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

**Tratamento repetido com canabidiol atenua alterações
comportamentais e moleculares em um modelo de
esquizofrenia baseado no antagonismo dos
receptores NMDA**

FELIPE VILLELA GOMES

**Ribeirão Preto
2015**

FELIPE VILLELA GOMES

**Tratamento repetido com canabidiol atenua alterações
comportamentais e moleculares em um modelo de
esquizofrenia baseado no antagonismo dos
receptores NMDA**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira
Guimarães

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADO A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Gomes, Felipe Villela

Tratamento repetido com canabidiol atenua alterações comportamentais e moleculares em um modelo de esquizofrenia baseado no antagonismo dos receptores NMDA / Felipe Villela Gomes; orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães.

219 p.: il.; 30 cm

Tese (Doutorado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2015.

1. Canabidiol. 2. Esquizofrenia. 3. Receptor NMDA. 4. Células da glia. 5. Clozapina. I. Guimarães, Francisco Silveira, orientador.

II. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

Felipe Villela Gomes

**TRATAMENTO REPETIDO COM CANABIDIOL ATENUA ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES EM UM MODELO DE ESQUIZOFRENIA
BASEADO NO ANTAGONISMO DOS RECEPTORES NMDA**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.**

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Assinatura:

Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Assinatura:

Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Assinatura:

Prof^a. Dr^a. Cristiane Otero Reis Salum

Instituição: Centro de Matemática, Computação e Cognição – UF-ABC Assinatura:

Prof. Dr. Leandro José Bertoglio

Instituição: Centro de Ciências Biológicas - UFSC

Assinatura:

Trabalho realizado no Laboratório de Psicofarmacologia do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*“Seja qual for o teu sonho, comece...
Ousadia tem genialidade, poder e magia.”*

Julian Wolfgang Goethe

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Paulo César e Maria Célia, que sempre me incentivaram na busca e conquista dos meus ideais.

À minha noiva, Danielle, pelo incentivo, compreensão, por sempre ter estado ao meu lado e pelo carinho e amor que sempre dedicou a mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu chance de viver e que me acompanha na luta diária não deixando esmorecer minha fé.

Aos meus familiares, que sempre acreditaram na minha capacidade e me deram amor e incentivo que necessitava e necessito para seguir em frente.

Ao Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães pela determinação, incentivo e confiança transmitida, por compartilhar comigo seus conhecimentos e me conduzir ao campo da pesquisa e me ensinar a caminhar com as minhas próprias pernas. Toda minha formação acadêmica é consequência da experiência que vive neste laboratório sob sua orientação. Um verdadeiro mestre e exemplo de dedicação profissional a ser seguido.

Aos amigos de laboratório Alline, Sabrina, Dani Aguiar, Carol, Plínio, Fred, Manoela, Andreza, Ana Luiza, Carla, Nicole e Alice que sempre me ajudaram e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel, pela amizade e por ter sempre estado disposto a esclarecer minhas dúvidas, pelas oportunidades dadas e pelo grande apoio durante toda a pós-graduação. E aos demais membros do seu laboratório em especial à Sara, Téo, Nilson, Leandro, Orlando, Gabi, Laura, Dani, Daniel, Davi e Cassiano, por proporcionarem momentos agradáveis e me ajudarem sempre que necessitei.

A Prof^a. Dr^a. Elaine Del Bel, que abriu as portas do seu laboratório dando fundamental apoio para a realização deste trabalho. Bem como aos demais membros do laboratório; Célia, Keila, Fernando, Maurício, Fabrine, Andriana, Vitor e, especialmente, à Carol, Dani, Mariza e João pela contribuição nos experimentos no teste de PPI e imunoistoquímica e agradáveis discussões científicas.

A Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Otero Reis Salum e aos Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa, Norberto Garcia Cairasco e Leandro José Bertoglio pela atenção e disponibilidade concedidas para participar da banca examinadora deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia, por contribuírem para o meu desenvolvimento profissional.

A todos os meus amigos pós-graduandos e demais amigos que fiz em Ribeirão Preto, pela amizade e colaboração.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

As Prof^ª. Dr^ª. Maria-Paz Viveros e Meritxell Lopez-Gallardo que me deram a oportunidade de conhecer e trabalhar em seus laboratórios na Universidad Complutense de Madrid (Espanha). E, novamente, ao apoio financeiro da FAPESP que tornou possível este estágio através da Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE).

