sendo assim, no presente estudo, testamos a hipótese de que os efeitos comportamentais e pró-neurogênicos evocados pelo tratamento crônico com VFX são dependentes da ativação dos receptores CB_1.

2 OBJETIVOS

Investigar se os efeitos comportamentais e pró-neurogênicos da VFX são dependentes da ativação do receptor CB_1.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar, por meio de uma curva dose-resposta, a dose de VFX com efeito tipo ansiolítico e tipo antidepressivo;
- Avaliar se as doses de VFX são capazes de modular proteínas do ECS no hipocampo;
- Avaliar se o antagonismo de CB_1 pelo tratamento crônico com AM251 é capaz de impedir os efeitos tipo ansiolítico e tipo antidepressivo da VFX;
- Investigar se o antagonismo de CB_1 pelo tratamento crônico com AM251 é capaz de impedir a modulação de proteínas do ECS no hipocampo dos camundongos pela VFX;
- Investigar se VFX possui efeito proliferativo na SGZ e se o pré-tratamento com AM251 é capaz de abolir este efeito;
- Investigar se VFX possui efeito sobre células *doublecortin* presentes na SGZ e se o pré-tratamento com AM251 é capaz de abolir este efeito.

METODOLOGIA

3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram divididos de acordo com o tratamento recebido e grupos independentes de animais foram submetidos aos seguintes experimentos:

3.1 Experimento I:

Os animais foram submetidos a um protocolo de CUS durante 21 dias, recebendo concomitante tratamento com VFX nas doses de 10, 20 ou 40mg/Kg para estabelecimento de uma curva dose-resposta. No 19º dia de CUS, os animais foram testados quanto ao comportamento do tipo depressivo, no ST, e ao fim do protocolo de CUS foram testados quanto aos comportamentos do tipo ansioso, no NSF. Após o teste, os encéfalos foram dissecados para posterior avaliação da modulação de proteínas do ECS no hipocampo destes animais por meio da técnica de western-blotting. A figura 2 esquematiza este delineamento:

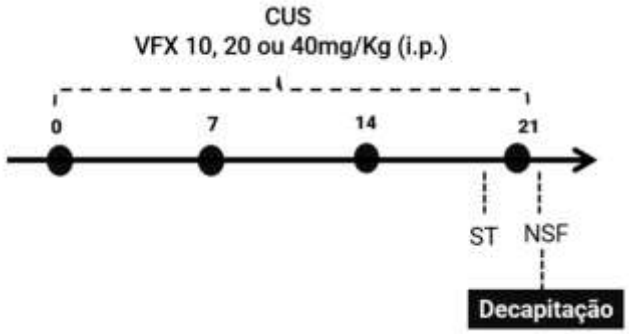


Figura 2: Delineamento experimental do experimento I, mostrando o esquema de estresse e tratamento, seguido dos testes comportamentais realizados.

3.2 Experimento II

Apresentado no Apêndice 1 do texto.

3.3 Experimento III:

Nesta série experimental foram utilizados animais provenientes do CEMIB/UNICAMP que fram submetidos a um protocolo de CUS por 21 dias e tratados intraperitonealmente com AM251 na

dose de 0,3mg/Kg e/ou VFX na dose de 20mg/Kg e/ou salina. Em seguida os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilasina, decapitados e, após remoção do encéfalo, o hipocampo foi dissecado. Um outro grupo de animais foi submetido à perfusão transcardíaca para futura imunohistoquímica e imunofluorescência. A figura 3 esquematiza este delineamento. A figura 3 indica um esquema deste experimento:

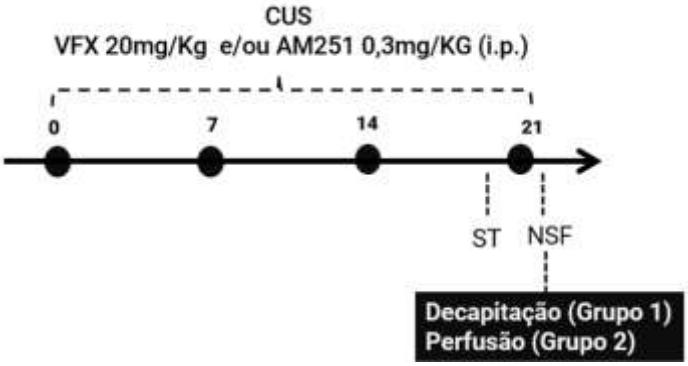


Figura 3: Delineamento experimental dos experimentos II e III, mostrando o esquema de estresse e tratamento, seguido dos testes comportamentais realizados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os experimentos I e II foram conduzidos com camundongos machos selvagens C57BL/6, originados do biotério central da Universidade de São Paulo (USP)/ Campus de Ribeirão Preto/SP. Já animais do experimento III, os camundongos foram obtidos através do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Nos três protocolos experimentais os animais foram recebidos com aproximadamente 6 semanas e utilizados no início do protocolo experimental com idade aproximada de 8-10 semanas. Após a chegada, os camundongos foram alocados aleatoriamente em caixas de acrílico (30*x* 20*x* 13 cm) com quatro ou cinco animais por caixa e hospedados no biotério do departamento de farmacologia durante 2 a 3 semanas, para aclimatação; neste biotério a temperatura é controlada para aproximadamente 22ºC. Os camundongos possuíam acesso irrestrito à água e comida e estavam submetidos a um ciclo claro/escuro de 12x12 horas. As gaiolas possuíam aproximadamente 2 cm de maravalha e eram trocadas semanalmente. Os protocolos experimentais foram previamente submetidos à análise da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade local e aprovados (Protocolo nº 01/2018).

4.2 DROGAS E TRATAMENTO

Durante os 21 dias de estresse os animais foram tratados com:

- Venlafaxina (Pratti-Donaduzzi) nas doses de 10, 20 e 40mg/kg (i.p.) diluída em salina e preparada fresco e em condição estéril;
- Antagonista de receptores CB_1, AM251 (Tocris, USA) na dose de 0,3 mg/kg (i.p.), dissolvidas em Tween 80 2% e DMSO (1%) para estocagem a -20ºC e diluídas em salina estéril em cada dia de tratamento. A dose foi baseada em estudo prévio (FOGAÇA et al., 2018).
- 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU -Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos da América) na dose de 200 mg/kg (i.p) dissolvido em salina estéril (CAMPOS et al.,2013).

4.3 ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL (CUS)

O protocolo do Estresse Crônico Imprevisível utilizado foi uma modificação do procedimento descrito por Willner e colaboradores (WILLNER et al., 1992; CAMPOS et al., 2013). Os camundongos foram expostos a uma sequência de estressores imprevisíveis e aleatórios durante 21 dias, os quais consistiram em: caixa inclinada (24h), inversão do ciclo claro-escuro (24h), ciclo claro-escuro intermitente (24h), privação de comida (24h), maravalha molhada (overnight), estresse por restrição em tubo falcon (2h) e natação forçada (15 min).

4.4 PERFUSÃO E PRESERVAÇÃO DOS TECIDOS

Ao fim do protocolo, os animais foram anestesiados com uma solução de Ketamina + Xilazina + Solução Salina (375mg/kg + 25mg/kg) no volume máximo de 10ml/Kg e, em seguida, foram perfundidos por via transcardíaca com salina tamponada e fosfatada (PBS, 30mL) seguidos pela infusão de paraformaldeído (PFA, 4%, 30mL). Os animais foram decapitados e os encéfalos removidos e pós-fixados *overnight* em PFA 4%. Após, eles foram crioprotegidos em solução de sacarose 30% por, aproximadamente, 5 dias. Em seguida, a sacarose foi removida, encéfalos foram congelados em Isopentanol resfriado em vapor de gelo seco (-30°C) por aproximadamente 30s e armazenados em freezer -80°C até o momento dos cortes em criostato (Leica, Alemanha) com espessura de 30um e contendo o GD (-1,92 a -4,08 mm a partir do bregma- Paxinos e Frankin, 2007).

4.5 DETERMINAÇÃO DE CÉLULAS BRDU POSITIVAS POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a detecção de BrdU por imunofluorescência, os cortes receberam 3 lavagens em salina tamponada por Tris (TBS) durante 5, 10 e 5min e foram incubados por 30 min em HCl 2N a 37ºC para desnaturação do DNA. Após resfriamento em geladeira por 10min, os cortes foram lavados com ácido bórico 0,1M (pH=8,9) durante 5, 10, e 5min. Este passo foi seguido por 3 lavagens com TBS. Em seguida, os cortes foram colocados em uma solução 1% de soro bovino fetal (SBF) por 2h, para o bloqueio dos sítios inespecíficos. Então, os cortes foram incubados

overnight com os anticorpos primários anti-BrdU (diluição 1:100, hospedeiro rat, Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-GFAP (diluição 1:1000, hospedeiro rabbit, Cell Signaling, Massachusetts, Estados Unidos da América) e anti-SOX2 (diluição 1:1000, hospedeiro mouse, Millipore, Massachusetts, Estados Unidos da América) diluídos em solução de TBS^+ posteriormente foram lavados 3 vezes durante 5, 10 e 5min com TBS e em seguida incubados com os secundários alexa-488 (diluição 1:1000, anti rat, ThermoFisher, Massachussets, Estados Unidos da América), alexa-594 (diluição 1:1000, anti rabbit, ThermoFisher, Massachussets, Estados Unidos da América) e alexa-647 (diluição 1:1000, anti mouse, ThermoFisher, Massachussets, Estados Unidos da América) durante 2h. Logo após, os cortes foram novamente lavados por 5, 10 e 5min e estendidos sobre lâminas gelatinizadas. Após totalmente secas, as lâminas foram cobertas com meio de montagem (Fluoromont) e lamínulas. As lâminas foram conservadas em caixas protegidas da luz a 4ºC. Neste trabalho serão apresentados apenas os dados da quantificação da marcação para BrdU. Os cortes foram analisados em microscópio epifluorescente, no aumento de 40X e foram quantificados entre 8 a 12 cortes por animal. A quantificação foi realizada na SGZ do hipocampo e foi normalizada pela área do GD, obtida através da objetiva 10X. O número absoluto de células BrdU+ foi calculado considerando o volume total do hipocampo, determinado pela soma das áreas das seções amostradas multiplicadas pelas distâncias entre elas (em nosso estudo =1,26mm- Campos et al., 2013). As fotos representativas foram obtidas através de microscópio confocal (TCS SPE- Leica, Wetzlar, Alemanha) no aumento de 20X.

4.6 DETERMINAÇÃO DE CÉLULAS DCX POSITIVAS POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a imunohistoquímica, os cortes receberam 3 lavagens de TBS durante 5, 10 e 5min e posteriormente incubados em tampão citrato (10mM) para recuperação antigênica, durante 30min a 70ºC. Em seguida foram lavados 3 vezes com TBS durante, 5, 10 e 5min, após isso foram bloqueados com FBS 1% por 2h, incubados *overnight* com o anticorpo primário (anti-DCX 1:200, Santa Cruz Biotecnology, Texas, Estados Unidos) e posteriormente incubados com o respectivo anticorpo secundário do kit Vectastin (Vector Labs, California, Estados Unidos). Em seguida foram lavados nvamente durante 5, 10 e 5min e, então, a coloração foi revelada por exposição ao DAB (3, 3 -diaminobenzidine), por aproximadamente 10min, protegidos da luz. Por fim, os cortes foram montados em lâmina gelatinizada, diafanizados e cobertos com meio de montagem

(Entellam, Merk-Millipore, Massachusetts, Estados Unidos de América) e lamínula. Eles foram analisadas em microscópio de luz no aumento de 20X com auxílio do Image Pro Plus (Media Cybernetics, Cambridge, Reino Unido). As células foram quantificadas na SGZ do hipocampo, avaliando-se entre 6 a 10 seções coronais por animal, e foram normalizadas pela área de GD determinada através da objetiva X10. O número absoluto de células positivas foi calculado considerando o volume total do hipocampo, determinado pela soma das áreas das seções amostradas multiplicadas pelas distâncias entre elas (Campos et al., 2013). Células positivas localizadas na distância de, pelo menos, 01 corpo celular na camada granular, foram consideradas em fase de migração.

4.7 SPLASH-TEST (ST)

Os animais foram submetidos à duas borrifadas de uma solução de sacarose a 10% sobre o dorso, esta solução apresenta viscosidade suficiente para elicitar comportamentos de autolimpeza, conhecido em roedores pelo termo inglês *grooming*. O *grooming* é um comportamento estereotipado e repetitivo de roedores que pode ser avaliado quanto à latência de início, duração total e tempo parcial gasto entre face e dorso. Este é um teste farmacologicamente validado a partir da observação de que o CUS é capaz de reduzir os parâmetros de qualidade e quantidade de tempo investido nos comportamentos de autolimpeza de uma maneira possível de ser revertida pelo tratamento com AD´s (DUCOTTET; AUBERT; BELZUNG, 2004). Sendo assim, o ST permite analisar comportamentos hedônicos dos animais, que podem ser correlacionados a comportamentos do tipo depressivo (DUCOTTET; AUBERT; BELZUNG, 2004). Após os borrifos, os animais foram gravados durante seis minutos para posterior análise comportamental.

Para realização da análise de maneira cega, antes da realização do teste as gaiolas moradia foram aleatoriamente numeradas e a correspondência foi anotada. Após quantificação dos parâmetros, os vídeos foram correlacionados ao grupo a que pertencia. As análises foram realizadas manualmente assistindo-se aos vídeos. Para quantificação da latência, foi observado quanto tempo após a caixa ser coberta com uma tampa acrílica o animal levava para começar o comportamento de autolimpeza. Entre o 1º e o 6º minuto da gravação (5 minutos no total), foi cronometrado o tempo total dispendido pelo animal na autolimpeza. Além disso, foi

cronometrado o tempo que o animal dispendia na autolimpeza do dorso e os valores referentes à autolimpeza da região facial foram obtidos subtraindo o tempo total do tempo parcial no dorso.

4.8 TESTE DA ALIMENTAÇÃO SUPRIMIDA PELA NOVIDADE (NOVELTY SUPRESSED FEEDING, NSF)

No último dia de tratamento e estresse, os animais foram transferidos para uma gaiola moradia limpa e privados de comida durante 24h para realização do NSF, a gaiola moradia antiga foi reservada para a realização do teste controle do NSF. O NSF consiste em introduzir o animal em um ambiente novo e aversivo, ou seja, uma caixa transparente de acrílico forrada com maravalha limpa, a qual possuí uma plataforma central com iluminação aversiva (200+ lux). Sobre a plataforma acomoda-se um pellet da ração a qual os animais estão habituados a se alimentar desde que são desmamados. Este teste é baseado no conflito que o animal se encontra, visto que a presença do ambiente novo e aversivo se contrasta à tendência natural em se alimentar devido à privação de comida. A avaliação do NSF é realizada no momento do teste cronometrando-se a latência para que o animal comece a se alimentar. O NSF é um modelo preditivo para drogas com potencial ansiolítico, visto que o tratamento com estas drogas reduz a latência para se alimentar no teste (adaptado de SANTARELLI et al., 20003 e de CAMPOS et al, 2013).

4.9 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Logo após os testes comportamentais (experimentos I e III) os animais foram anestesiados com uma sobredose de Ketamina + Xilazina + Solução Salina (375mg/kg + 25mg/kg) via i.p e submetidos a eutanásia por decapitação. No experimento I, foram conduzidas duas séries experimentais (A e B) de CUS ao mesmo tempo, com metade dos *n* experimental em cada uma. Os animais da série B do experimento I tiveram seus encéfalos removidos, o hipocampo foi dissecado e imediatamente congelado em gelo seco para análises moleculares de *Western blot*. No experimento III também foram conduzidas duas séries experimentais, com a série A começando um dia antes da série B e com metade do *n* experimental em cada uma. Os animais da série A do experimento III foram anestesiados, seus encéfalos removidos e o hipocampo foi

dissecado para realização de *western blot*. Já os animais da série B do experimento III foram anestesiados da mesma maneira e perfundidos por via transcardíaca PBS, seguido de paraformaldeído (PFA) 4%. Em seguida, os encéfalos foram retirados, pós-fixados em PFA 4% *overnight*, crioprotegidos em sacarose 30% até que decantassem, congelados em Isopropanol (-30C) durante 30s, estocados em *freezer* -80 até serem cortados em criostato (Leica, Wetzlar, Alemanha) em sessões de 30um de espessura contendo o GD (-1,92 a -4,08 mm a partir do bregma- Paxinos e Frankin, 2012)

4.10 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOT

Para o estudo da modulação de proteínas do ECS foram quantificados os receptores CB_1 e $TRPV_1$ e as enzimas MAGL e FAAH utilizando a técnica de *Western Blot.*

Utilizando um homogeneizador do tipo *bead-beater* (*TissuerLyser LT Adapter* 30Hz, 90s, Hilden, Alemanha), os hipocampos foram homogeneizadas, tomando cuidado com elevações de temperatura, em tampão de lise contendo inibidores de proteases (Pirofosfato de sódio 2,5mM; Ortovanadato de sódio 1mM; Molibdato de sódio 5mM; Coquetel Inibidor de Proteases (P8340, Sigma-Aldrich, Missouri- Estados Unidos) a fim de evitar a degradação por proteases e fosfatases do conteúdo das amostras. Após a lise, as amostras foram centrifugadas duas vezes (12000rpm, 10min, 4ºC) e o sobrenadante foi aliquotado e estocado em *freezer* -80ºC.

Foi feita a quantificação proteica dos homogenatos utilizando a técnica de Bradford, que se baseia na interação das proteínas com o Coomassie Brilliant Blue G-250 e na leitura de absorbância (450nm) em espectofotômetro de microplacas (Epoch, Biotek, Vermont, Estados Unidos da América) para determinação da concentração proteica frente a uma curva padrão com concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (Bradford, 1976). A concentração proteica foi ajustada para 2ug/uL. Em seguida, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com densidade gradiente (4-12%, NuPAGE^{TM}, Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos) para a separação das proteínas de acordo com seu peso molecular no sistema Novex (Invitrogen, California, Estados Unidos). Em cada poço do gel foi carregado 20uL de amostra e a separação das proteínas foi realizada utilizando uma voltagem de 150V. Após este procedimento as proteínas foram eletrotransferidas por método úmido em tampão carbonato (pH9,4- $NaHCO_3$

10mM, Na_2CO_3 3mM, CH_3OH 10%, SDS 1%) para membranas de nitrocelulose (0.2um, GE, Massachusets, Estados Unidos).

Após isso, a transferência foi confirmada pela exposição ao Ponceau e as membranas foram bloqueadas com leite desnatado (*Blotting-Grade Blocker* 10%, Biorad ®, Califórnia, Estados Unidos da América) diluído em Tampão Tris (20mM) contendo 0.1% de Tween 20 (TBS-t),), afim de evitar ligações inespecíficas das proteínas, por pelo menos duas horas. Em seguida as membranas foram lavadas três vezes com TBS-t por 5, 10 e 5min e incubadas com anticorpo primário (coloca quais) *overnight*, à temperatura de 4ºC.

Após a incubação, as membranas foram lavada três vezes com TBS-t durante 5, 10 e 5min e em seguida incubadas *overnight* com anticorpos primários anti-CB1(rabbit, 1:1000, Cayman, Michigan, Estados Unidos da América), anti-MAGL (mouse, 1:1000, ThermoFisher, Massachussets, Estados Unidos da América), anti-TRPV1 (goat, 1:250, Santa Cruz, Texas, Estados Unidos da América) e anti-BDNF (rabbit, 1:200, Santa Cruz, Texas, Estados Unidos da América). Em seguida, após novas lavagens, foram incubadas com anticorpos secundários (anti Rabbit 1:10000; anti Mouse 1:10000; anti-Goat 1:10000, GE, Massachusets, Estados Unidos da América) por duas horas. Novamente a membrana foi lavada da mesma maneira e as proteínas foram reveladas pelo método de quimiluminescência aumentada (ECL prime- GE Massachusets, Estados Unidos da América) e escaneada em fotodocumentador (*ImageQuant* LAS 4000 series, GE Healthcare Life Sciences, Illinois, Estados Unidos da América) para posterior análise densitométrica. A quantificação foi feita utilizando programa Image Studio™ Lite (Li-COR Bioscence, Nebraska, Estados Unidos da América). Para o controle de carga proteica, utilizou-se a marcação para beta-actina (mouse, 1:20000, Cell Signalling, Massachusetts, Estados Unidos da América).