Ao Prof. Dr. Anthony Grace pela oportunidade de visitar e trabalhar em seu laboratório na University of Pittsburgh (EUA). E ao apoio financeiro da CAPES que, através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), tornou possível essa visita.

Ao José Carlos, Eleni, Marquinhos, Célia, Angela Arrojo (Universidad Complutense de Madrid) e Niki McNurdo (University of Pittsburgh), por me ensinarem e auxiliarem com suas habilidades técnicas. Vocês foram de extrema importância para a realização deste trabalho.

Aos funcionários Sônia Stefanelli, Fátima Petean e José Waldik Ramon, por toda competência, disponibilidade e atenção com que atendem as nossas necessidades burocráticas. Bem como a todos os demais funcionários do Departamento de Farmacologia.

*Aos funcionários dos biotérios da FORP e do Departamento de Farmacologia da FMRP,
pelo cuidado e respeito que dedicam aos animais do biotério.*

Resumo

RESUMO

GOMES, F. V. **Tratamento repetido com canabidiol atenua alterações comportamentais e moleculares em um modelo de esquizofrenia baseado no antagonismo dos receptores NMDA.** 2014. 219 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Dados pré-clínicos e clínicos indicam que o canabidiol (CBD), um composto não-psicotomimético presente na planta *Cannabis sativa*, induz efeitos tipo-antipsicóticos. No entanto, poucos estudos em animais de laboratório investigaram as propriedades antipsicóticas do tratamento repetido com CBD. As alterações comportamentais induzidas pelo tratamento repetido com antagonistas dos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) têm sido propostas como um modelo animal de esquizofrenia. Evidências sugerem que uma hipofunção dos receptores NMDA estaria envolvida nos sintomas positivos, bem como nos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia. Assim, no presente estudo, nós avaliamos se o tratamento repetido com CBD atenuaria as alterações comportamentais e moleculares induzidas pela administração crônica de um desses antagonistas, o MK-801. Camundongos C57BL/6J receberam injeções intraperitoneais diárias de MK-801 (0,1, 0,5 ou 1 mg/kg) durante 14, 21 ou 28 dias. Vinte e quatro horas após a última injeção, os animais foram submetidos ao teste de inibição pelo pré-pulso (PPI). Posteriormente, foi avaliado se o tratamento repetido com CBD (15, 30 e 60 mg/kg) atenuaria o prejuízo no teste de PPI induzido pelo MK-801 (1 mg/kg; por 28 dias). O tratamento com CBD iniciou-se no sexto dia após o início da administração de MK-801 e continuou até o final do tratamento. Nós também avaliamos se o tratamento com CBD atenuaria as alterações comportamentais induzidas pelo MK-801 nos testes de interação social e reconhecimento de objeto. Imediatamente após os testes comportamentais, os cérebros dos animais foram