4.11- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão representados como média ± Erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Kolmorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Os dados que cumpriram os pré-requisitos de normalidade e de homocedasticidade foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias seguida do teste de

Duncan para comparações múltiplas. Os dados não-paramétricos do experimento I, apresentavam um único fator tratamento, por isso foram analisados utilizando a estatística de Kruskal Wallis para comparações múltiplas. Os dados do experimento III que não seguiam as normas para aplicação de estatística paramétrica foram analisados por meio da aplicação da estatística não-paramétrica de Wilcoxon (comparação dos tratamentos 1 e 2) e o teste de Kruskal Wallis para comparações múltiplas. Foram considerados significativos valores de $p<0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1) EXPERIMENTO I: CURVA DOSE-RESPOSTA PARA A VFX

- Não foi observado efeito tipo antidepressivo no Splash-test após tratamento crônico com VFX em nenhuma das doses testadas

No protocolo experimental apresentado, para o ST a análise de Teste t não revelou efeito significativo do estresse sobre os parâmetros de latência para o primeiro episódio de grooming ($t_{(3)}$= 1,0, p=0,386, Figura 4a); de tempo total dispendido em autolimpeza (Teste $t_{(12)}$= 0,883, p=0,395, Figura 4b); de tempo dispendido na autolimpeza da região facial (Teste $t_{(12)}$= 1,274 , p=0,227 (Figura 4c) ou de tempo dispendido na autolimpeza da região do dorso (Teste $t_{(12)}$= 0,481, p=0,6395 (Figura 4d). Com relação ao fator tratamento, os dados para latência e tempo dispendido na limpeza da região dorsal não apresentaram homocedasticidade, sendo portanto, analisados por meio da estatística não-paramétrica Kruskall-Wallis. Essa análise não indicou diferenças significativa entre os grupos no tempo até iniciar a autolimpeza (X^2(3)=2,7, p=0,442) ou no tempo gasto em autolimpeza no dorso (X^2(3)=5,13, p=1,62). Os dados obtidos para o tempo total de autolimpeza e para o tempo parcial de autolimpeza na região da face apresentaram perfil paramétrico e foram, portanto, analisados por meio da estatística one-way ANOVA a qual também não revelou qualquer distinção entre os grupos ($F_{(3,30)}$=1,609, p=0,208) com relação ao tempo total gasto em autolimpeza (Figura 4b) e nem quando era realizada análise específica da limpeza na região da face ($F_{(3,30)}$=1,1, p=0,355).

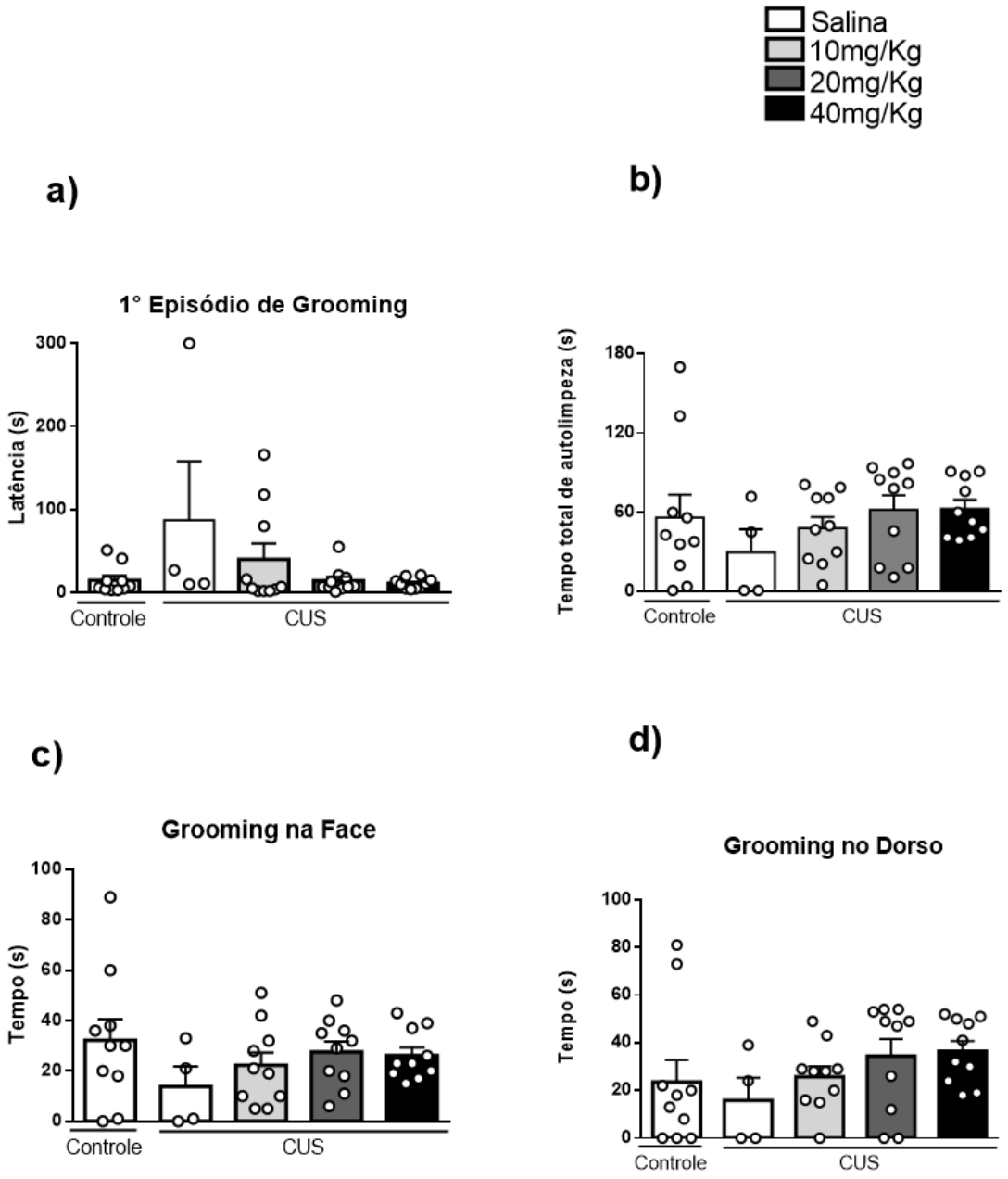


Figura 4: Efeitos comportamentais do estresse crônico em animais tratados com veículo ou diferentes doses de VFX sobre os comportamentos de autolimpeza: Os gráficos representam a latência para o início do comportamento de autolimpeza (a), o tempo total gasto pelo animal para se autolimpar (b), o tempo gasto para realização da autolimpeza facial (c) e o tempo gasto para a limpeza da região do dorso (d). Não foram encontradas diferenças entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados. Os grupos são: controle não estressado e não tratado (n=10), estressado/salina (n=4), estressados/ VFX 10mg/Kg (n=10), estressados/ VFX 20mg/Kg (n=10) e estressados/ VFX 40mg/Kg (n=10), as barras representam média +EPM.

- A Venlafaxina atenua os efeitos ansiogênicos do estresse em todas as doses administradas

No protocolo experimental apresentado, para o NSF a análise de Teste t não revelou efeito do estresse, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos não estressado/Sal (Controle) e CUS/Sal ($t_{(9,9)}$ =1,36; p=0,221). A estatística one-way ANOVA não revelou efeito do tratamento ($F_{(3,30)}$ =0,431 p>0,05), no entanto a análise *pos-hoc* indicou uma redução da latência para se alimentar no teste em todas as doses de VFX utilizadas (teste de Duncan) em relação ao grupo CUS/Sal (Figura 5a).

Para excluir o viés de que o estresse ou o tratamento poderiam alterar o perfil de ingestão alimentar dos animais foi realizado teste controle de consumo alimentar na gaiola moradia destes animais. Nenhum efeito foi observado no consumo de alimentar neste teste controle, indicando que o estresse, tampouco o tratamento, alterou este parâmetro (Figura 5b).

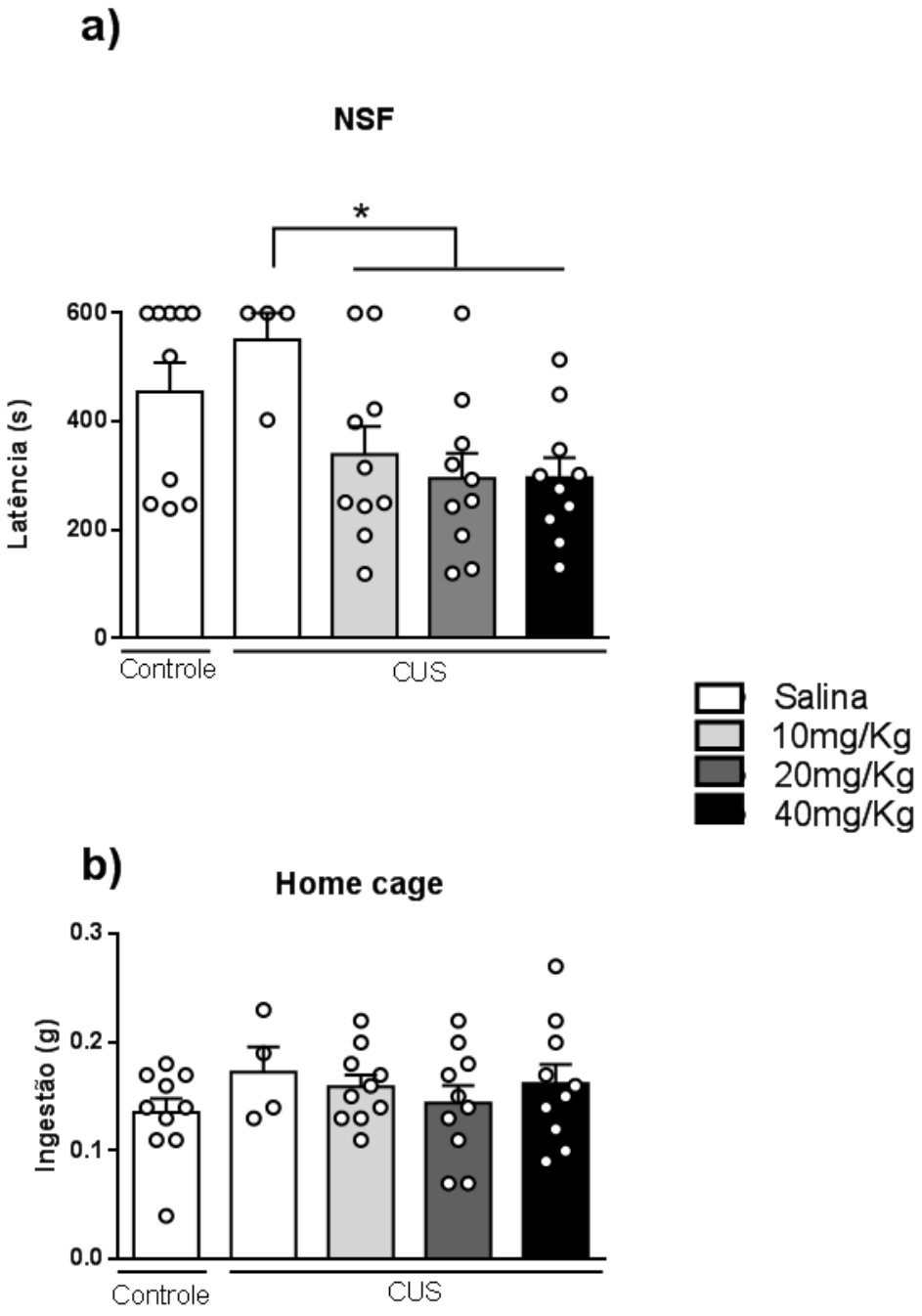


Figura 5: Efeitos comportamentais do estresse crônico em animais tratados cronicamente com veículo ou com VFX submetidos ao modelo do *Novelty Supressed Feeding*. a) O gráfico representa a latência para o animal se alimentar no NSF. Observa-se que o grupo estressado, mas não tratado com VFX apresenta maior latência para se alimentar. Ao mesmo tempo, os grupos estressados e tratados com VFX apresentam redução na latência para se alimentar em relação ao controle. b) O gráfico representa a ingestão alimentar dos animais, em gramas, na gaiola moradia. Observa-se que não há diferenças entre os grupos. Os grupos são: controle não estressado e não tratado (n=10), estressado/salina (n=4), estressados/

VFX 10mg/Kg (n=10), estressados/ VFX 20mg/Kg (n=10) e estressados/ VFX 40mg/Kg (n=10), * corresponde a $p<0,05$ em relação ao grupo controle, # corresponde a $p<0,05$ em relação ao grupo estressado/salina. As barras representam média +EPM.

- A Venlafaxina modula expressão de componentes do Sistema Endocanabinoide e da Neurotrofina BDNF

Para a análise dos efeitos do tratamento com VFX em diferentes doses sobre a modulação de proteínas do ECS e a neurotrofina BDNF, foi aplicado o teste one-way ANOVA. Observamos que em relação ao receptor CB_1 a análise não apresentou diferença significativa ($F_{(3,16)} = 1,101$, $p>0,05$) (Figura 6a). De acordo com a estatística, a expressão da enzima MAGL se apresentou elevada em relação aos outros grupos quando realizado pos-hoc de Duncan ($F_{(3,16)} = 2,296$, $p<0,05$) (Figura 6b).

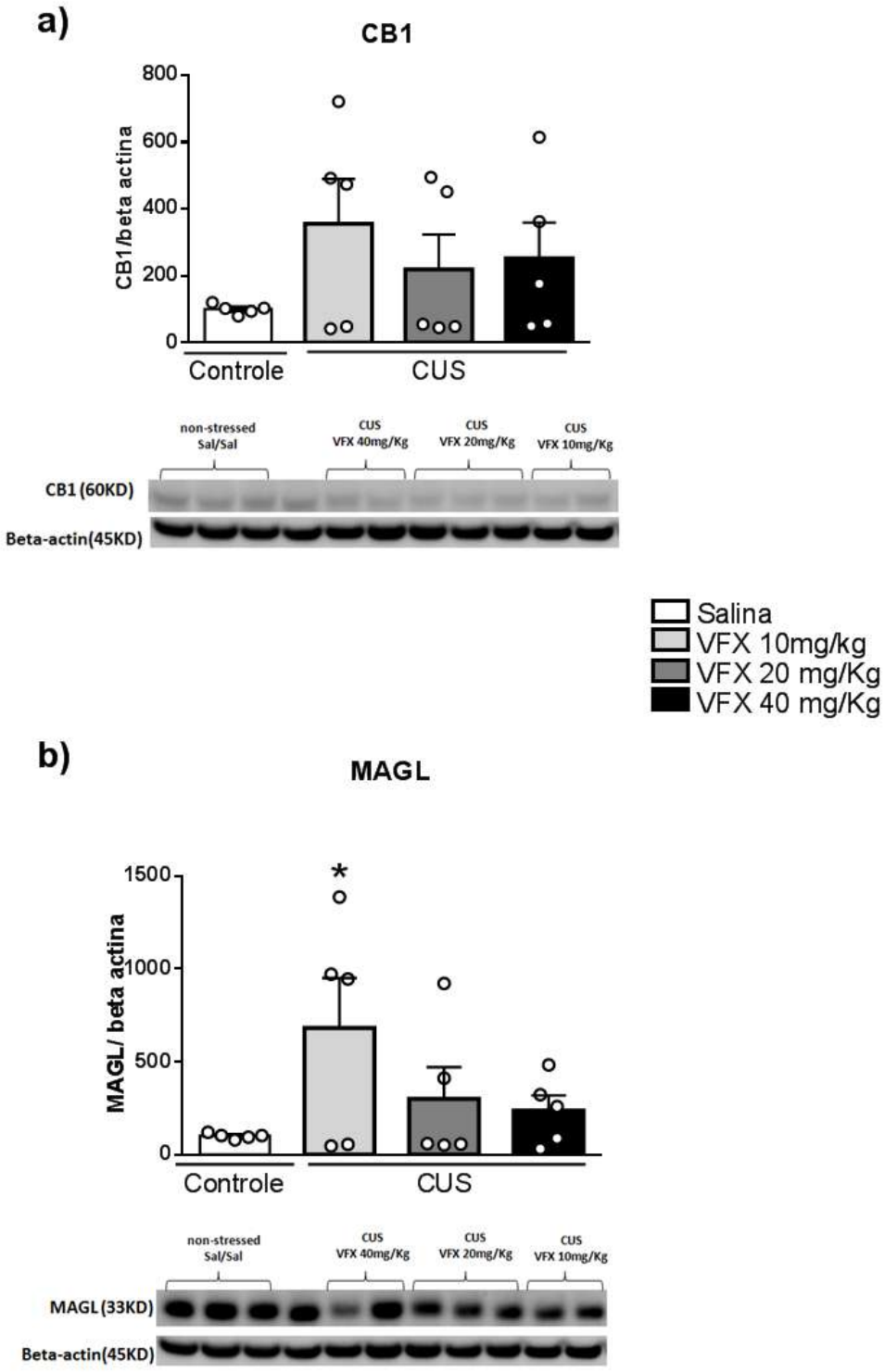
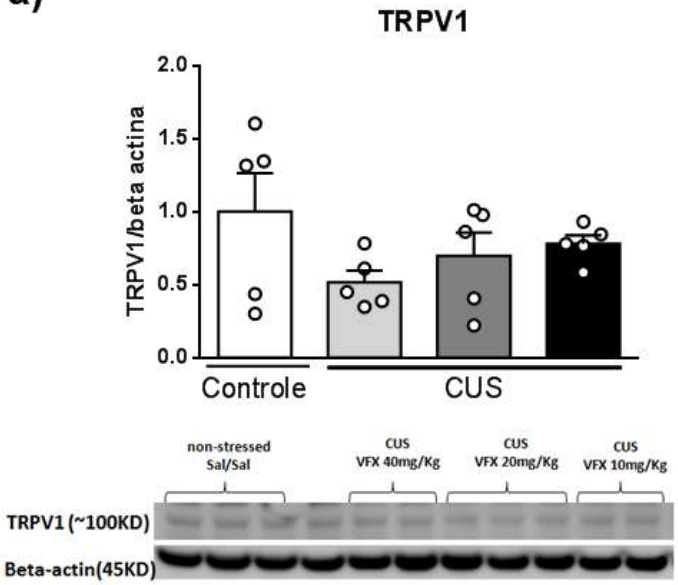


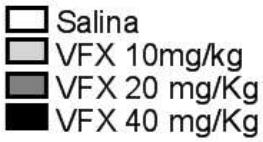
Figura 6: Efeitos comportamentais do estresse crônico em animais tratados com veículo e do tratamento repetido com VFX sobre a expressão proteica de componentes do ECS. a) O gráfico mostra expressão proteica do receptor CB_1, estatisticamente não há diferença entre os grupos, porém por

análise visual todas as doses de VFX parecem elevar a expressão do receptor; b) O gráfico mostra a expressão proteica da enzima MAGL, que está aumentada no grupo CUS/VFX 10mg/Kg. Os grupos são: controle não estressado e não tratado (n=5), estressados/ VFX 10mg/Kg (n=5), estressados/ VFX 20mg/Kg (n=5) e estressados/ VFX 40mg/Kg (n=5). As barras representam média +EPM

Para o receptor TRPV1, a estatística não apresentou efeito de nenhum tratamento ($F_{(3,16)}$ =1,542, P>0,05) (Figura 7a), assim como não houve efeito da expressão proteica de BDNF em nenhum dos tratamentos ($F_{(3,16)}$ =1,08, p>0,05)(Figura 7b)

a)


TRPV1
TRPV1/beta actina
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Controle
CUS
non-stressed Sal/Sal
CUS VFX 40mg/Kg
CUS VFX 20mg/Kg
CUS VFX 10mg/Kg
TRPV1 (~100KD)
Beta-actin(45KD)


Salina
VFX 10mg/kg
VFX 20 mg/Kg
VFX 40 mg/Kg

b)

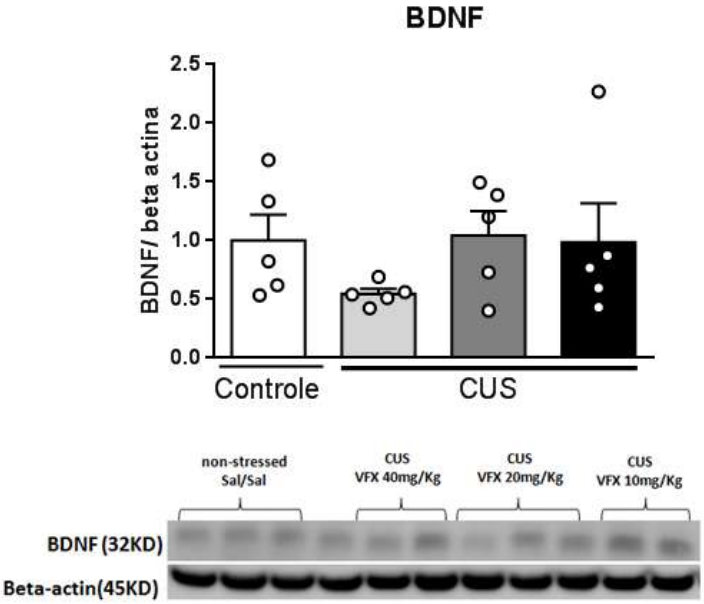

BDNF
BDNF/ beta actina
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Controle
CUS
non-stressed Sal/Sal
CUS VFX 40mg/Kg
CUS VFX 20mg/Kg
CUS VFX 10mg/Kg
BDNF (32KD)
Beta-actin(45KD)

Figura 7: Efeitos comportamentais do estresse crônico em animais tratados com veículo e do tratamento repetido com VFX sobre a expressão proteica do receptor TRPV1 e da neurotrofina BDNF. a) O gráfico mostra expressão proteica do receptor TRPV1 e não há diferença entre os grupos analisados; b) O gráfico mostra a expressão proteica da neurotrofina BDNF. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, as doses de 20 e de 40mg/Kg de VFX parecem aumentar a expressão. Os grupos são: controle não estressado e não tratado (n=5), estressados/ VFX 10mg/Kg (n=5), estressados/ VFX 20mg/Kg (n=5) e estressados/ VFX 40mg/Kg (n=5). As barras representam média + EPM..

5.2 EXPERIMENTO III

Os resultados apresentados abaixo foram obtidos submetendo camundongos ao protocolo de CUS descrito acima e tratados com VFX na dose de 20m/Kg (i.p) e/ou com AM251 na dose de 0,3mg/kg (i.p). É necessário destacar que os animais utilizados nesta série experimental foram provenientes do CEMIB/UNICAMP devido à disponibilidade de ração inadequada aos animais, que resultou em suspensão da possibilidade de utilizarmos animais do Campus para os experimentos.

- Os tratamentos crônicos com AM251 provoca efeito anorexigênico nos animais estressados tratados com veículo, mas não nos animais tratados posteriormente com VFX

Acerca das alterações no peso dos animais, a estatística t de medidas repetidas entre os grupos controle e CUS/Sal/Sal revelou que na primeira semana o peso médio dos animais estressados não divergia dos controle ($t_{(13)}$= 0,931 p>0,05), na segunda semana o peso dos animais estressados apresentava-se reduzido em relação aos controle ($t_{(13)}$= -2,461 p<0,05) e na terceira semana também não havia diferenças entre ambos os grupos ($t_{(13)}$=0,514, p>0,05). Com relação ao efeito do tratamento, a análise da cruva de ganho de peso por ANOVA de medidas repetidas realizada ao longo das semanas revelou tendência à interação entre os tratamentos ($F_{(3,26)}$=2,796, p=0,062), efeito do tratamento isolado com AM251 ($F_{(3,26)}$= 4,374 p<0,05) e ausência de efeito da VFX ($F_{(1,26)}$= 0,970 p>0,05). A análise por two-way ANOVA do peso dos animais em cada semana, isoladamente, revelou que: na primeira semana o tratamento com AM251 apresentava efeito isolado ($F_{(1,26)}$=13,635 p<0,05), mas não havia efeito da VFX (F(1,26)=0,780 p>0,05) nem interação entre os tratamentos ($F_{(1,26)}$=2,088 p>0,05); na segunda

semana não houve efeito do tratamento com AM251 ($F_{(1,26)}$=2,152 p>0,05), nem da VFX (F(1,26)=0,102, p>0,05), porém havia interação entre os efeitos ($F_{(1,26)}$=8,735 p<0,05); na terceira semana a análise indicou que, novamente, o AM251 apresentou efeito anorexigênico ($F_{(1,26)}$=6,836 p<0,05), assim como a VFX (F(1,26)=5,285 p<0,05), porém sem interação entre os tratamentos ($F_{(1,26)}$=3,260, p>0,05) (Figura 8).

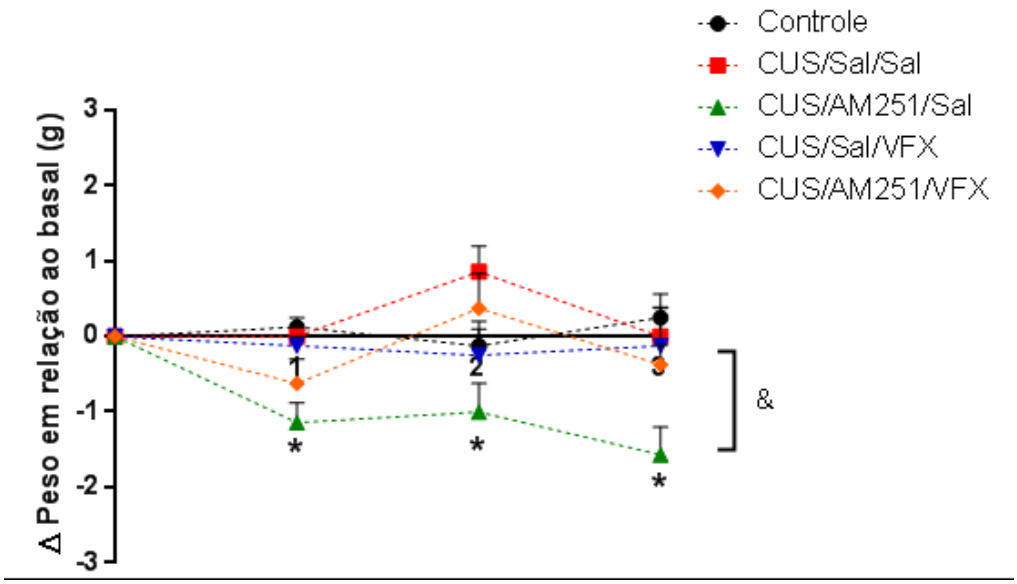


Figura 8: Acompanhamento semanal da variação de peso corporal em animais submetidos ao estresse crônico e tratados com AM251 e/ou VFX. O gráfico indica a variação de peso dos animais ao longo das semanas de estresse e tratamento. Pode-se observar que o grupo estressado e tratado isoladamente com AM251(CUS/AM251/Sal) apresenta maior perda de peso em relação à média dos outros grupos, em todas as três semanas analisadas. Os grupos são: não-estressado/Sal/Sal (n=8), CUS/Sal/Sal (n=7), CUS/AM251/Sal (n=8), CUS/Sal/VFX (n=8) e CUS/AM251/VFX (n=8). * representa $p<0,05$ na análise ponto a ponto em relação ao grupo CUS/Sal/Sal, & representa $P<0,05$ na análise multivariada da curva em relação à curva do grupo CUS/Sal/Sal. As barras representam média +EPM

5.3) Alterações comportamentais após CUS e tratamento com VFX e/ou AM251

Efeito tipo antidepressivo da VFX na presença do antagonista de receptores CB_1, AM251

A estatística t indicou que, em relação ao parâmetro de latência para iniciar o comportamento de autolimpeza, não foi observado efeito do estresse em aumentar este tempo, sendo que as médias entre os grupos controlem e CUS/Sal/Sal não diferem ($t_{(36)}$ =1,16, p=0,254). Com relação ao tempo total de autolimpeza, o estresse não apresentou efeito ($t_{(36)}$ =0,9, p=0,38). Entretanto, separando o tempo de autolimpeza nas sub-regiões de face e dorso, pode-se observar que há efeito do estresse em reduzir o tempo de autolimpeza na face ($t_{(36)}$ =2,2, p<0,05) e aumentar o tempo de autolimpeza na região do dorso ($t_{(36)}$ =2,4, p<0,05). Com relação ao fator tratamento não foi observado efeito *per se* do AM251 ($F_{(1,26)}$=0,557, p>0,05), e nem da VFX ($F_{(1,26)}$= 0,564 p>0,05), além disso também não houve interação entre os tratamentos ($F_{(1,26)}$= 0,058, p>0.05) (Figura 10a) na latência para o animal iniciar sua autolimpeza (Figura 10a). Em relação ao tempo total dispendido em autolimpeza não foi observado efeito do fator tratamento nem para o AM251 ($F_{(1,26)}$ =0,468, p>0,05), nem para a VFX ($F_{(1,26)}$ = 1,764, p>0,05) e nem para sua interação ($F_{(1,26)}$ = 0,017, p>0,05) (Figura 10b). A análise da autolimpeza na região da face não apresentou efeito do tratamento com AM251 ($F_{(1,26)}$=3,1, p=0,08), porém o tratamento com VFX isoladamente foi capaz de prevenir o efeito do estresse ($F_{(1,26)}$= 6,9 p<0,05) (Figura 10c). Não houve interação entre os tratamentos ($F_{(1,26)}$= 1,6, p=0,22). Para a região do dorso, a análise não revelou efeito significativo do AM251 isoladamente ($F_{(1,26)}$ =0,024, p>0,05), nem para a VFX ($F_{(1,26)}$ =0,019, p>0,05) e nem para a interação entre os tratamentos ($F_{(1,26)}$ =0,637, p>0,05 (Figura 10 d).

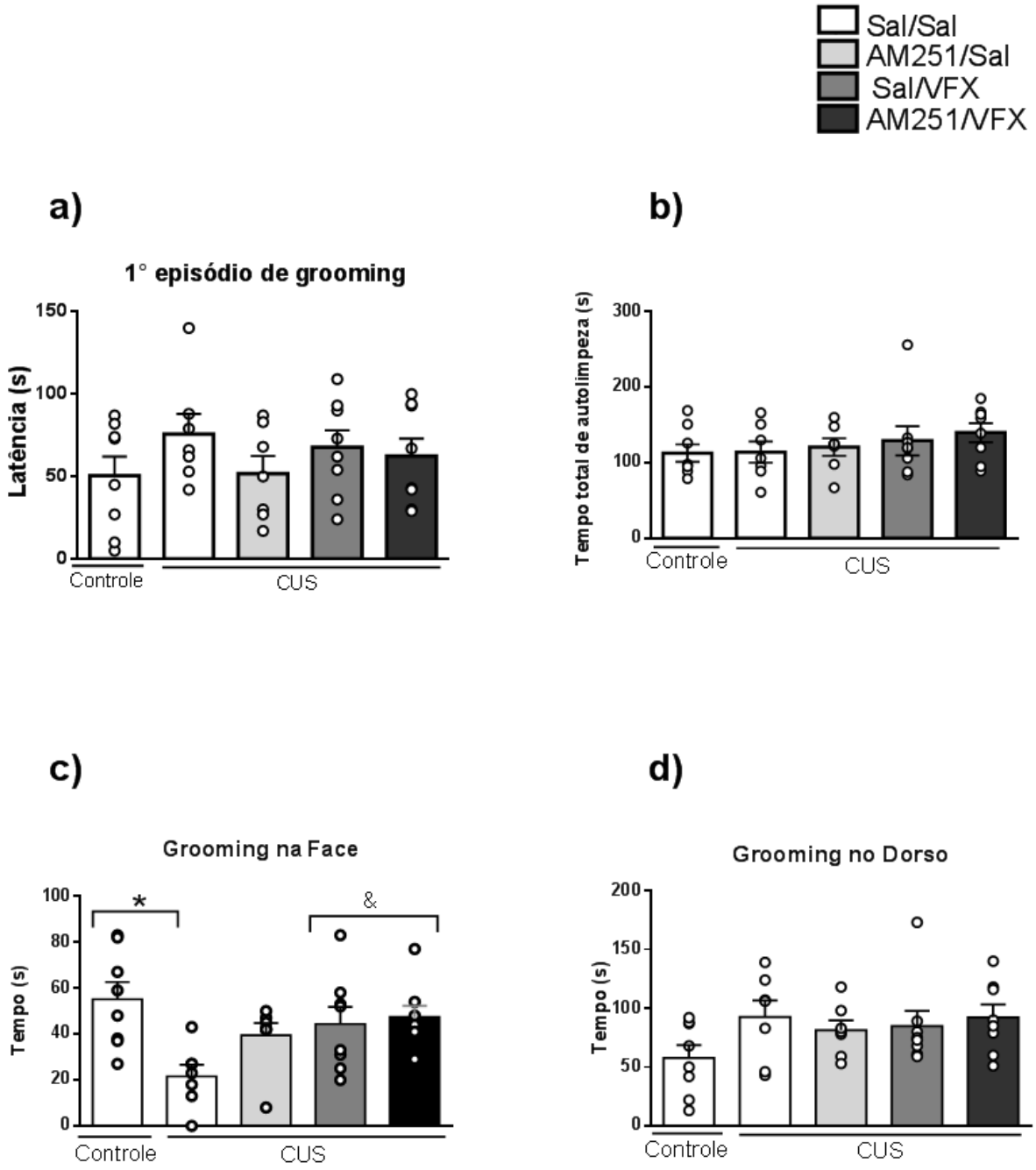


Figura 9: Comportamentos de autolimpeza em animais estressados cronicamente e tratados com AM251 e/ou VFX. a) O gráfico representa a latência para o início do comportamento de autolimpeza. b) O gráfico representa o tempo total gasto pelo animal para se autolimpar. Não há diferenças entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados. c) O gráfico representa o tempo gasto em autolimpeza na face e indica que os animais estressados apresentam redução neste comportamento, o que é revertido pelo tratamento com VFX e não é bloqueado pela AM251. d) O gráfico representa o tempo investido na autolimpeza do dorso, não há distinção do efeito do estresse ou do tratamento entre os grupos. * representa

$p<0,05$ em relação ao grupo não estressado/Sal/Sal, & representa $p<0,05$ em relação ao grupo CUS/Sal/Sal. Os grupos são: Não-estressado/Sal/Sal (n=8), CUS/Sal/Sal (n=7), CUS/AM251/Sal (n=8), CUS/Sal/VFX (n=8) e CUS/AM251/VFX (n=8). As barras representam média +EPM.

- A VFX apresenta efeito tipo ansiolítico, porém este efeito apresenta-se de maneira independente da ativação do receptor CB_1

Analisando a latência de ingestão de alimento no NSF, a estatística t indicou que não houve efeito do estresse entre os grupos de animais controle e CUS/Sal/Sal ($t_{(13)} = 0,98$, $p>0,05$). Com relação ao efeito do fator tratamento, a análise por two-way ANOVA revelou que o tratamento com AM251 não apresentou efeito isolado ($F_{(1,26)} =0,13$, $p=0,70$), ao contrário da VFX cujo efeito se deu estatisticamente significativo ($F_{(1,26)} =8,00$, $p<0,01$), entretanto, a interação entre os tratamentos não foi significativamente diferente ($F_{(1,26)} =0,008$, $p<0,77$). Este fator tratamento não apresentou homogeneidade de variâncias mas apresentava normalidade, cumprindo portanto apenas uma das regras da análise paramétrica. Desta maneira, analisamos os tratamentos também por meio da análise não-paramétrica de Wilcoxon, que revelou que o tratamento com AM251 não apresentou efeito isolado ($z=0,4$, $p=0,11$), o tratamento com VFX foi significativamente diferente ($z=4,9$, $p<0,001$) e também não havia interação entre os tratamentos ($z=0,26$, $p=0,796$), confirmando as análises prévias.(Figura 9a) Não houve diferença no perfil de ingestão alimentar dos animais no teste controle realizado na gaiola moradia (Figura 9b)

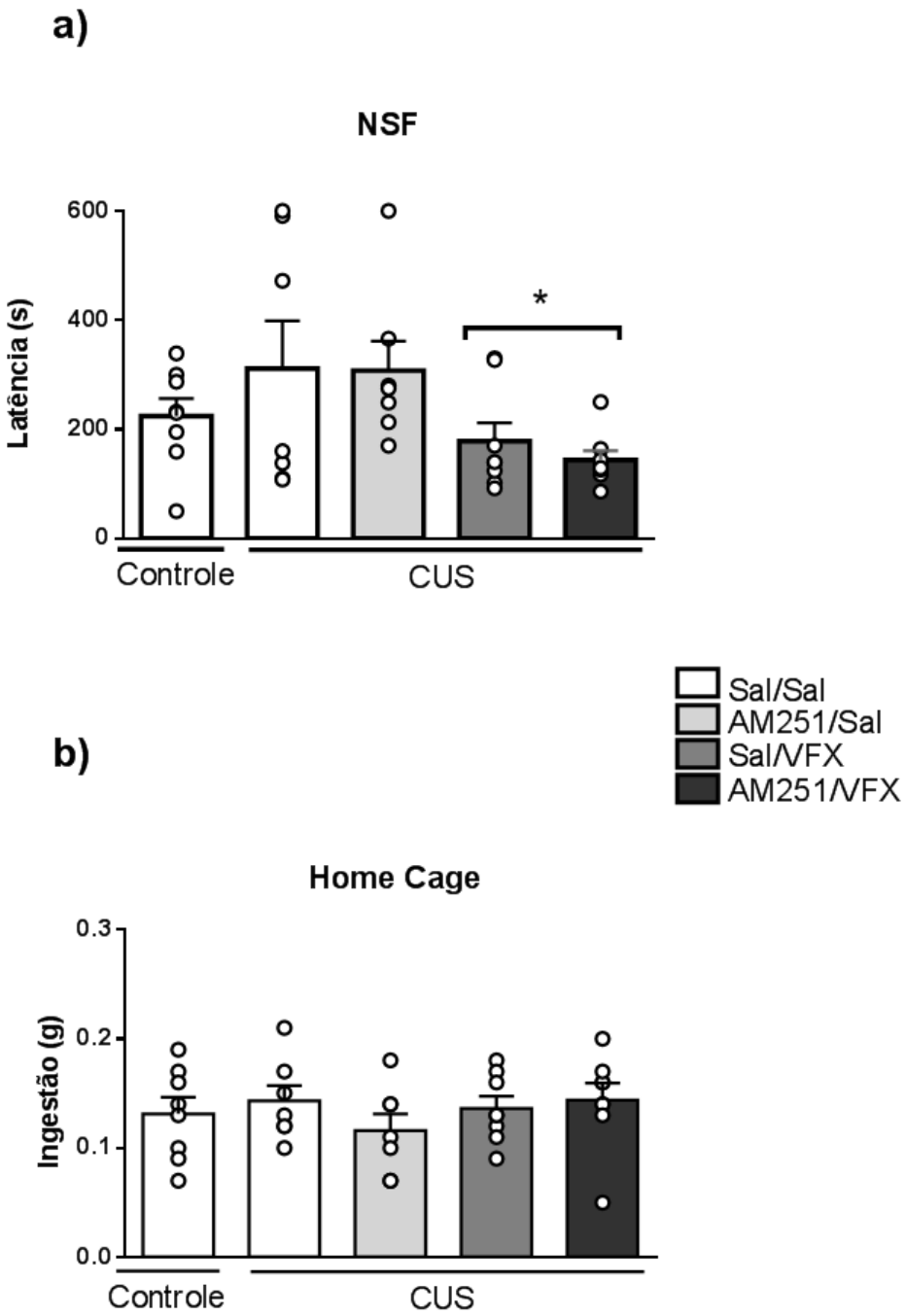


Figura 10: Efeitos comportamentais do estresse crônico em animais tratados AM251 e/ou VFX submetidos ao modelo do *Novelty Supressed Feeding.* a) O gráfico representa a latência para o animal se alimentar no NSF e indica que o tratamento com VFX foi capaz de reduzir a latência dos animais em se alimentarem no teste, ou seja, um efeito tipo ansiolítico. b) O gráfico indica ingestão de alimento, em gramas, na gaiola moradia dos animais e demonstra que não houve diferenças no perfil alimentar destes animais. Os grupos são: Não-estressado/Sal/Sal (n=8), CUS/Sal/Sal (n=7), CUS/AM251/Sal (n=8), CUS/Sal/VFX (n=8) e CUS/AM251/VFX (n=8). As barras representam média +EPM.

5.4) Análises moleculares das amostras hipocampais dos camundongos submetidos ao CUS e tratados com VFX e/ou AM251

Após o protocolo de estresse e tratamento, os animais da série experimental A do protocolo foram previamente decapitados e seus encéfalos foram removidos. Após dissecção do hipocampo e preparo das amostras, como descrito na metodologia, a expressão proteica de CB_1 e de MAGL foi analisada. A análise revelou que, em relação ao fator estresse a expressão do receptor CB_1 não foi diferente entre os grupos estressados e controle ($t_{(5)}$ =0,29, p>0,05), assim como para a enzima MAGL ($t_{(6)}$ =0,27, p>0,05). Em relação ao fator tratamento, para o receptor $CB_{1,}$ a two-way ANOVA não revelou diferenças entre nenhum dos grupo independentemente do tratamento: AM251 ($F_{(3,15)}$=2,002, p>0,05); VFX ($F_{(3,15)}$=1,160, p>0,05) ou interação entre eles ($F_{(3,15)}$=0,591, p>0,05). Da mesma maneira, para a enzima MAGL, a análise via two-way ANOVA não revelou diferenças entre os grupos do fator tratamento: AM251 ($F_{(3,15)}$=3,461, p>0,05); VFX ($F_{(3,15)}$=1,383, p>0,05) ou interação entre eles ($F_{(3,15)}$=1,760, p>0,05) (Figura 11).