removidos e processados para posterior avaliação de alterações moleculares. Foram avaliadas as alterações na expressão das proteínas FosB/ Δ FosB e parvalbumina, um marcador de atividade neuronal e uma proteína de ligação ao cálcio expressa em uma subclasse de interneurônios GABAérgicos, respectivamente. Alterações na expressão do RNAm para o gene da subunidade obrigatória GluN1 do receptor NMDA (GRN1) também foram avaliadas. Adicionalmente, um número crescente de estudos indica que condições neuroinflamatórias e células gliais, como microglia e astrócitos, parecem estar envolvidas na patogênese da esquizofrenia. E, devido ao fato que o CBD, além de suas propriedades antipsicóticas, também induz efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores, nós também avaliamos possíveis alterações na expressão de NeuN (um marcador neuronal), Iba-1 (um marcador de microglia) e GFAP (um marcador de astrócitos) induzidas pelos tratamentos. Os efeitos do CBD foram comparados àqueles induzidos pelo antipsicótico atípico clozapina. A administração de MK-801, na dose de 1 mg/kg, por 28 dias induziu um prejuízo no teste de PPI, um efeito atenuado pelo tratamento repetido com CBD (30 e 60 mg/kg). Adicionalmente, o CBD também foi capaz de atenuar os prejuízos nos testes de interação social e reconhecimento de objeto induzidos pelo MK-801. Além das alterações comportamentais, o tratamento repetido com MK-801 aumentou a expressão da proteína FosB/ Δ FosB e diminuiu a expressão da parvalbumina no córtex pré-frontal medial (CPFm). Uma diminuição da expressão do mRNA para GRN1 no hipocampo também foi observada. O tratamento com MK-801 resultou ainda em aumento no número de astrócitos GFAP-positivos no CPFm e na porcentagem de células microgliais Iba-1-positivas apresentando um fenótipo reativo no CPFm e hipocampo dorsal, mas sem alterar o número total de células Iba-1-positivas. Nenhuma alteração no número de células NeuN-positivas foi observada. Assim como para as alterações comportamentais, as alterações moleculares induzidas pelo MK-801 também foram atenuadas pelo CBD. Entretanto, o CBD por si só não induziu qualquer efeito. Além disso, os efeitos do CBD foram semelhantes àqueles induzidos pelo tratamento repetido com clozapina. Estes resultados indicam que o tratamento repetido com o CBD, semelhante à clozapina, atenuou as alterações comportamentais tipo-esquizofrenia e as alterações moleculares observadas após a administração repetida de um antagonista dos receptores NMDA.

Estes dados reforçam a proposta de que o CBD possui propriedades antipsicóticas. Embora os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesses efeitos não estejam completamente elucidados, eles poderiam envolver as propriedades antiinflamatórias e neuroprotetoras do CBD. Além disso, nossos dados suportam a visão de que a inibição da microglia ativada pode ser benéfica para a melhora dos sintomas da esquizofrenia.

Palavras-chave: canabidiol, esquizofrenia, receptor NMDA, células da glia, clozapina.

Abstract

ABSTRACT

GOMES, F. V. **Repeated cannabidiol treatment attenuates behavioral and molecular changes observed in an animal model of schizophrenia based on the antagonism of NMDA receptors.** 2014. 219 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Preclinical and clinical data suggest that cannabidiol (CBD), a major non-psychotomimetic compound from *Cannabis sativa*, induces antipsychotic-like effects. However, the antipsychotic properties of repeated CBD treatment have been poorly investigated. Behavioral changes induced by repeated treatment with glutamate NMDA receptor antagonists have been proposed as an animal model of schizophrenia-like symptoms. Evidence suggests that NMDA receptor hypofunction could be involved, in addition to the positive, also to the negative symptoms and cognitive deficits found in schizophrenia patients. In the present study we evaluated if repeated treatment with CBD would attenuate the behavioral and molecular changes induced by chronic administration of one of these antagonists, MK-801. Male C57BL/6J mice received daily intraperitoneal injections of MK-801 (0.1, 0.5 or 1 mg/kg) for 14, 21 or 28 days. Twenty-four hours after the last injection animals were submitted to the prepulse inhibition (PPI) test. After that, we investigated if repeated treatment with CBD (15, 30 and 60 mg/kg) would attenuate the PPI impairment induced by chronic treatment with MK-801 (1 mg/kg; 28 days). We also evaluate if the repeated CBD treatment would attenuate the MK-801-induced behavioral changes in social interaction and novel object recognition tests. CBD treatment began on the 6th day after the start of MK-801 administration and continued until the end of the treatment. Immediately after the behavioral tests, the mice brains were removed and processed to evaluate molecular changes. We measured changes in FosB/ Δ FosB and parvalbumin expression, a marker of neuronal activity and