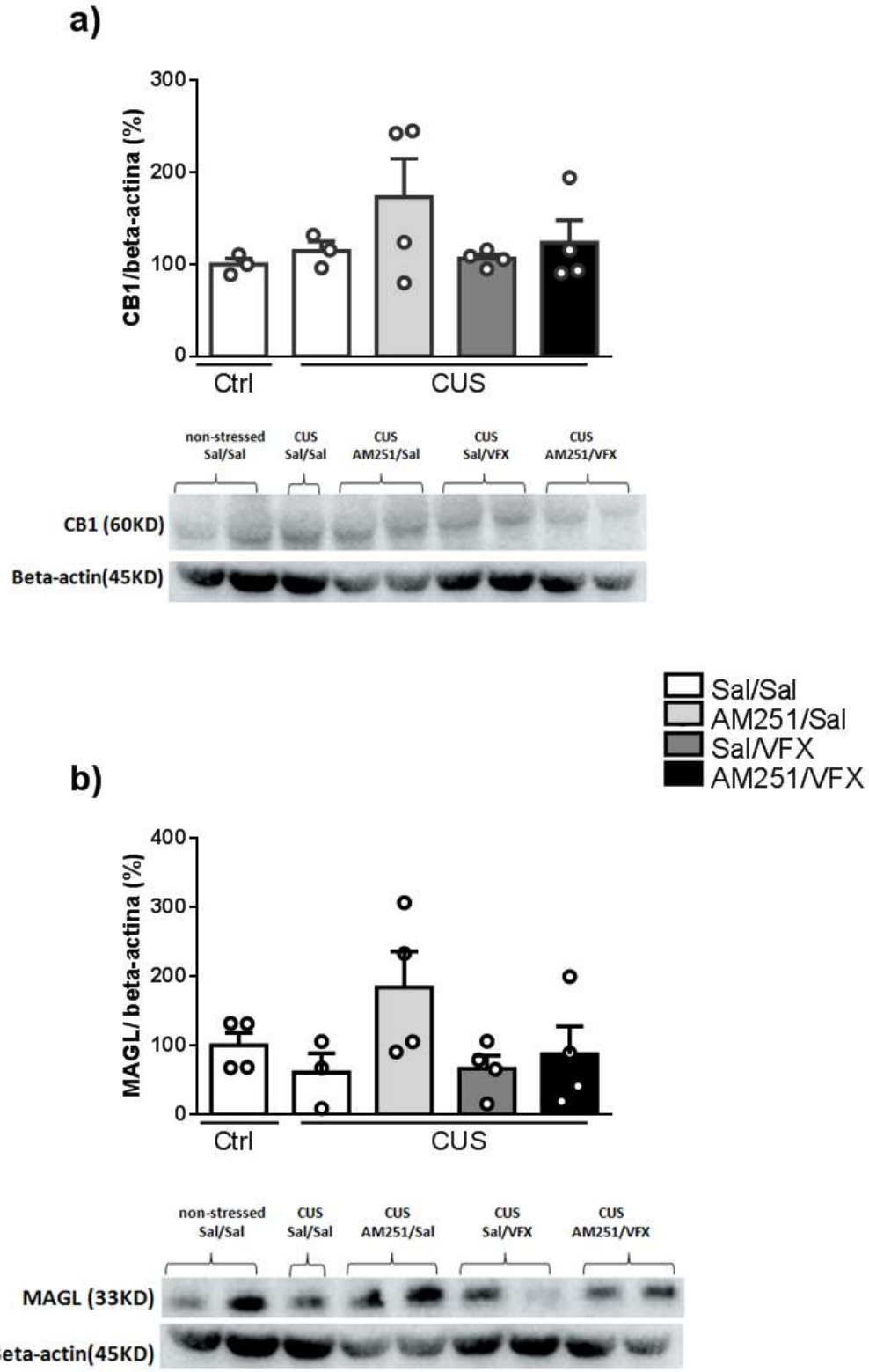


Figura 11: Efeitos comportamentais do estresse crônico em animais tratados com veículo e do tratamento repetido com VFX e/ouAM251 sobre a expressão proteica de componentes do ECS. a) O

gráfico mostra expressão proteica do receptor CB_1, estatisticamente não há diferença entre os grupos b) O gráfico mostra a expressão proteica da enzima MAGL. Os grupos são: controle não estressado/Sal/Sal (n=4), CUS/Sal/Sal (n=5), CUS/AM251/Sal (n=4), CUS/Sal/VFX (n=4) e CUS/AM251/VFX (n=4). As barras representam média +EPM

- O antagonismo de CB_1 pelo tratamento crônico com AM251 apresentou efeito proliferativo, entretanto, o tratamento crônico com VFX não alterou a marcação para células BrdU+

Para avaliação do papel neurogênico da VFX, foi realizada imunomarcação para células positivamente marcadas com BrdU no giro denteado dos animais. Em nosso modelo, não observamos efeito do estresse sobre o parâmetro do número de células positivamente marcadas para BrdU/mm^3 no GD dos animais estressados em relação aos animais controle ($t_{(3.1)}$=1,8, p=0,157). Com relação ao fator tratamento, a análise por two-way ANOVA revelou que o tratamento com AM251 apresentou efeito sobre a marcação para células positivamente marcadas para BrdU ($F_{(1,10)}$= 6,4, p=0,03), o tratamento com VFX apresentou apenas uma tendência de efeito pró-proliferativo ($F_{(3,10)}$= 3,5, p=0,09) e houve interação entre os tratamentos ($F_{(1,10)}$= 19,3, p=0,001), indicando que a combinação de AM251 e VFX impediu o efeito proliferativo do tratamento isolado (Figura 12).

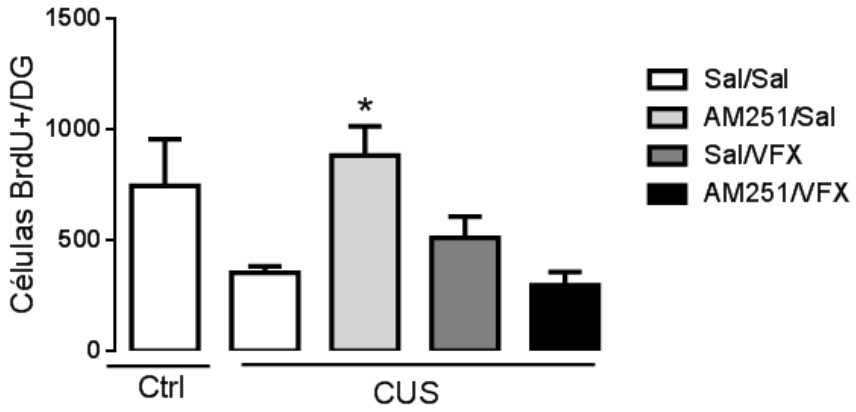


Figura 12: Proliferação celular no GD de camundongos cronicamente estressados e submetidos aos tratamentos com AM251 e/ou VFX durante 21 dias. De acordo com o gráfico, o estresse promoveu redução da marcação de células BrdU positivas, ou seja, reduziu a proliferação célula no GD, porém a VFX não foi capaz de reverter este fenótipo. O tratamento com AM251 aumentou a marcação de células BrdU positivas. * representa $p<0,05$ em relação ao grupo CUS/Sal/Sal. Os grupos são: Não-estressado/Sal/Sal (n=4), CUS/Sal/Sal (n=3), CUS/AM251/Sal (n=4), CUS/Sal/VFX (n=4) e CUS/AM251/VFX (n=3). As barras representam média +EPM.

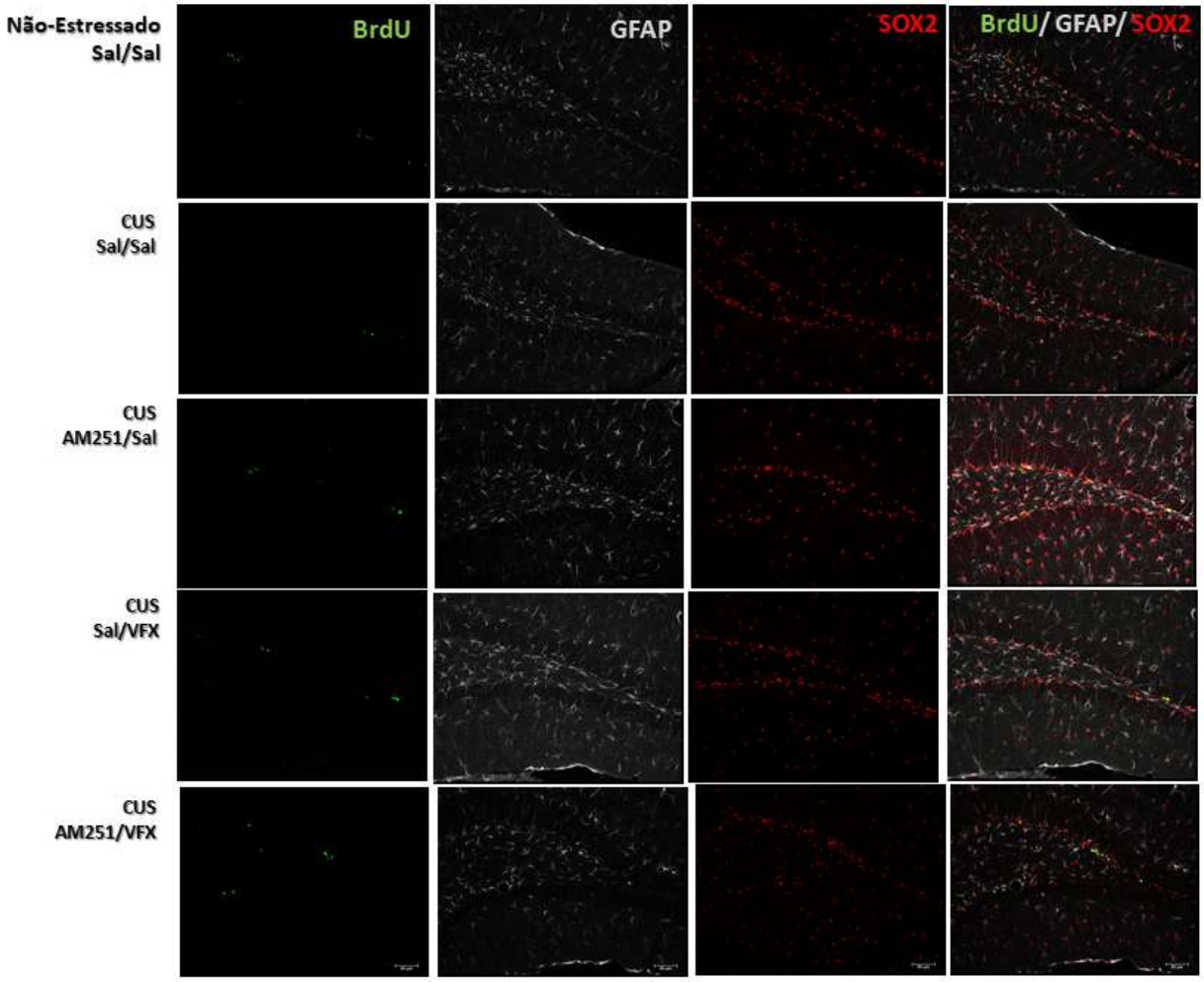


Figura 13: Fotomicrografia representativa de células BrdU positivas ($BrdU^+$) localizadas no giro denteado do hipocampo de camundongos não estressados tratados com salina (a) ou estressados durante 21 dias e tratados com salina (b), com AM251/Sal (c), com Sal/VFX (d) e com AM251/VFX (e). Microscópio confocal Leica no aumento de 20X. Barra representa escala de 50µm.

- Não houve efeito do estresse ou do tratamento em relação ao número total de células DCX na SGZ dos camundongos

Além do ensaio de proliferação celular pela imunomarcação de BrdU, realizamos também a imunomarcação de células DCX+ no giro denteado. Nossos resultados não indicaram efeito do estresse sobre o número total de células DCX+ ($t_{(16)}$=0,217, p=0,83). Além disso, com relação ao fator tratamento, a two-way ANOVA não revelou efeito de quaisquer do tratamento isolado sobre o número de células DCX+ presentes no giro denteado: AM251 ($F_{(1,11)}$ = 0,154, p>0,05) e VFX ($F_{(1,11)}$ = 2,635, p>0,05). No grupo CUS/AM251/VFX a análise não revelou interação entre os dois tratamentos ($F_{(1,11)}$ = 0,575, p>0,05). Neste grupo, entretanto, por análise visual pode-se observar uma atenuação do efeito isolado dos tratamentos, pois a quantidade total de células aparenta ser menor que a dos outros grupos (Figura 14a).

Ao analisar a camada granular no GD, é possível observar células positivamente marcadas com DCX em estágio de migração. A análise revelou que o fator estresse não apresentou efeito sobre este parâmetro, uma vez que a porcentagem de células DCX+ em migração é igual entre os grupos controle e estressado (t (17) =0,355, p=0,72). Além disso, a análise two-way ANOVA indicou que, para o fator tratamento não havia diferenças porcentagem entre nenhum dos grupos independente do tratamento: AM251 ($F_{(1,11)}$=1,362, p>0,05), da VFX ($F_{(1,11)}$= 0,051, p>0,05) ou da interação entre os dois tratamentos ($F_{(1,11)}$= 0,0116 p>0,05) (Figura 14b).

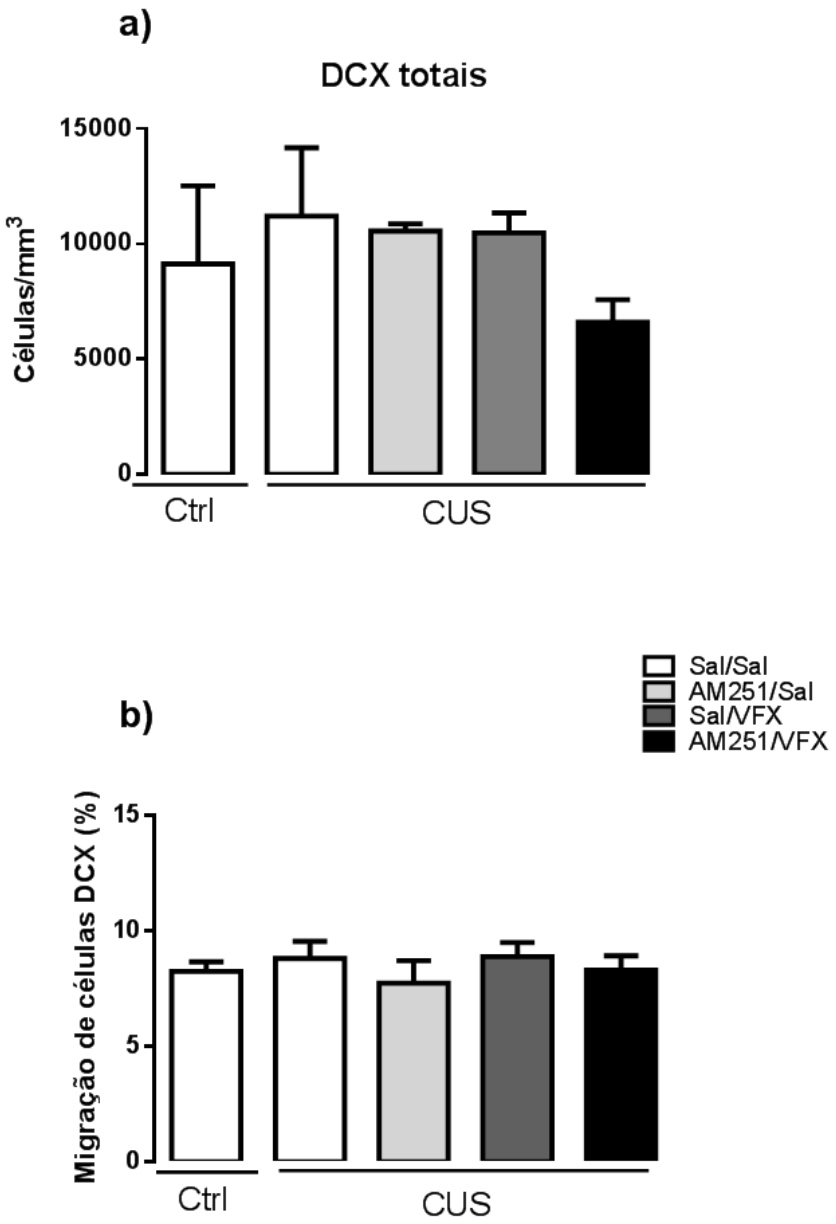


Figura 14: Células positivamente marcadas para DCX na SGZ de camundongos cronicamente estressados e tratados com AM251 e/ou VFX. a) O gráfico indica o número total de células no GD dos animais. Não foi observado efeito do estresse em alterar o número total de células, mas o tratamento de AM251 seguido por VFX aparenta reduzir a marcação para DCX+. b) O gráfico indica a porcentagem de células DCX+ em estágio de migração em relação ao número total de células encontradas. Aparentemente, os fatores estressem ou tratamento foram capazes de alterar a quantidade de células com capacidade de migração na camada granular do giro denteado do hipocampo. Os grupos são: Não-estressado/Sal/Sal (n=4), CUS/Sal/Sal (n=3), CUS/AM251/Sal (n=4), CUS/Sal/VFX (n=4) e CUS/AM251/VFX (n=4). As barras representam média +EPM.

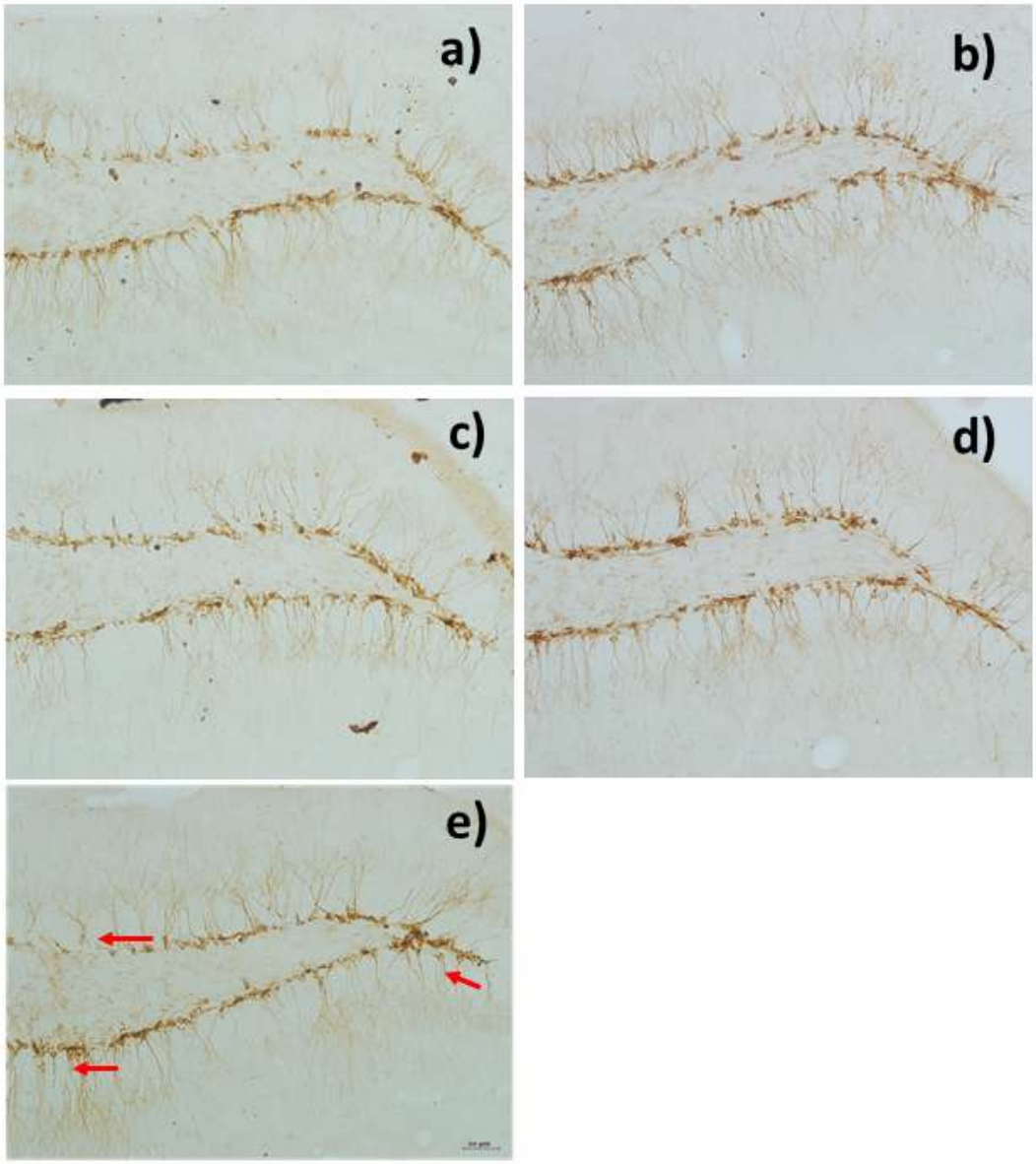


Figura 15: Fotomicrografia representativa de células doublecortin positivas (DCX^+) localizadas no giro denteado do hipocampo de camundongos não-estressados e tratados com salina (a) ou submetidos ao protocolo de 21 dias de CUS e tratados com salina (b), com AM251/Sal (c), com Sal/VFX (d) e com AM251/VFX (e). As setas indicam as células DCX+ que migraram da SGZ para a camada granular do giro denteado de camundongos Microscópio de luz (Olympus) no aumento de 20X. Barra representa escala de 50μm.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Em nosso modelo de CUS por 21 dias , animais tratados com VFX apresentaram comportamento tipo ansioso reduzido no teste do NSF. Observamos também que este AD evocou modulações positivas na expressão proteica do receptor CB_1 e da enzima MAGL, indicando uma possível facilitação da sinalização canabinoide. Além disso, houve aumento da expressão proteica da neurotrofina BDN. Em nosso modelo, o estresse apresentou efeito, redutor sobre a frequência de limpeza da região facial nos animais e aumentou a frequência deste comportamento no dorso, em alterar os outros comportamentos avaliados. Esta modificação no perfil de autolimpeza dos animais sugere que nosso modelo de estresse seja capaz de evocar comportamento do tipo depressivo nos animais. O tratamento com VFX foi capaz de prevenir este comportamento tipo depressivo, no entanto, o pré-tratamento com AM251 não bloqueou o efeito da VFX. Da mesma forma, o tratamento com VFX reduziu a latência para os animais se alimentarem no NSF, indicando efeito tipo ansiolítico, o qual, novamente, não foi bloqueado pelo pré-tratamento com AM251. Em conjunto estes resultados sugerem que os efeitos tipo antidepressivo e tipo ansiolítico da VFX não dependem da ativação do receptor CB_1. Com relação à neuroplasticidade, não observamos efeito do estresse sobre a proliferação celular no GD dos animais estressados, marcado pelas células BrdU+, em relação aos animais controle. Além disso, também não houve efeito do estresse em relação ao número total de células DCX+ ou em relação à porcentagem de células em estágio de migração. Curiosamente, o antagonismo de CB_1 pelo tratamento crônico com AM251 foi capaz de promover efeito proliferativo no GD dos animais, de maneira mais robusta que o tratamento com a VFX. De maneira mais interessante, no grupo que recebeu a combinação de tratamentos (AM251 + Venlafaxina), os efeitos no nicho neurogênico são atenuados. Os tratamentos realizados não apresentaram efeito sobre a expressão de células DCX+ totais ou em migração.

Inicialmente, em nossa curva dose-resposta, não observamos efeito do estresse na latência para se alimentar no NSF, ou seja, não havia diferença no comportamento tipo ansioso nos animais estressados em relação ao controle. Diversos grupos reportaram que, após protocolos de CUS acima de 14 dias, o efeito tipo ansioso poderia ser observado nos animais estressados, inclusive nos resultados obtidos por Aguiar (em preparação). As razões pelas quais isso não se repetiu em nosso modelo podem ser de várias origens. Uma delas seria, por exemplo, o fato de

que alguns estudos mostram que o sexo do experimentador pode influenciar na resposta apresentada pelo animal. Com relação ao estresse, sugere-se que ratos e camundongos apresentem maiores níveis de estresse quando manipulados por experimentadores do sexo masculino (KATSNELSON, 2014). De maneira semelhante à literatura, em nosso laboratório foi observado que, no modelo de subjugação social (do inglês: *Social Defeat Stress*, SDS*)* este efeito do fator sexo é bem pronunciado e aparece mais claramente quando o experimentador é do sexo masculino. Desta forma, isto poderia ser um fator relevante para nossos resultados. Deve-se considerar também que possivelmente os animais estavam em situação de estresse no biotério em que ficaram alojados, além das condições impostas pelo modelo de CUS. Isto pode ser observado pela alta latência no NSF até mesmo nos animais controle, podendo ser responsável por um efeito máximo de estresse no teste, o qual não seria passível de distinção em relação aos animais CUS/Sal.

Uma outra questão relevante é o fato de que, como pode ser observado no gráfico (Figura 5a), houve uma grande dispersão dos dados entre o grupo de animais controle tratados com veículo, principalmente observando-se que metade dos animais não comeram no tempo limite de teste (600s). Deve-se considerar que, devido à um erro pessoal em pedir um número adequado de animais e à uma morte que ocorreu na gaiola moradia (possivelmente devido à brigas entre os animais), o grupo estressado tratado com veículo (CUS/Sal) apresentava um *n* menor em todos os testes desta série experimental, contribuindo para grande dispersão de dados também neste grupo experimental. Além disso, há que se considerar que optamos por não adicionar os grupos de animais não-estressados e tratados. Esta decisão se fundamenta principalmente em dois fatores: a) por termos baseado o delineamento experimental no estudo de David e colaboradores (DAVID et al., 2009), no qual o efeito de recrutamento neurogênico da Fluoxetina ocorria apenas em animais estressados. Nesse sentido, a opção de reduzir os grupos experimentas reside no fato de que nossa pergunta experimental é voltada para os impactos do tratamento com antidepressivos especificamente em animais estressados. E, além disso, b) por haver comprometimento de nosso laboratório com os 3 R´s dos objetivos éticos da experimentação animal em Substituir (*Replacement*), Reduzir (*Reduce)* e Refina (*Refinement*), trabalhamos sempre com o menor número de grupos possível.

A grande variabilidade entre os grupos e o fato de o grupo CUS/Sal apresentar um *n* menor que os demais podem ser responsáveis pelo comprometimento da análise do efeito do

estresse, na medida em que os modelos comportamentais são afetados pelas condições basais dos animais e que a análise estatística depende de um número adequado de indivíduos, para que seja possível uma performance da ANOVA mais específica ajustada aos graus de liberdade. Deste modo, a análise estatística pode ter sido comprometida e mascarado o efeito do estresse entre os grupos. Uma possível abordagem em experimentos futuros seria, por exemplo, aumentar este *n* e analisar os dados quanto à presença de indivíduos resilientes e susceptíveis ao estresse, de forma a poder avaliar o efeito comportamental do estresse de maneira mais refinada.

Com relação ao efeito do tratamento no NSF, observamos que a VFX foi capaz de evocar redução na latência para se alimentar no teste em todas as doses testadas. É relevante destacar que o efeito da VFX foi observado mesmo na condição de os dados terem se apresentado de maneira altamente dispersa graficamente, indicando um robusto efeito tipo ansiolítico do fármaco. Para iniciar nosso experimento de construção de curva dose-resposta baseamos a escolha das doses no estudo de Venzala e colaboradores, cujos resultados mostram que o tratamento crônico com VFX na dose de 20mg/kg elicita efeito tipo ansiolítico no NSF em camundongos estressados no modelo homotípico de SDS (VENZALA et al., 2012). Neste sentido, nossos resultados estão de acordo com o encontrado por Venzala e seu grupo, já que a dose de 20mg/Kg apresenta efeito semelhante ao que é encontrado na literatura.

Em relação ao comportamento do tipo depressivo, nossos resultados não indicaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estressado e controle nos parâmetros de latência para iniciar a autolimpeza, tempo total deste comportamento ou tempo gasto na limpeza da região facial e dorsal. A literatura indica que, após serem submetidos ao modelo de CUS, sejam eles com longa duração, de sete semanas (INSINGRINI et al, 2010), ou mesmo em modelos mais curtos, de apenas duas semanas (DUCOTTET et al, 2004) os camundongos apresentam comportamentos tipo depressivo no ST, porém não foi o que observamos na análise estatística. As razões para isso podem ser explicadas de maneira semelhante ao que ocorreu em relação ao NSF, uma vez que ambos os testes ocorrem sob o mesmo protocolo de estresse e tratamento, de modo que a alta dispersão de dados, estresse basal dos animais e características do experimentador poderiam interferir na resposta obtida. Em relação ao tempo para o início da autolimpeza, apesar da ausência de diferença estatística, pode-se observar que o grupo estressado, mas não tratado com VFX, apresenta maior variabilidade nos dados e uma maior latência em relação ao grupo de animais controle. Este comportamento pode ser entendido como uma

característica semelhante ao fenótipo tipo depressivo. Neste sentido, o tratamento crônico com VFX nas doses de 20 e de 40mg/kg apresentam menor variabilidade nos quatro parâmetros analisados do ST e um tempo semelhante ao do controle (Figura 4). Nossos resultados estão de acordo com o estudo de Venzala e colaboradores, supracitado, o qual demonstrou efeito tipo antidepressivo da VFX na dose de 20mg/Kg, porém, utilizando outro modelo para avaliação do comportamento tipo antidepressivo que é o de Nado Forçado. Sendo assim, ambos os estudos indicam que a VFX evoca importante efeito do tipo antidepressivo nos animais testados, seja em modelo de estresse homotípico ou heterotípico e utilizando métricas distintas para avaliar o mesmo tipo de comportamento.

Além dos efeitos comportamentais, observamos também alterações na expressão de proteínas do ECS, bem como da expressão proteica de BDNF. Apesar de que o único dado com diferença estatisticamente significante seja o da expressão da MAGL na dose de 10mg/Kg, por análise visual pode-se observar que todas as doses testadas de VFX aumentaram a expressão do receptor CB_1 e que as doses de 20 e de 40mg/Kg aumentaram a expressão de BDNF. Em nossos ensaios ocorreram problemas técnicos com a transferência das membranas, o que causou muita variabilidade dentro dos testes, o que pode ter prejudicado a análise estatística. A repetição do protocolo visando aumento do *n* experimental e correção dos problemas técnicos enfrentados poderia ser útil para que pudéssemos afirmar com mais clareza como estas proteínas estão sendo moduladas em nosso modelo. De acordo com o estudo de Smaga e colaboradores, o tratamento crônico com AD´s é capaz de elevar os níveis hipocampais de AEA e de 2-AG, o que poderia estar ocorrendo em nosso modelo. Além disso, a literatura demonstrou que a ativação de receptores CB_1 pode levar a alterações na sua expressão (SCHLOSBURG et al., 2010). Esta ativação pode ocorrer por meio da administração de canabinoides exógenos ou pelo aumento da sinalização dos eCB´s, principalmente do 2-AG, agonista total dos receptores CB_1. Desta forma, foi observado que a administração crônica de JZL184, um inibidor da MAGL cuja consequência direta é o aumento de 2-AG, é capaz de evocar dessenssibilização dos receptores CB_1 com paralelo aumento de expressão gênica do receptor. A inibição da FAAH, todavia, não apresenta o mesmo efeito que a inibição da MAGL (SCHLOSBURG et al., 2010). No mesmo sentido, o tratamento com agonistas do receptor TRPV1, como AEA e capsaicina, é capaz de gerar sua dessenssibilização, mas não há estudos que mostrem este efeito após inibição da FAAH ou da MAGL. No entanto, além dos níveis de eCBs, em nosso modelo seria interessante avaliar outras

proteínas do ECS, verificando, por exemplo, a expressão da enzima FAAH e das proteínas *downstream à* ativação dos receptores, como por exemplo as vias de ERK/AKT e mTOR, as quais são alvo de modulação tanto de protocolos de estresse crônico como também do tratamento com antidepressivos (FUMAGALLI et al., 2009; LI et al., 2010; MORETTI et al., 2014).

Além disso, conforme exposto acima, a literatura correlaciona o aumento da sinalização do ECS à facilitação da neurogênese. Neste sentido, nossos resultados de expressão proteica do BDNF de maneira paralela a um possível aumento da sinalização canabinoide pelo tratamento com VFX pode indicar, ainda que de maneira simplificada, um possível efeito próneurogênico da VFX. Considerando que a dose efetiva de VFX a 20mg/Kg foi responsável por efeitos comportamentais nos dois testes utilizados, bem como pela modulação proteica analisada, optamos, portanto, por utilizá-la nas próximas etapas do estudo.

Uma forma simplificada de converter doses utilizadas em estudos pré-clínicos em doses clínicas é a determinação da Dose Equivalente em Humanos (do inglês: Human Equivalent Dose, HED), a qual estima uma correlação a partir do peso corpóreo, e de fatores de correção (Km) que levam em consideração diferenças nas taxas metabólicas de animais (NAIR; JACOB, 2016). Estes fatores de correção são estimados dividindo-se a média de peso corporal da espécie (Kg) pela média de área corporal da espécie (m2), de tal forma que a equação fica:

$$HED\ (mg/Kg) = Dose\ Animal\ \ (mg/Kg) x\ (Km\ \ Animal\ /\ Km\ Humano) \qquad (Eq\ 1);$$

Para humanos estima-se um Km=37 (=60Kg/1,62m2) e para camundongos estima-se Km~3 (=0,02Kg/0,007m2). Aplicando a dose de VFX escolhida à equação, temos que:

$$HED\ (mg/Kg) = 20\ mg/Kg\ x\ (3/37) = 1{,}62;$$

Considerando um indivíduo de 65Kg, a dose de 20mg/Kg, em humanos, seria correspondente a 1,62mg/Kg x 60Kg = 105mg. Nesse sentido, é relevante destacar que a VFX apresenta um perfil inibitório dose-dependente sobre as vias monoaminérgicas, ou seja, inibe a recaptação da 5-HT, em doses baixas; de NA em doses altas (>75mg) e de DA em doses mais

elevadas (>150mg) (HARVEY; RUDOLPH; PRESKORN, 2000; SHANG et al., 2007). Esta caracterítica farmacodinâmica sobre as vias monoaminérgicas se traduz, clinicamente, em um efeito mais rápido do tratamento com VFX quando administrado em em doses altas, >300mg/dia, em comparação à doses inferiores, de 75mg/dia (RUDOLPH et al., 1998). No estudo prévio de nosso laboratório, foi demonstrado que o antagonismo de CB_1 é capaz de abolir os efeitos antidepressivos, mas não os ansiolíticos, do Escitalopram, um ISRS (Aguiar et al, em preparação), de tal forma que, dentro do contexto do trabalho atual, é relevante que seja utilizada uma dose de VFX capaz de modular vias monoaminérgicas de maneira ampla, e não apenas da 5-HT, para efeito de comparação do papel modulador do ECS sobre efeitos antidepressivos de fármacos AD´s de classes distintas. Portanto, teoricamente embasados por estudos clínicos e pelas ferramentas de conversão de dose, podemos considerar que a dose de VFX escolhida é capaz de inibir a recaptação de 5-HT e também de NE, servindo ao propósito de nosso estudo. Nosso próximo passo foi averiguar se os efeitos observados pelo tratamento crônico com VFX na dose de 20mg/Kg eram recuperados em animais pré-tratados com AM251, um agonista inverso de CB_1, na dose de 0,3mg/Kg, a mesma utilizada no estudo de Aguiar.

Ao avaliarmos o peso corporal destes animais, observamos que a média de peso deles era de aproximadamente 30g, indicando que nestes animais não havia o viés de desnutrição, como observado nos animais do experimento II (Apêndice 1). Em nossos experimentos o grupo mais susceptível à perda de peso induzida pelo estresse foi o grupo tratado AM251/Sal. De acordo com a literatura, tal resultado não seria inesperado visto que a ablação genética ou antagonismo farmacológico do receptor CB_1 apresentam reconhecido efeito anorexigênico (LAZZARI et al., 2011; SHEARMAN et al., 2003) (LEDENT et al., 1999; ZIMMER et al., 1999). Além disso, o grupo tratado com AM251/VFX não apresentou perda de peso tão proeminente, indicando uma possível relação entre o *status* de estresse do indivíduo com o efeito anorexigênico do AM251. No entanto, são escassos os estudos que correlacionam o papel do ECS sobre a regulação da ingestão alimentar e do metabolismo energético perante situações de estresse crônico e tratamento com AD´s, limitando maiores discussões em torno deste resultado.

Com relação aos comportamentos do tipo ansioso, avaliado pela latência em se alimentar no NSF, nesta terceira série experimental não observamos efeito do estresse em relação aos animais controle, possivelmente devido às questões já citadas anteriormente. É interessante pontuar que a latência para se alimentar no NSF observada nesta série foi menor que a latência

dos animais provenientes do Campus de Ribeirão Preto, possivelmente devido a diferenças intrínsecas em relação aos animais originais do biotério de criação do CEMIB. Neste experimento, os animais do grupo CUS/Sal/Sal apresentaram grande dispersão nos dados, o que pode ter sido responsável pelo mascaramento do efeito do estresse neste parâmetro. Ainda assim, neste protocolo foi possível replicar o efeito tipo ansiolítico da VFX na dose de 20mg/Kg, uma vez que, novamente, esta dose evocou redução na latência para se alimentar no teste. Além disso, o pré-tratamento com AM251 não foi capaz de impedir tal efeito. No trabalho de Aguiar (em preparação), foi encontrado um resultado similar, no qual o efeito tipo ansiolítico do Esc não foi impedido pelo pré-tratamento com AM251 na mesma dose. Estes resultados sugerem que Esc, um ISRS, e VFX, um IRNS, parecem não depender da ativação do receptor CB_1 para exercer seu efeito tipo ansiolítico. No entanto, ambos os trabalhos abrem outras questões, como por exemplo, entender "se" e "como" o receptor CB_2 poderia participar da resposta gerada pelo AD. Sendo assim, para efeito de comparação dos mecanismos de ação dentro deste contexto, seria interessante a realização de ensaios futuros referentes ao antagonismo de CB_2, por exemplo com pré-tratamento om dose inefetiva de AM630, de maneira semelhante à que está sendo conduzida por Aguiar.

Além disso, como citado na introdução, há uma importante interdependência do sistema serotoninérgico com o ECS, denotado principalmente pela participação do receptor 5-HT_{1a} em regular a ativação do receptor CB_1. No entanto, este mecanismo poderia ser influenciado pela participação de outros sistemas de neurotransmissão, como a sinalização canabinoide. Sob esta perspectiva, em nosso modelo, seria interessante avaliar se o efeito tipo ansiolítico da VFX permanece na presença de antagonismo simultâneo de CB_1 e de 5-HT_{1a}, com pré-tratamento com AM251 e WIN55,212-2.

Em nosso modelo, foi possível observar um efeito tipo-depressivo do protocolo de estresse no Splash-test, uma vez que houve desestruturação do comportamento de *grooming* nos animais estressados, como observado através da redução no tempo dispendido em autolimpeza na região facial dos camundongos do grupo CUS/Sal/Sal. É necessário considerar que entre o protocolo estabelecido para a construção da curva-dose e este do antagonismo residem pequenas diferenças no protocolo, já que durante a construção da curva dose-resposta os animais receberam apenas uma injeção diária e no protocolo com antagonismo os animais receberam duas injeções diárias. Há que se considerar estas diferenças, na medida em que a manipulação dos animais é um

fator de estresse, ainda que a pratiquemos de maneira respeitosa e cuidadosa (BALCOMBE; BARNARD; SANDUSKY, 2004; GOUVEIA; HURST, 2013). Sendo assim, nos animais mais frequentemente manipulados, podem haver alterações na resposta ao estresse, que justificariam a diferença na resposta ao estresse entre os protocolos I e III.

Com relação ao efeito do fator tratamento, observamos que a VFX foi capaz de aumentar a frequência do comportamento de autolimpeza na região da face, assim como o tratamento apenas com AM251 (CUS/AM251/Sal), indicando um efeito tipo antidepressivo da VFX em nosso modelo. O pré-tratamento com AM251 não interferiu na resposta observada, indicando que o efeito tipo antidepressivo da VFX não depende da ativação de CB_1. Entretanto, no trabalho de Aguiar (em preparação), o efeito tipo antidepressivo do Esc observado no TST foi abolido pelo pré-tratamento com AM25. Considerando que o Esc é um ISRS, e que a literatura evidencia uma complexa modulação interdependente entre CB_1 e as vias serotoninérgicas, principalmente mediado por 5-HT_{1a}, como citado na introdução, parece provável que o comportamento tipo antidepressivo evocado pelo Esc seja dependente da ativação do receptor CB_1 porém, nossos resultados com VFX sugerem que para este fármaco isso não ocorra do mesmo modo.

Além disso, assim como no trabalho de Aguiar, Hill e colaboradores observaram que a desipramina, cujo principal efeito é sobre a recaptação de NE, perde seus efeitos quando há pré-exposição ao antagonista de CB_1 (HILL et al., 2006). Algumas linhas de evidência sugerem a modulação do ECS em relação a comportamentos emocionais e a resposta ao estrese se deva, pelo menos em parte, à sua regulação sobre o Locus Coeruleus (LC), principal fonte de neurotrasmissão noradrenérgica para o PFC e responsável por diversas funções aquisição de memória, vigilância e respostas ao estresse (ASTON-JONES et al., 1996; WYROFSKY; MCGONIGLE; VAN BOCKSTAELE, 2015). Estudo com agonista WIN 55,212-2 demonstrou que a ativação de CB_1 é capaz de aumentar os disparos espontâneos de neurônios noradrenérgicos no LC e reduzir a inibição de neurônios noradrenérgicos no LC (MUNTONI et al., 2006). Sendo assim, a relação entre Desipramina e CB_1 também aparenta sem bem clara.

Dentro deste contexto, as diferenças entre os resultados de Hill, de Aguiar e do presente trabalho poderiam ser explicadas meramente pelas distintas abordagens em avaliar o efeito do antidepressivo e pelas diferenças metodológicas do protocolo. O trabalho de Hill, por exemplo, utiliza um modelo homotípico, estresse por restrição, cujos efeitos apresentam efeitos neurobiológicos distintos daqueles observados em modelos de estresse heterotípico, como o CUS,

aplicado no estudo de Aguiar e em nosso estudo. Uma interessante revisão de Morena e colaboradores indica que modelos de estresse homotípico possuem efeitos mais consistentes sobre a sinalização canabinoide que modelos de estresse heterotípico ou modelos de estresse agudo. Desse modo, para o início das respostas ao estresse, em modelos homotípicos de estresse, haveria aumento da expressão de FAAH com consequente redução do tônus inibitório de AEA. Nesse sentido, os efeitos observados a partir de modelos heterotípicos são menos estabelecidos na literatura (MORENA et al, 2016)

Para além destas diferenças, contudo, deve-se levar em consideração que tanto o Esc como a Desipramina agem de maneira mais específica sobre as vias de neurotransmissão monoaminérgicas. Em contrapartida, a VFX possui mecanismo de ação amplo sobre a neurotransmissão serotonérgica, noradrenérgica, e até mesmo em outras vias monoaminérigicas. Esta ampla modulação poderia explicar as observações encontradas em nosso modelo. Assim, os efeitos tipo ansiolítico e tipo antidepressivo da VFX poderiam ocorrer de modo independente de CB_1, propriamente dito, e não apenas por diferenças metodológicas, uma vez que haveria um complexo conjunto de vias sendo moduladas simultaneamente pela VFX, diferente do que é observado para o Esc e para a Desipramina. Neste sentido, seria interessante em nosso trabalho investigar a relevância do papel modulatório dos sistemas envolvidos de maneira individualizada em relação à ativação do receptor CB_1. Sendo assim, uma abordagem interessante seria realizar um protocolo com antagonismo de CB_1 concomitantemente ao antagonismo de5-HT_{1a}, para investigar se há relação entre a ativação de CB_1 e de sua modulação pelo receptor 5-HT_{1a} para que a VFX exerça seus efeitos. Além disso, poderia ser avaliado em animais KO para receptores de NA hipocampais se o efeito da VFX permanece intacto perante pré-tratamento com AM251.

Em nossos resultados, é curioso o fato de que o AM251 tenha apresentado uma tendência de efeito do tipo antidepressivo. A dose escolhida para testar esta droga foi baseada nos estudos prévios de Fogaça e colaboradores que, através de uma curva dose resposta, determinou a menor dose inefetiva do AM251 utilizando o teste do NSF (FOGAÇA et al, 2018). Entretanto, não se pode garantir que a dose inefetiva em um teste também será inefetiva em um outro modelo. Isto porque se trata de testes distintos, cujos efeitos são evocados a partir de diferentes substratos neurais, bem como de animais de origens distintas.

Para além das diferenças metodológicas, constam na literatura outros estudos em que o tratamento com AM251 foi capaz de evocar comportamento tipo-antidepressivo, ainda que sejam

em modelos de tratamento agudo e que utilizam métricas distintas para a avaliação do efeito, no caso o teste de Suspensão pela Cauda (do inglês: *Tail Suspensin Test*, TST) (HILL; GORZALKA, 2005; SHEARMAN et al., 2003). Frente aos dados apresentados na introdução, parece inusitado esta tendência a efeito tipo antidepressivo do antagonismo de CB_1. Entretanto, são vastos os exemplos de que, muitas vezes, os efeitos comportamentais e moleculares da modulação do ECS parecem contraditórios em relação a parâmetros experimentais semelhantes, demonstrando a complexidade do potencial neuromodulatório deste sistema. Por exemplo, tanto a ativação dos receptores do ECS, por meio do uso de agonistas, quanto seu antagonismo podem evocar comportamento do tipo ansiolítico e do tipo antidepressivo. No estudo de Patel e Hillard (2006) o tratamento com WIN 55212-2, um agonista CB_1, aumentava a permanência dos camundongos nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevada (PATEL; HILLARD, 2006). Além de comportamento tipo ansiolítico, também foi reportado que o WIN 55212-2 apresenta efeito tipo antidepressivo no TST (BAMBICO et al., 2007) No mesmo sentido, Campos e colaboradores demonstraram que os efeitos ansiolíticos do CBD eram dependentes da ativação do receptor CB_1 (CAMPOS et al., 2013). Em contrapartida, Haller e colaboradores demonstraram que tanto a ablação genética de CB_1 como o antagonismo deste receptor são capazes de evocar comportamento tipo ansiolítico nos animais (HALLER et al., 2002).

Além das alterações comportamentais, nosso estudo incluía avaliação da modulação de parâmetros neurogênicos nos animais submetidos ao estresse e tratamento com VFX precedida, ou não, pelo tratamento com AM251. Nossos resultados não indicaram diferenças significativas na proliferação celular no giro denteado dos animais cronicamente estressados em relação aos animais controle. A literatura aborda o impacto negativo do estresse sobre a proliferação celular, como observados em diferentes modelos de estresse crônico sejam eles de origem homotípica como o modelo de SDS (CZEH et al., 2001; MITRA et al., 2006;) e o modelo de estresse de restrição (VEENA et al., 2009; PHAM et al., 2003) ou ainda no modelo heterotípico de CUS (XU et al., 2009; ZHANG et al 2015). Recentemente, nosso grupo demonstrou de maneira inédita que a marcação de células Ki67, um marcador endógeno expresso durante todas as fases proliferativas do ciclo celular, é reduzida após um protocolo de CUS de apenas 7 dias, indicando que os efeitos do estresse sobre a proliferação celular podem ocorrer primariamente às alterações comportamentais (DETONI, 2018). Um aumento do *n* experimental deste ensaio poderia contribuir para maior poder estatístico em encontrar diferenças, visto que de acordo com o

gráfico de proliferação (Figura 12) o grupo estressado não-tratado apresenta, visualmente, um perfil de redução na proliferação celular no GD.

Em nosso estudo, observamos também que o tratamento crônico com VFX apresentou apenas uma tendência a reverter o efeito deletério do estresse sobre a proliferação. Nossos resultados não replicam o exato efeito pró-proliferativo encontrado na literatura. Em comparação ao estudo de Zhang, o tratamento crônico com VFX na dose de 15mg/Kg apresenta claro feito protetor sobre a proliferação celular. Como a estatística indica tendência de efeito proliferativo em nosso modelo, eventualmente, a repetição do protocolo poderia revelar se este efeito poderia ocorres em nosso modelo. Em contrapartida, o tratamento crônico com AM251 promoveu claro efeito proliferativo na SGZ dos camundongos estressados. Este efeito parece inusitado frente ao exposto na introdução. Entretanto, estudo prévio de Fogaça e colaboradores encontrou o mesmo efeito após tratamento crônico com AM251 em animais cronicamente estressados (FOGAÇA et al, 2018).

Observando os efeitos aparentemente "contraditórios" do ECS, podemos entendê-lo atuando sempre no sentido de retomar a homeostase. A literatura sugere que o ECS cria um balanço entre seus agentes que regulam o início e o término de seu efeito de maneira dinâmica e orquestrada no sentido de retornar à homeostase, como detalhado pela revisão de Morena e colaboradores (2016). Considerando esta complexa dinâmica, nossos resultados podem indicar que, após a inativação do receptor CB_1 por meio de seu antagonismo, o balanço da sinalização dos endocanabinoides poderia ser desviado no sentido de atuar pela sinalização mediada pelos receptores CB_2. Estudo de Manzanares e colaboradores utilizando camundongos que superexpressam CB_2 (CB2xP) demonstrou que estes animas apresentam comportamentos tipo ansiolítico no NSF e tipo anti-depressivo no TST. Além disso, este estudo demonstrou em animais *WT* que o tratamento crônico com AM630, antagonista CB_2 prevenia os efeitos do CUS sobre os comportamentos tipo-depressivos e sobre a expressão da neurotrofina BDNF (GARCÍA-GUITIÉRREZ et al, 2010). Este estudo reforça a ideia de que o sistema pode desviar a sinalização entre os receptores "disponíveis" perante determinado contexto. Desta forma, em nosso modelo, uma forma de testarmos a hipótese de que haveria desvio para a sinalização mediada por CB_2 seria adicionarmos em experimentos futuros grupos experimentais tratados com uma combinação dos antagonistas AM251 e AM630 ao mesmo tempo.

Além dos efeitos comportamentais mediados por CB_2, com relação aos seus efeitos sobre o nicho neurogênico há que se considerar que, perante o bloqueio de CB_1 pelo AM251, a presença de receptores CB_2 nos progenitores neurais e nas outras células presentes na SGZ poderiam atuar no sentido de prevenir a redução dos níveis de proliferação nesta região. Apesar de serem escassos os estudos que associam efeito proliferativo do receptor CB_2 diante de modelos de estresse, um interessante trabalho do grupo da Dra. Avrahan demonstrou que a administração de AM1241, um agonista CB_2, preveniu a redução da proliferação celular na SGZ e reduziu a citotoxicidade induzidas pela exposição à glicoproteína Gp120 derivada do isotipo 1 do vírus HIV (HIV-1) ((AVRAHAM et al., 2014). Este estudo sugere, portanto, que perante uma situação antiproliferativa, como o estresse ou uma infecção, a ativação de receptores CB_2 poderia evocar efeito neuroprotetor e pró-neurogênico (AVRAHAM et al., 2014).

Diferentemente dos efeitos comportamentais e de modo curioso, com relação à proliferação celular avaliada em nosso modelo, o tratamento com AM251 previamente à VFX apresentou um efeito atenuador sobre a proliferação celular evocada pelos fármacos isoladamente. Esse efeito da combinação de tratamentos crônicos do AM251 com uma droga com efeito tipo antidepressivo foi observado de maneira semelhante no trabalho de Fogaça e colaboradores. Neste estudo, o efeito proliferativo do tratamento crônico com CBD em animais estressado foi atenuado pelo pré-tratamento com AM251 (FOGAÇA et al., 2018). Considerando que o tratamento com ADs, como a VFX, e com antagonistas de CB_1, como o AM521, podem modular a expressão de componentes do ECS, como o receptor CB_1 e a enzima MAGL, pode-se sugerir quando administradas no mesmo animal, ambas as drogas, VFX e AM251, alterem o balanço da sinalização canabinóide promovendo um aumento da proliferação de maneira mais discreta que o tratamento isolado. Além da sinalização canabinóide, a VFX também pode alterar outras vias de sinalização que podem estar relacionadas à alteração no perfil pro-neurogênico. Nossos resultados de expressão proteica sugerem que possa haver aumento da expressão de BDNF hipocampal após tratamento com VFX, apesar de não ter sido estatisticamente significativo. Sabe-se que o BDNF é um importante regulador das LTP´s e que *inputs* estimulatórios no nicho neurogênico são fatores facilitadores da neurogênese. Ilustrando essa observação, no mesmo sentido de nossos resultados, um estudo do grupo de Cooke e colaboradores demonstrou que o tratamento com VFX durante 3 semanas é capaz de aumentar a

expressão hipocampal de BDNF e paralelamente inibir as LTP´s nessa região (COOKE et al., 2009).

Além de progenitores neurais, a marcação de BrdU associada a outros marcadores pode ser utilizada para identificar tipos celulares de diferentes etapas de neurogênese no mesmo ensaio, conforme mostra a Figura 1. Em nosso trabalho, a imunomarcação com BrdU foi acompanhada de marcação para Sox2 e GFAP (Figura 12), entretanto até o momento não foi possível finalizar toda a análise da imunohistoquímica. Essa tripla marcação permite diferenciar outros subtipos celulares que podem estar sendo modulados pelo estresse e/ou pelo tratamento crônico com a VFX, de maneira mais refinada que a marcação única para BrdU Nesse sentido, será possível avaliar, por exemplo, se a proporção de células triplamente marcadas difere entre os grupos, revelando o impacto de nosso protocolo de modo específico sobre a divisão simétrica de células do tipo 1 no nicho. Além disso, poderemos avaliar a proporção de células marcadas apenas por SOX2/BrdU, evidenciando, assim, se a proporção de divisões assimétricas, que geram células tipo 2, foi alterada por algum dos parâmetros de nosso modelo.

Além da proliferação, analisamos também a população celular positivamente marcadas com *Doublecortin* (DCX+), uma proteína de microtúbulos intimamente associada ao fenótipo neuronial imaturo, tipos 2b e 3, e a capacidade de migração das células durante a neurogênese. Em nosso modelo não encontramos diferenças com relação ao número total de células nem em relação à fração das células em estágio de migração. Apesar da ausência deste efeito em nosso modelo, a literatura indica que o estresse promove impacto negativo sobre a expressão de células DCX+, como evidenciado pelos estudos de Oomen que demonstra, utilizando um modelo de CUS por 21 dias, semelhante ao aplicado em nosso estudo, uma redução do número de células com este fenótipo celular em ratos. Foi demonstrado que o CUS é capaz de reduzir o número total de células DCX+, bem como a porcentagem das células DCX+ em estágio de migração, até mesmo em protocolos mais curtos, de 14 dias (FOGAÇA et al., 2018). Entretanto, em termos morfofuncionais, são escassos os dados na literatura que abordem o exato papel das células DCX+ durante os processos neurogênicos, exceto com relação à sua clara habilidade migratória. Neste sentido, Kempermann e colaboradores indicam que as células DCX+ podem ser responsáveis por uma complexa modulação do microambiente nos nichos neurogênicos, por exemplo, mediando padrões de conectividade entre diversas regiões do GD (KEMPERMANN, 2015). Ilustrando estas observações, o grupo de Wang e colaboradores demonstraram que a

arborização dendrítica de células DCX+ de camundongos cronicamente estressados e tratados com FLX, um ISRS, aparenta ser mais complexa sem, entretanto, alterar o número total destas células. Este estudo sugere que a quantidade de células DCX+ não necessariamente está relacionada aos seus impactos sobre o microambiente e nem aos seus efeitos comportamentais, sendo que a modulação da microestrutura promovida por este subtipo celular seria mais relevante para os efeitos do antidepressivo do que seu número absoluto (WANG et al., 2008).

Neste sentido, embora não tenhamos observado efeito em nosso modelo de tratamento em relação aos parâmetros de marcação total de células DCX+ ou em relação à razão de células pertencentes a este fenótipo, sua participação nos efeitos do tipo ansiolítico e do tipo antidepressivo observados, podem estar associados à complexa e diversa variedade eventos celulares, que em conjunto, recrutariam comportamentos defensivos contra a situação de estresse imposta. Portanto, no contexto de nosso trabalho, seria interessante realizarmos análises futuras com relação à diferentes subpopulações marcadas por DCX, por meio de técnicas de colocalização, ou ainda avaliar a complexidade da arborização dendrítica nestas células.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados parecem ir parcialmente contra nossa hipótese inicial, uma vez que os efeitos comportamentais da VFX parecem não depender da modulação do receptor CB_1. Entretanto, os efeitos relacionados a facilitação dos efeitos pró-proliferativos da VFX no nicho neurogênico, parecem recrutar o receptor CB_1. Estes resultados sugerem que a VFX poderia produzir efeitos ansiolíticos independentes de processos proliferativos hipocampais. Além disso, tendo em vista, dados prévios de nosso laboratório com escitalopram, concluímos que a VFX e o ESC parecem não compartilhar de um mecanismo de ação dependente da ativação do receptor CB_1 em relação aos comportamentos e parâmetros neurogênicos analisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

ABDELHAMID, R. E. et al. Depressive behavior in the forced swim test can be induced by TRPV1 receptor activity and is dependent on NMDA receptors. **Pharmacological Research**, v. 79, p. 21–27, Jan. 2014.

AKITAKE, Y. et al. Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behavior, and neurodevelopment of offspring. **Nutrition research** (New York, N.Y.), v. 35, n. 1, p. 76–87, Jan. 2015.

AKMAN, C. et al. Effect of food deprivation during early development on cognition and neurogenesis in the rat. **Epilepsy & Behavior**, v. 5, n. 4, p. 446–454, Aug. 2004.

AL-RASHEED, R. et al. Malnutrition in elderly and its relation to depression. **International Journal of Community Medicine and Public Health**, v. 5, n. 6, p. 2156, 22 May 2018.

ALTMAN, J.; DAS, G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **The Journal of Comparative Neurology,** v. 124, n. 3, p. 319–335, Jun. 1965.

AMARAL, D. G.; SCHARFMAN, H. E.; LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). **Progress in Brain Research**, v. 163, p. 3–22, 2007.

AMARAL, D. G.; WITTER, M. P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, v. 31, n. 3, p. 571–591, 1989.

ARÉVALO, C.; DE MIGUEL, R.; HERNÁNDEZ-TRISTÁN, R. Cannabinoid effects on anxiety-related behaviours and hypothalamic neurotransmitters. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior,** v. 70, n. 1, p. 123–131, Sep. 2001.

ASO, E.; FERRER, I. CB2 Cannabinoid Receptor As Potential Target against Alzheimer's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p. 243, 31 May 2016.

ASTON-JONES, G. et al. Role of the locus coeruleus in emotional activation. **Progress in Brain Research**, v. 107, p. 379–402, 1996.

AVRAHAM, H. K. et al. The cannabinoid CB_2 receptor agonist AM1241 enhances neurogenesis in GFAP/Gp120 transgenic mice displaying deficits in neurogenesis. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 2, p. 468–479, Jan. 2014.

BAJAJ, J. S. et al. Adrenocortical function in experimental protein malnutrition. **Metabolism**: *Clinical and Experimental*, v. 28, n. 5, p. 594–598, May 1979.

BAMBICO, F. R. et al. Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 43, p. 11700–11711, 24 Oct. 2007.

BARTSCH, T.; WULFF, P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. **Neuroscience**, v. 309, p. 1–16, 19 Nov. 2015.

BASAVARAJAPPA, B. S. et al. Chronic ethanol inhibits the anandamide transport and increases extracellular anandamide levels in cerebellar granule neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 466, n. 1–2, p. 73–83, 11 Apr. 2003.

BASAVARAJAPPA, B. S. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. **Protein and Peptide Letters**, v. 14, n. 3, p. 237–246, 2007.

BELLUSCIO, L. M. et al. Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. **Physiology & Behavior,** v. 129, p. 237–254, 22 Apr. 2014.

BELOVICOVA, K. et al. Effects of venlafaxine and chronic unpredictable stress on behavior and hippocampal neurogenesis of rat dams. **Neuro Endocrinology Letters**, v. 38, n. 1, p. 19–26, Feb. 2017.

BESSA, J. M. et al. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 8, p. 764–73, 739, Aug. 2009.

BOLDRINI, M. et al. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 11, p. 2376–2389, Oct. 2009.

BOLDRINI, M. et al. Benzodiazepines and the potential trophic effect of antidepressants on dentate gyrus cells in mood disorders. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 12, p. 1923–1933, Dec. 2014.

BOLDRINI, M. et al. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. **Cell Stem Cell**, v. 22, n. 4, p. 589- 599.e5, 5 Apr. 2018.

BRUSCO, A. et al. Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. **Synapse**, v. 62, n. 12, p. 944–949, Dec. 2008.

CAMERON, H. A. et al. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. **Neuroscience**, v. 56, n. 2, p. 337–344, Sep. 1993.

CAMPOS, A. C. et al. Facilitation of endocannabinoid effects in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behaviors depending on previous stress experience. **Neuroscience**, v. 167, n. 2, p. 238–246, 5 May 2010.

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

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

CARVALHO, A. F.; VAN BOCKSTAELE, E. J. Cannabinoid modulation of noradrenergic circuits: implications for psychiatric disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 38, n. 1, p. 59–67, 2 Jul. 2012.

CHRISTENSEN, R. et al. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. **The Lancet**, v. 370, n. 9600, p. 1706–1713, 17 Nov. 2007.

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

CONOVER, J. C.; NOTTI, R. Q. The neural stem cell niche. **Cell and Tissue Research**, v. 331, n. 1, p. 211–224, Jan. 2008.

COOKE, J. D.; GROVER, L. M.; SPANGLER, P. R. Venlafaxine treatment stimulates expression of brain-derived neurotrophic factor protein in frontal cortex and inhibits long-term potentiation in hippocampus. **Neuroscience**, v. 162, n. 4, p. 1411–1419, 15 Sep. 2009.

DAVID, D. J. et al. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. **Neuron**, v. 62, n. 4, p. 479–493, 28 May 2009.

DELGADO, P. L. Depression: the case for a monoamine deficiency. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 61 Suppl 6, p. 7–11, 2000.

DENG, W.; AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nature Reviews.** Neuroscience, v. 11, n. 5, p. 339–350, May 2010.

DEPRESSION**. World Health Organization.** 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>. Acesso em: 31 de outubro de 2019

DETONI, VL. Efeitos do canabidiol e escitalopram sobre as diferentes etapas do processo neurogênico hipocampal adulto em camundongos cronicamente estressados. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, p. 107, 2018

DEVANE, W. A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946–1949, 18 Dec. 1992.

DOMINO, E. F. History of modern psychopharmacology: a personal view with an emphasis on antidepressants. **Psychosomatic Medicine**, v. 61, n. 5, p. 591–598, Oct. 1999.

DOWNER, E. J. High hopes for CB(2) receptors in neurogenesis. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 6, p. 1345–1346, Mar. 2014.

DUCOTTET, C.; AUBERT, A.; BELZUNG, C. Susceptibility to subchronic unpredictable stress is related to individual reactivity to threat stimuli in mice. **Behavioural Brain Research,** v. 155, n. 2, p. 291–299, 6 Dec. 2004.

ENCINAS, J. M.; VAAHTOKARI, A.; ENIKOLOPOV, G. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 21, p. 8233–8238, 23 May 2006.

ERIKSSON, P. S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1313–1317, Nov. 1998.

FAVA, M. New approaches to the treatment of refractory depression. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 61 Suppl 1, p. 26–32, 2000.

FENDLER, K.; KARMOS, G.; TELEGDY, G. The effect of hippocampal lesion on pituitary-adrenal function. **Acta physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 20, p. 293–297, 1961.

FOGAÇA, M. V. et al. The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: Role of neurogenesis and dendritic remodeling. **Neuropharmacology**, v. 135, p. 22–33, 3 Mar. 2018.

FRIDE, E. et al. Differential response to acute and repeated stress in cannabinoid CB1 receptor knockout newborn and adult mice. **Behavioural Pharmacology**, v. 16, n. 5–6, p. 431–440, Sep. 2005.

GAGE, F. H. et al. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. **Journal of Neurobiology**, v. 36, n. 2, p. 249–266, Aug. 1998.

GAO, Y. et al. Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 6, p. 2017–2024, 10 Feb. 2010.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S. et al. Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 7, p. 1773–1784, Aug. 2010.

GORZALKA, B. B.; HILL, M. N.; HILLARD, C. J. Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 6, p. 1152–1160, Aug. 2008.

GOULD, E. et al. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. **The Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 3642–3650, Sep. 1992.

GOULD, E. et al. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3168–3171, 17 Mar. 1998.

GUERRA, Tony. THE TOP 200 DRUGS OF 2017? **Pharmacy Times**. 2017. Disponível em:<https://www.pharmacytimes.com/contributor/tony-guerra-pharmd/2017/03/the-top-200-drugs-of-2017> Acesso em: 31 de outubro de 2019.

HALLER, J. et al. The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. **The European Journal of Neuroscience,** v. 16, n. 7, p. 1395–1398, Oct. 2002.

HARVEY, A. T.; RUDOLPH, R. L.; PRESKORN, S. H. Evidence of the dual mechanisms of action of venlafaxine. **Archives of General Psychiatry**, v. 57, n. 5, p. 503–509, May 2000.

HERMAN, J. P.; DOLGAS, C. M.; CARLSON, S. L. Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. **Neuroscience**, v. 86, n. 2, p. 449–459, Sep. 1998.

HILLARD, C. J. Stress regulates endocannabinoid-CB1 receptor signaling. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 5, p. 380–388, Oct. 2014.

HILLARD, C. J.; WEINLANDER, K. M.; STUHR, K. L. Contributions of endocannabinoid signaling to psychiatric disorders in humans: genetic and biochemical evidence. **Neuroscience**, v. 204, p. 207–229, 1 Mar. 2012.

HILLHOUSE, T. M.; PORTER, J. H. A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 1–21, Feb. 2015.

HILL, A. S.; SAHAY, A.; HEN, R. Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 10, p. 2368–2378, Sep. 2015.

HILL, M. N. et al. Involvement of the endocannabinoid system in the ability of long-term tricyclic antidepressant treatment to suppress stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 12, p. 2591–2599, Dec. 2006.

HILL, M. N. et al. Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 107, n. 20, p. 9406–9411, 18 May 2010.

HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. **European Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 593–599, Dec. 2005.

HIRSCHFELD, R. M. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 61 Suppl 6, p. 4–6, 2000.

HOWLETT, A. C.; FLEMING, R. M. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. **Molecular Pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 532–538, Nov. 1984.

ISINGRINI, E. et al. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **Plos One**, v. 5, n. 4, p. e10404, 28 Apr. 2010.

JARRARD, L. E. What does the hippocampus really do? **Behavioural Brain Research,** v. 71, n. 1–2, p. 1–10, Nov. 1995.

JAYATISSA, M. N. et al. Hippocampal cytogenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 11, p. 2395–2404, Nov. 2006.

JENNICHES, I. et al. Anxiety, stress, and fear response in mice with reduced endocannabinoid levels. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 10, p. 858–868, 15 May 2016.

JIN, K. et al. Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. **Molecular Pharmacology**, v. 66, n. 2, p. 204–208, Aug. 2004.

JURUENA, M. F. Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. **Epilepsy & Behavior**, v. 38, p. 148–159, Sep. 2014.

KAPLAN, M. S.; HINDS, J. W. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. **Science**, v. 197, n. 4308, p. 1092–1094, 9 Sep. 1977.

KATSNELSON, A. Male researchers stress out rodents. **Nature**, 28 Apr. 2014.

KEMPERMANN, G. Seven principles in the regulation of adult neurogenesis. **The European Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 6, p. 1018–1024, Mar. 2011.

KEMPERMANN, G. Adult neurogenesis: an evolutionary perspective. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 2, p. a018986, 18 Dec. 2015.

KEMPERMANN, G. et al. Human adult neurogenesis: evidence and remaining questions. **Cell Stem Cell**, v. 23, n. 1, p. 25–30, 5 Jul. 2018.

KEMPERMANN, G.; KRONENBERG, G. Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. **Biological Psychiatry,** v. 54, n. 5, p. 499–503, 1 Sep. 2003.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 493–495, 3 Apr. 1997.

KEMPERMANN, G.; SONG, H.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the adult hippocampus. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 9, p. a018812, 1 Sep. 2015.

KESHAVARZI, S.; AHMADI, S. M.; LANKARANI, K. B. The impact of depression and malnutrition on health-related quality of life among the elderly Iranians. **Global journal of health science**, v. 7, n. 3, p. 161–170, 26 Nov. 2014.

KREITZER, A. C.; REGEHR, W. G. Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. **Neuron**, v. 29, n. 3, p. 717–727, Mar. 2001.

LAU, T.; SCHLOSS, P. The cannabinoid CB1 receptor is expressed on serotonergic and dopaminergic neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 578, n. 2–3, p. 137–141, 14 Jan. 2008.

LAZARY, J. et al. Promoter variants of the cannabinoid receptor 1 gene (CNR1) in interaction with 5-HTTLPR affect the anxious phenotype. American Journal of Medical Genetics. Part B, **Neuropsychiatric Genetics**, v. 150B, n. 8, p. 1118–1127, 5 Dec. 2009.

LAZZARI, P. et al. Weight loss induced by rimonabant is associated with an altered leptin expression and hypothalamic leptin signaling in diet-induced obese mice. **Behavioural Brain Research**, v. 217, n. 2, p. 432–438, 1 Mar. 2011.

LEDENT, C. et al. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. **Science**, v. 283, n. 5400, p. 401–404, 15 Jan. 1999.

LEE, S. et al. Sub-chronic administration of rimonabant causes loss of antidepressive activity and decreases doublecortin immunoreactivity in the mouse hippocampus. **Neuroscience Letters,** v. 467, n. 2, p. 111–116, 25 Dec. 2009.

LI, Y.; KIM, J. Neuronal expression of CB2 cannabinoid receptor mRNAs in the mouse hippocampus. **Neuroscience,** v. 311, p. 253–267, 17 Dec. 2015.

MACKIE, K. et al. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 6552–6561, Oct. 1995.

MALBERG, J. E. et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 24, p. 9104–9110, 15 Dec. 2000.

MALOZOWSKI, S. et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in infantile malnutrition. **Clinical Endocrinology**, v. 32, n. 4, p. 461–465, Apr. 1990.

MANUEL-APOLINAR, L. et al. Role of prenatal undernutrition in the expression of serotonin, dopamine and leptin receptors in adult mice: implications of food intake. **Molecular medicine reports**, v. 9, n. 2, p. 407–412, Feb. 2014.

MATOS, R. J. B. et al. Nutrient restriction during early life reduces cell proliferation in the hippocampus at adulthood but does not impair the neuronal differentiation process of the new generated cells. **Neuroscience**, v. 196, p. 16–24, 24 Nov. 2011.

MATO, S. et al. CB1 knockout mice display impaired functionality of 5-HT1A and 5-HT2A/C receptors. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 5, p. 2111–2120, Dec. 2007.

MATO, S. et al. Long-term fluoxetine treatment modulates cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in the rat prefrontal cortex through 5-hydroxytryptamine 1A receptor-dependent mechanisms. **Molecular Pharmacology**, v. 77, n. 3, p. 424–434, Mar. 2010.

MATSUDA, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561–564, 9 Aug. 1990.

MCEWEN, B. S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, p. 33–44, 1 May 1998.

MCEWEN, B. S. Mood disorders and allostatic load. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 3, p. 200–207, 1 Aug. 2003.

MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: **Central role of the brain. Physiological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 873–904, Jul. 2007.

MCEWEN, B. S.; GIANAROS, P. J. Stress- and allostasis-induced brain plasticity. **Annual Review of Medicine**, v. 62, p. 431–445, 2011.

MECHA, M. et al. Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: a role for A2A receptors. **Neurobiology of Disease**, v. 59, p. 141–150, Nov. 2013.

MECHOULAM, R.; GAONI, Y. A Total Synthesis of dl-Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish[1]. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, n. 14, p. 3273–3275, Jul. 1965.

MENDEZ-DAVID, I. et al. S 47445 Produces Antidepressant- and Anxiolytic-Like Effects through Neurogenesis Dependent and Independent Mechanisms. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 462, 19 Jul. 2017.

MING, G.; SONG, H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v. 28, p. 223–250, 2005.

MIZOGUCHI, K. et al. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. **Neuroscience,** v. 119, n. 3, p. 887–897, 2003.

MOLINA-HOLGADO, F. et al. CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. **The European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 3, p. 629–634, Feb. 2007.

MONGEAU, R.; BLIER, P.; DE MONTIGNY, C. The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. **Brain Research Reviews**, v. 23, n. 3, p. 145–195, Apr. 1997.

MOREIRA, F. A.; CRIPPA, J. A. S. The psychiatric side-effects of rimonabant. **Revista brasileira de psiquiatria** (Sao Paulo, Brazil : 1999), v. 31, n. 2, p. 145–153, Jun. 2009.

MORENA, M. et al. Neurobiological interactions between stress and the endocannabinoid system. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 80–102, Jan. 2016.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature,** v. 365, n. 6441, p. 61–65, 2 Sep. 1993.

MUNTONI, A. L. et al. Cannabinoids modulate spontaneous neuronal activity and evoked inhibition of locus coeruleus noradrenergic neurons. **The European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 9, p. 2385–2394, May 2006.

NAIR, A. B.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27–31, Mar. 2016.

NÚÑEZ, E. et al. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. **Synapse**, v. 53, n. 4, p. 208–213, 15 Sep. 2004.

OOMEN, C. A. et al. Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. **The European Journal of Neuroscience,** v. 26, n. 12, p. 3395–3401, 4 Dec. 2007.

OTTON, S. V. et al. Venlafaxine oxidation in vitro is catalysed by CYP2D6. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, n. 2, p. 149–156, Feb. 1996.

PAGOTTO, U. et al. Normal human pituitary gland and pituitary adenomas express cannabinoid receptor type 1 and synthesize endogenous cannabinoids: first evidence for a direct role of cannabinoids on hormone modulation at the human pituitary level. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,** v. 86, n. 6, p. 2687–2696, Jun. 2001.

PALAZUELOS, J. et al. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 13, p. 2405–2407, Nov. 2006.

PATEL, S. et al. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5431–5438, Dec. 2004.

PATEL, S.; HILLARD, C. J. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 318, n. 1, p. 304–311, Jul. 2006.

PATON, J. A.; NOTTEBOHM, F. N. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. **Science,** v. 225, n. 4666, p. 1046–1048, 7 Sep. 1984.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 4ª edição. **Academic Press**, 2012.

PÉREZ-GARCÍA, G. et al. Early malnutrition results in long-lasting impairments in pattern-separation for overlapping novel object and novel location memories and reduced hippocampal neurogenesis. **Scientific Reports,** v. 6, p. 21275, 17 Feb. 2016.

POULOSE, S. M. et al. Nutritional factors affecting adult neurogenesis and cognitive function. **Advances in nutrition (Bethesda, Md.**), v. 8, n. 6, p. 804–811, 15 Nov. 2017.

PRENDERVILLE, J. A.; KELLY, Á. M.; DOWNER, E. J. The role of cannabinoids in adult neurogenesis. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 16, p. 3950–3963, Aug. 2015.

RAO, T. S. S. et al. Understanding nutrition, depression and mental illnesses. **Indian journal of psychiatry**, v. 50, n. 2, p. 77–82, Apr. 2008.

RICHELSON, E. Pharmacology of antidepressants--characteristics of the ideal drug. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 69, n. 11, p. 1069–1081, Nov. 1994.

RUDOLPH, R. L. et al. A randomized, placebo-controlled, dose-response trial of venlafaxine hydrochloride in the treatment of major depression. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 59, n. 3, p. 116–122, Mar. 1998.

SANSONE, R. A.; SANSONE, L. A. Serotonin norepinephrine reuptake inhibitors: a pharmacological comparison. **Innovations in clinical neuroscience**, v. 11, n. 3–4, p. 37–42, Mar. 2014.

SANTARELLI, L. et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805–809, 8 Aug. 2003.

SCAVONE, J. L.; MACKIE, K.; VAN BOCKSTAELE, E. J. Characterization of cannabinoid-1 receptors in the locus coeruleus: relationship with mu-opioid receptors. **Brain Research,** v. 1312, p. 18–31, 2 Feb. 2010.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **The American Journal of Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509–522, Nov. 1965.

SCHLOSBURG, J. E. et al. Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. **Nature Neuroscience,** v. 13, n. 9, p. 1113–1119, Sep. 2010.

SELYE, H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 6, p. 117–230, Feb. 1946.

SHANG, Y. et al. Displacement of serotonin and dopamine transporters by venlafaxine extended release capsule at steady state: a [123I]2beta-carbomethoxy-3beta-(4-iodophenyl)-tropane single photon emission computed tomography imaging study. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 27, n. 1, p. 71–75, Feb. 2007.

SHEARMAN, L. P. et al. Antidepressant-like and anorectic effects of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM251 in mice. **Behavioural Pharmacology**, v. 14, n. 8, p. 573–582, Dec. 2003.

SMAGA, I. et al. The endocannabinoid/endovanilloid system and depression. **Current neuropharmacology**, v. 12, n. 5, p. 462–474, Sep. 2014.

SNYDER, J. S. et al. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. **Nature,** v. 476, n. 7361, p. 458–461, 3 Aug. 2011.

STANGL, D.; THURET, S. Impact of diet on adult hippocampal neurogenesis. **Genes & Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 271–282, Dec. 2009.

SUN, L. et al. Biochemical effects of venlafaxine on astrocytes as revealed by 1H NMR-based metabolic profiling. **Molecular Biosystems**, v. 13, n. 2, p. 338–349, 31 Jan. 2017.

SURGET, A. et al. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. **Biological Psychiatry**, v. 64, n. 4, p. 293–301, 15 Aug. 2008.

SURGET, A. et al. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. **Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 12, p. 1177–1188, Dec. 2011.

SUWAŁA, J.; MACHOWSKA, M.; WIELA-HOJEŃSKA, A. Venlafaxine pharmacogenetics: a comprehensive review. **Pharmacogenomics**, v. 20, n. 11, p. 829–845, Jul. 2019.

TAKAHASHI, K. A.; CASTILLO, P. E. The CB1 cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus. **Neuroscience,** v. 139, n. 3, p. 795–802, 9 Mar. 2006.

TRIVEDI, M. H. et al. Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 12, p. 1243–1252, 23 Mar. 2006.

VADODARIA, K. C.; GAGE, F. H. SnapShot: adult hippocampal neurogenesis. **Cell**, v. 156, n. 5, p. 1114- 1114.e1, 27 Feb. 2014.

VALLÉE, A. et al. Effects of cannabidiol interactions with Wnt/β-catenin pathway and PPARγ on oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Acta biochimica et biophysica Sinica,** v. 49, n. 10, p. 853–866, 1 Oct. 2017.

VENZALA, E. et al. Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors. **Psychopharmacology,** v. 224, n. 2, p. 313–325, Nov. 2012.

WANG, J.-W. et al. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 6, p. 1374–1384, 6 Feb. 2008.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90–110, 19 Jul. 2005.

WILLNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. **Neurobiology of stress,** v. 6, p. 78–93, Feb. 2017.

WILSON, R. I.; NICOLL, R. A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 588–592, 29 Mar. 2001.

WONG, D. T. et al. A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. **Life Sciences**, v. 15, n. 3, p. 471–479, 1 Aug. 1974.

WYROFSKY, R.; MCGONIGLE, P.; VAN BOCKSTAELE, E. J. Drug discovery strategies that focus on the endocannabinoid signaling system in psychiatric disease. **Expert opinion on drug discovery**, v. 10, n. 1, p. 17–36, Jan. 2015.

ZHANG, Z. et al. Blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces antidepressant-like effects and enhances adult hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. **Hippocampus**, v. 25, n. 1, p. 16–26, Jan. 2015.

ZIMMER, A. et al. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 10, p. 5780–5785, 11 May 1999.

APÊNDICE

9. APÊNDICE 1

9.1 INTRODUÇÃO

No começo de 2018 a ração disponibilizada aos animais do campus foi modificada, por determinação do biotério central, para a marca AGROMIX. Foi constatado alguns meses depois, especificamente durante o protocolo do Experimento II deste trabalho, que esta ração sujeitou o os animais a uma severa desnutrição. Por esta razão, apresentamos os resultados deste protocolo de maneira separada. As análises comportamentais e estatísticas foram realizadas de maneira igual aos dados dos experimentos I e III.

9.2 RESULTADOS

- Experimento II: Efeitos do estresse e dos tratamentos com venlafaxina e AM251 nos animais gerados e criados com a ração AGROMIX

A partir dos dados obtidos no experimento I, escolhemos a dose de 20mg/Kg para os experimentos relacionados ao teste da hipótese de que os efeitos da VFX dependem da ativação do receptor CB_1. Além dos testes comportamentais, nesta série experimental estavam planejados ensaios de imuno-histoquímicas para células em etapas específicas da neurogênese, como células precursoras e células em fase de migração. Em ração do estado nutricional dos animais, as amostras biológicas não foram coletadas.

- Os animais alimentados com a ração AGROMIX não apresentam diferenças no ganho de peso independentemente do fator estresse ou do tratamento

Dentre os cuidados com os animais, o acompanhamento semanal do peso dos animais indica indiretamente a saúde dos indivíduos, além disso, permite que sejam administradas as mesmas doses entre todos os animais do estudo. A estatística t de medidas repetidas entre os grupos controle e CUS/Sal/Sal não revelou diferenças no peso médio dos animais em nenhuma das semanas avaliadas: semana 1 ($t_{(14)}$=0,775, p>0,05, semana 2 ($t_{(14)}$=0,835, p>0,05) ou semana 3 ($t_{(14)}$=0,005, p>0,05. Para o fator tratamento, a análise da curva de ganho de peso por ANOVA de medidas repetidas realizada ao longo das semanas também não revelou efeito para o tratamento isolado com AM251 ($F_{(3,28)}$=0,193, p>0,05) ou com VFX ($F_{(3,28)}$= 0,659 p<0,05) nem

interação entre os tratamentos ($F_{(3,28)}$= 0,576, $p>0,05$). A análise por two-way ANOVA do peso dos animais em cada semana, isoladamente, também não apresentou diferenças entre os grupos analisados (Figura 16).

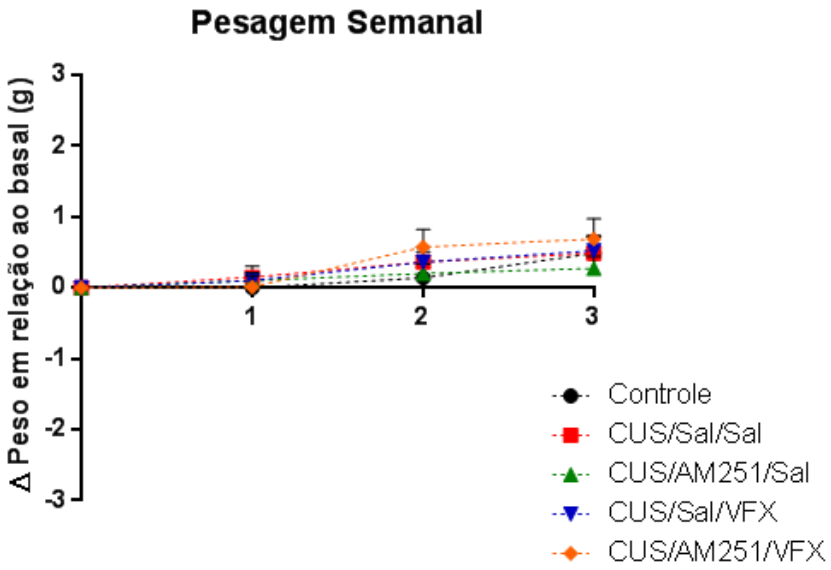


Figura 16: Acompanhamento semanal da variação de peso corporal em animais submetidos ao estresse crônico, alimentados com a ração AGROMIX e tratados com AM251 e/ou VFX. O gráfico mostras que, ao longo das semanas, a variação de peso entre os animais não foi alterada por nenhum dos fatores analisados, seja o estresse ou o tratamento. Os grupos são não-estressado/Sal/Sal (n=7), CUS/Sal/Sal (n=7), CUS/AM251/Sal (n=8), CUS/Sal/VFX (n=8) e CUS/AM251/VFX (n=8). As barras representam média +EPM.

- Os animais alimentados com a ração AGROMIX não apresentam diferenças no comportamento do tipo depressivo

Nos animais alimentados com a ração AGROMIX, a estatística entre os grupo controle (Não-estressado/Sal/Sal) e estressado (CUS/Sal/Sal) não revelou efeito do estresse em nenhum dos parâmetros analisados no Splash-test: latência para início do comportamento de autolimpeza ($t_{(13)}$=1,497, p>0,05 (Figura 17a)), tempo total gasto em autolimpeza ($t_{(13)}$=0,071 , p>0,05) (Figura 17b), tempo dispensado na autolimpeza da face ($t_{(13)}$=3,611 , p>0,05) (Figura 17c) e tempo dispensado na autolimpeza do dorso ($t_{(13)}$=0,140, p>0,05) (Figura 18d). Com relação ao parâmetro de latência para início do grooming, a análise por two-way ANOVA não indicou interação entre os tratamentos ($F_{(1,28)}$= 0,001, (p>0,05)) nem efeito isolado do tratamento com AM251 ($F_{(1,28)}$=0,352, p>0,05) ou com VFX ($F_{(1,28)}$= 0,871 , p>0,05) (Figura 17a). Com relação ao parâmetro do tempo total gasto em autolimpeza, também não foi observada interação ($F_{(1,28)}$ = 0,161, p>0,05) nem efeito isolado do AM251 ($F_{(1,28)}$ =0,1,073, p>0,05) ou da VFX ($F_{(1,28)}$ = 0,129, p>0,05) (Figura 17b). Acerca da análise do tempo gasto em autolimpeza de maneira específica na face, não foram encontradas diferenças entre os grupos com relação ao tratamento com AM251 ($F_{(1,28)}$= 0,151, p>0,05), com VFX ($F_{(1,28)}$=1,413, p>0,05) ou para a interação entre os tratamentos ($F_{(1,28)}$=0,258, p>0,05) (Figura 17c). Da mesma maneira, com relação ao tempo gasto na limpeza da região do dorso, a análise por two-way ANOVA não indicou diferenças entre os grupos com relação ao tratamento com AM251 ($F_{(1,28)}$= 1,077, p>0,05), com VFX ($F_{(1,28)}$=0,031, p>0,05) ou para a interação entre os tratamentos ($F_{(1,28)}$=0,169, p>0,05) (Figura 17d).

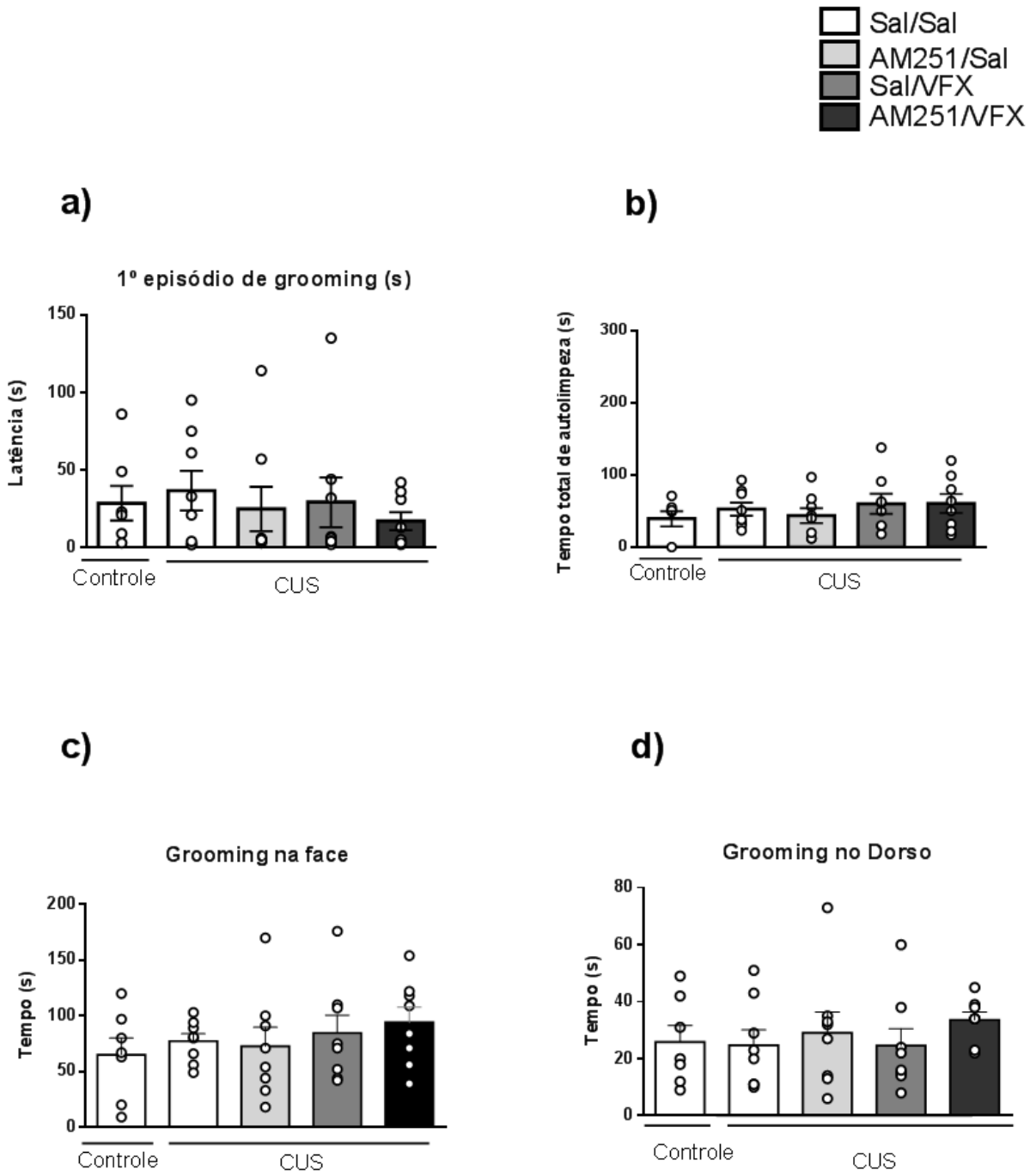


Figura 17: Comportamentos de autolimpeza em animais estressados cronicamente, alimentados com a ração AGROMIX e tratados com AM251 e/ou VFX. a) O gráfico representa a latência para o início do comportamento de autolimpeza (a), tempo total gasto pelo animal para se autolimpar (b), o tempo gasto para realização da autolimpeza facial (c) e o tempo gasto para a limpeza da região do dorso (d). Não há diferenças entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados. Os grupos são: Não-estressado/Sal/Sal (n=7), CUS/Sal/Sal (n=7), CUS/AM251/Sal (n=8), CUS/Sal/VFX (n=8) e CUS/AM251/VFX (n=8). As barras representam média +EPM

- Os animais alimentados com a ração AGROMIX não apresentam diferenças nos comportamentos tipo ansioso independentemente do fator estresse ou do tratamento

A análise estatística revelou que o fator estresse não apresentou efeito, revelado pelo Teste t ($t(13)= 0,397$, $p>0,05$) entre os grupos Não estressado/Sal/Sal (Controle) e CUS/Sal. Com relação ao efeito do tratamento, observou-se por meio de análise two-way ANOVA que não houve interação entre os tratamentos ($F_{(1,28)}=0,295$, $p>0,05$) nem efeito isolado do tratamento com AM251 $F_{(1,28)}=2,302$ ($p>0,05$) ou do tratamento com VFX ($F_{(1,28)}=0,420$, $p>0,05$). No caso de não termos os grupos não-estressados e tratados, as análises pos-hoc são permitidas apenas por meio da aplicação de one-way ANOVA cujos resultados também não indicaram efeito de nenhum dos tratamentos ($F_{(3,28)} = 1,006$ $p>0,05$) (Figura 18a). Os dados do teste controlem na gaiola moradia não cumpriram os parâmetros necessários para a aplicação de análise paramétrica e revelaram que não houve diferenças na ingesta alimentar dos animais ($X^2=1,302$, $p> 0,05$ Teste de Kruskal Wallis) (Figura 18b).

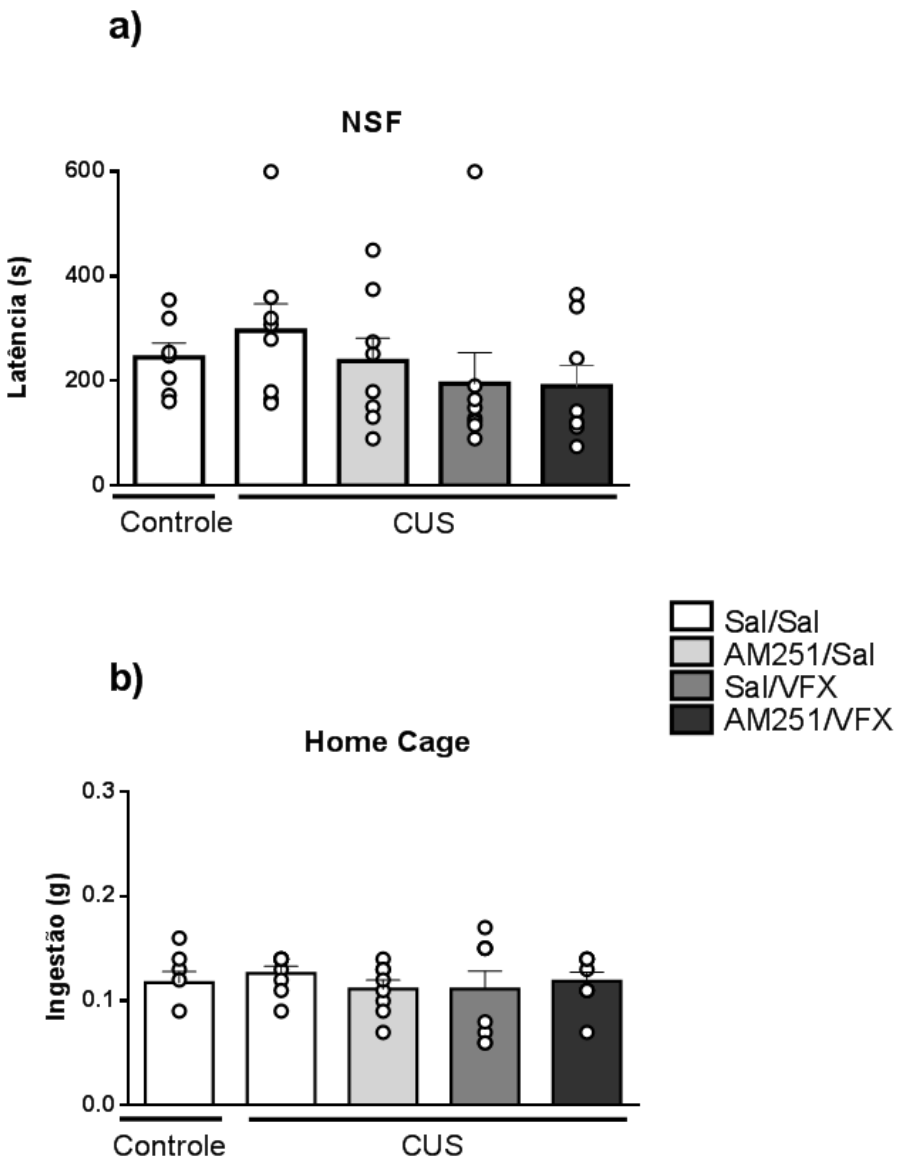


Figura 18: Efeitos comportamentais do estresse crônico em animais alimentados com a ração AGROMIX e tratados AM251 e/ou VFX submetidos ao modelo do *Novelty Supressed Feeding.* a) O gráfico representa a latência para o animal se alimentar no NSF e indica que não houve diferenças nesta latência entre os grupos controle e estressado ou entre os animais tratados. b) O gráfico indica ingestão de alimento, em gramas, na gaiola moradia dos animais e demonstra que não houve diferenças no perfil alimentar destes animais. Os grupos são: Não-estressado/Sal/Sal (n=7), CUS/Sal/Sal (n=7), CUS/AM251/Sal (n=8), CUS/Sal/VFX (n=8) e CUS/AM251/VFX (n=8). As barras representam média +EPM.

- Os animais alimentados com a ração AGROMIX não apresentam diferenças no comportamento do tipo depressivo

Nos animais alimentados com a ração AGROMIX, a estatística entre os grupo controle (Não-estressado/Sal/Sal) e estressado (CUS/Sal/Sal) não revelou efeito do estresse em nenhum dos parâmetros analisados no Splash-test: latência para início do comportamento de autolimpeza ($t_{(13)}$=1,497, p>0,05 (Figura 18a)), tempo total gasto em autolimpeza ($t_{(13)}$=0,071 , p>0,05) (Figura 18b), tempo dispensado na autolimpeza da face ($t_{(13)}$=3,611 , p>0,05) (Figura 18c) e tempo dispensado na autolimpeza do dorso ($t_{(13)}$=0,140, p>0,05) (Figura 18d). Com relação ao parâmetro de latência para início do grooming, a análise por two-way ANOVA não indicou interação entre os tratamentos ($F_{(1,28)}$= 0,001, (p>0,05)) nem efeito isolado do tratamento com AM251 ($F_{(1,28)}$=0,352, p>0,05) ou com VFX ($F_{(1,28)}$= 0,871 , p>0,05) (Figura 18a). Com relação ao parâmetro do tempo total gasto em autolimpeza, também não foi observada interação ($F_{(1,28)}$ = 0,161, p>0,05) nem efeito isolado do AM251 ($F_{(1,28)}$ =0,1,073, p>0,05) ou da VFX ($F_{(1,28)}$ = 0,129, p>0,05) (Figura 18b). Acerca da análise do tempo gasto em autolimpeza de maneira específica na face, não foram encontradas diferenças entre os grupos com relação ao tratamento com AM251 ($F_{(1,28)}$= 0,151, p>0,05), com VFX ($F_{(1,28)}$=1,413, p>0,05) ou para a interação entre os tratamentos ($F_{(1,28)}$=0,258, p>0,05) (Figura 18c). Da mesma maneira, com relação ao tempo gasto na limpeza da região do dorso, a análise por two-way ANOVA não indicou diferenças entre os grupos com relação ao tratamento com AM251 ($F_{(1,28)}$= 1,077, p>0,05), com VFX ($F_{(1,28)}$=0,031, p>0,05) ou para a interação entre os tratamentos ($F_{(1,28)}$=0,169, p>0,05) (Figura 18d).

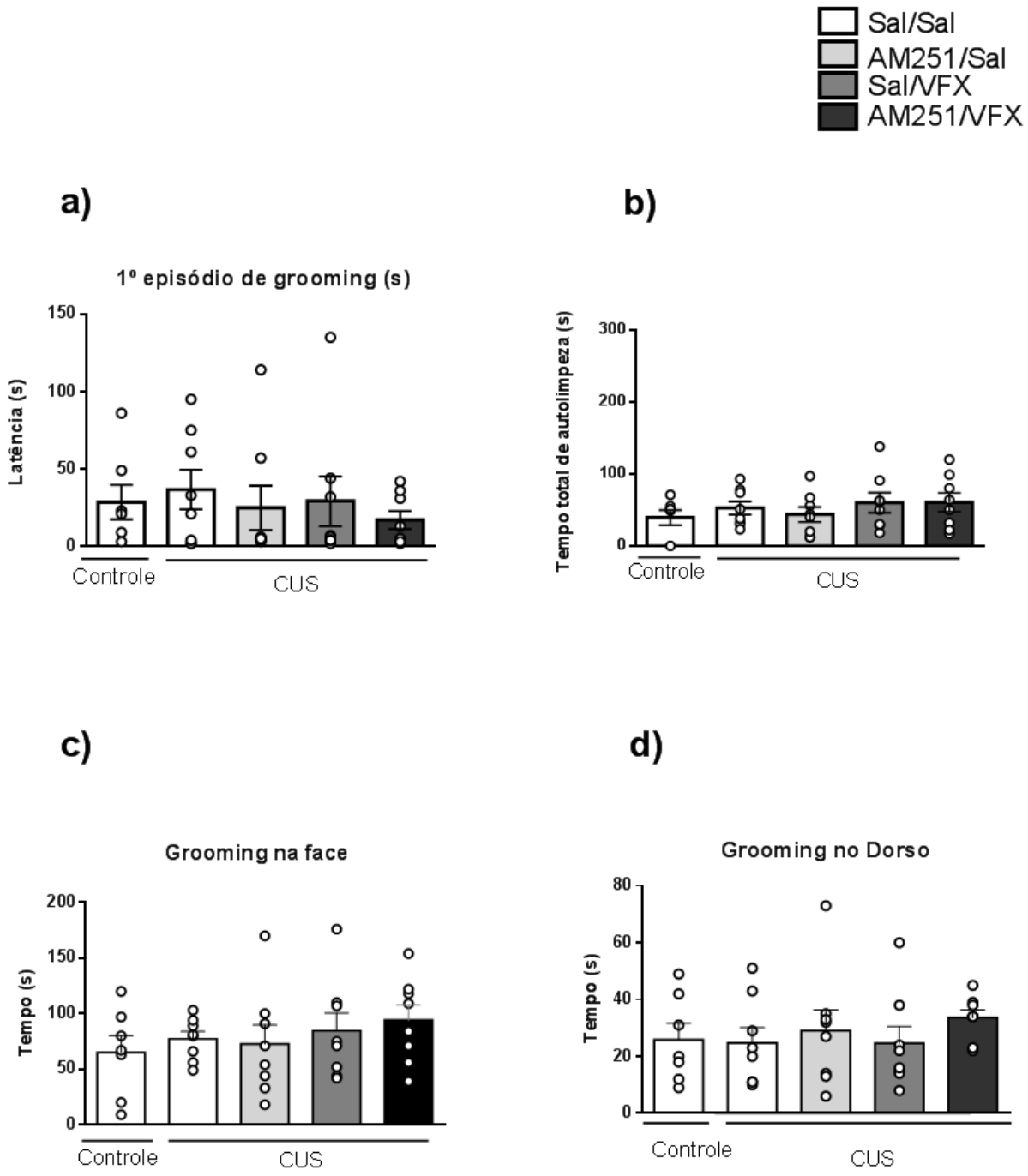


Figura 18: Comportamentos de autolimpeza em animais estressados cronicamente, alimentados com a ração AGROMIX e tratados com AM251 e/ou VFX. a) O gráfico representa a latência para o início do comportamento de autolimpeza (a), tempo total gasto pelo animal para se autolimpar (b), o tempo gasto para realização da autolimpeza facial (c) e o tempo gasto para a limpeza da região do dorso (d). Não há diferenças entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados. Os grupos são: Não-estressado/Sal/Sal (n=7), CUS/Sal/Sal (n=7), CUS/AM251/Sal (n=8), CUS/Sal/VFX (n=8) e CUS/AM251/VFX (n=8). As barras representam média +EPM.

9.3. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Com relação aos efeitos comportamentais nos testes de NSF e ST, não encontramos diferenças entre os animais estressados e o controle ou entre os animais tratados, em ambos os testes. Além disso, os animais desta segunda série experimental não atingiram peso superior a 22g, mesmo após a idade de 11 semanas ao fim do protocolo de CUS, na qual eles deveriam pesar, em média, 30g, ou seja, uma diferença de quase 25% de média corporal em relação ao peso esperado.

Estudos com macacos *Rhesus* em privação proteica demonstraram que os níveis plasmáticos de cortisol estavam elevados e o ritmo circadiano destes animais estava totalmente alterado (BAJAJ et al., 1979). Este achado foi corroborado em estudo com humanos, no qual foi observado que crianças desnutridas apresentavam níveis plasmáticos de cortisol elevados e redução na resposta à Dexametasona, características que foram completamente revertidas após reabilitação nutricional, reforçando o conceito de que a desnutrição está associadas à baixa responsividade do eixo-HPA, a qual é uma característica encontrada também em indivíduos com depressão (MALOZOWSKI et al., 1990). Outras linhas de evidência associam a privação nutricional à consequências em nível central de maneira mais refinada, demonstrando que este estado acarreta, além de impedimentos no desenvolvimento físico, maior probabilidade de desenvolver comportamentos do tipo depressivo e ansioso (BELLUSCIO et al., 2014). Para além do nível individual status metabólico, estudos com modelos desnutrição materna revelam que há consequências importantes sobre as vias de neurotransmissão serotoninérgica e dopaminérgica, as quais interferem no comportamento alimentar e emocional (AKITAKE et al., 2015; MANUEL-APOLINAR et al., 2014).

Ainda, o estado nutricional pode interferir na montagem de resposta ao estresse viabilizada pelo tratamento com AD´s. A facilitação monoaminérgica promovida pela VFX está diretamente envolvida na regulação de respostas endócrinas, mediadas pelo hipotálamo, que dependem do recrutamento de maquinaria celular para a produção de seus efeitos. Estudo em culturas primárias de astrócitos tratadas com VFX revelou que as vias metabólicas mais alteradas pelo tratamento eram AKT, mTOR e via da fosforilação oxidativa da glicose, cujas funções primárias no organismo são de modular o metabolismo energético e de aminoácidos, síntese proteica, crescimento e proliferação celular (SUN et al., 2017). Associado a isto, algumas linhas

de evidência sugerem que a dieta pode ter impactos diretos sobre a neurogênese (PÉREZ-GARCÍA et al., 2016; POULOSE et al., 2017; STANGL; THURET, 2009). Neste sentido, a privação nutricional, principalmente durante a infância e juventude dos indivíduos pode ser deletéria em relação à neurogênese (AKMAN et al., 2004; MATOS et al., 2011). Portanto, por recrutar maquinaria intracelular no sentido de promover montagem de resposta endócrina, comportamentos antidepressivos e proliferação celular pode-se considerar que VFX depende de um substrato metabólico preservado para exercer seus efeitos, o que não ocorre em animais sob estresse e privação nutricional.

Outro ponto relevante a se considerar é o fato de que a avaliação do comportamento tipo-ansioso pelo NSF pode ser interferida pelo aspecto nutricional de apetite do animal. Este modelo baseia-se em submeter o animal a um impasse constituído pela sua fome já que 24h antes do teste o animal é privado de comida, e pela ansiedade gerada pelo ambiente novo, altamente iluminado e aversivo. Considera-se, portanto, que este teste depende do *drive* alimentar e estado nutricional e metabólico do animal, parâmetros estes que se apresentam alterados em animais submetidos à privação nutricional crônica.

Uma vez que estado nutricional do indivíduo é um fator de viés relevante para os parâmetro de resposta ao estresse, à VFX e à ocorrência de processos neurogênicos (AL-RASHEED et al., 2018; KESHAVARZI; AHMADI; LANKARANI, 2014; RAO et al., 2008), consideramos que dados da série experimental II não refletiam as condições fisiológicas dos animais em uma situação íntegra, principalmente considerando que os animais controle devem refletir as condições basais de um indivíduo. Deste modo, optamos por não coletar amostras encefálicas para a realização de testes moleculares e repetir o protocolo utilizando animais provenientes do CEMIB/ UNICAMP e disponibilizando ração adequada.