a calcium-binding protein expressed in a subclass of GABAergic interneurons, respectively. Changes in the mRNA expression of the NMDA receptor GluN1 subunit gene (GRN1) were also evaluated. Additionally, an increasing number of data has linked schizophrenia with neuroinflammatory conditions, and glial cells, such as microglia and astrocytes, have become increasingly attractive as candidates accounting for the pathogenesis of schizophrenia. And besides its antipsychotic properties, CBD also induces anti-inflammatory and neuroprotective effects. Thus, we also evaluated changes in NeuN (a neuronal marker), Iba-1 (a microglia marker) and GFAP (an astrocyte marker) expression in the medial prefrontal cortex (mPFC), dorsal striatum, nucleus *accumbens* core and shell, and dorsal hippocampus by immunohistochemistry. CBD effects were compared to those induced by the atypical antipsychotic clozapine. MK-801 administration at the dose of 1 mg/kg for 28 days impaired PPI responses. Chronic treatment with CBD (30 and 60 mg/kg) attenuated MK801-induced PPI impairment. CBD treatment also attenuated the impairment in social interaction and NOR tests induced by MK-801 treatment. Besides behavioral disruption, MK-801 treatment increased FosB/ Δ FosB expression and decreased parvalbumin expression in the mPFC. A decreased mRNA level of GRN1 in the hippocampus was also observed. Repeated MK-801 treatment also increased the number of GFAP-positive astrocytes in the mPFC and increased the percentage of Iba-1-positive microglia cells with a reactive phenotype in the mPFC and dorsal hippocampus without changing the number of Iba-1-positive cells. In addition, no change in the number of NeuN-positive cells was observed. All the molecular changes were attenuated by CBD. CBD by itself did not induce any effect. Moreover, CBD effects were similar to those induced by repeated clozapine treatment. These results indicate that repeated treatment with CBD, similar to clozapine, reverses the psychotomimetic-like effects and attenuates molecular changes observed after chronic administration of an NMDA receptor antagonist. These data reinforce the proposal that CBD may induce antipsychotic-like effects. Although the possible mechanism of action of these effects is still unknown, it may involve CBD anti-inflammatory and neuroprotective properties. Furthermore, our data support the view that inhibition of microglial activation may improve schizophrenia symptoms.

Keywords: cannabidiol, schizophrenia, NMDA receptor, glia cells, clozapine.

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG – 2-araquidonoilglicerol

AP – anteroposterior

ANOVA – análise de variância

BSA – soro albumina bovina

CA1 – Corno de Amon 1

CA3 – Corno de Amon 3

CBD – canabidiol

CLO – clozapina

CPF – córtex pré-frontal

CPFm – córtex pré-frontal medial

DAB – tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina

EPM – erro padrão da média

FAAH – enzima amido hidrolase de ácidos graxos (do inglês: *fatty acid amide hydrolase*)

FORP – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

GABA – Ácido gama-aminobutírico (do inglês: *gamma-aminobutyric acid*)

GAD67 – glutamato descarboxilase 67

GFAP – proteína glial fibrilar ácida (do inglês: *glial fibrillary acidic protein*)

GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (do inglês: *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

LCE – labirinto em cruz elevado

Iba-1 – molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado 1 (do inglês: *ionized calcium binding adaptor molecule 1*)

IL – córtex pré-frontal medial infra-límbico

iNOS – enzima óxido nítrico sintase induzível

IS – interação social

mGLUR – receptor glutamatérgico metabotrópico

NAc – núcleo *accumbens*

NeuN – do inglês: *neuronal nuclei*

NADPH – enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (do inglês: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*)

NMDA – N-metil-D-aspartato

OC – objeto conhecido no teste de reconhecimento de objeto

ON – objeto novo no teste de reconhecimento de objeto

PL – córtex pré-frontal medial pré-límbico

PBS – solução tampão fosfato salina (do inglês: *phosphate buffered saline*)

PFA – paraformaldeído

PPI – inibição pelo pré-pulso (do inglês: *prepulse inhibition*)

RO – reconhecimento de objeto

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (do inglês: *Reverse transcription polymerase chain reaction*)

SAL – salina

SNC – sistema nervoso central

S-N-K – teste *Student* de Newman-Keuls

USP – Universidade de São Paulo

T1 – sessão de aquisição no teste reconhecimento de objeto

T2 – sessão de retenção no teste de reconhecimento de objeto

TRPV1 – receptor vanilóide de potencial transitório 1

VEI – veículo

Δ^9 -THC – Δ^9 -tetraidrocanabinol

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Células microgliais imunorreativas para Iba-1 e classificadas de acordo com seus aspectos morfológicos.

Figura 2 – Representação esquemática do procedimento experimental (experimento 2) mostrando o período de tratamento e o dia no qual foram realizados o teste de PPI e a coleta de material para os experimentos de imunoistoquímica para as proteínas FosB/ Δ FosB e parvalbumina e para a avaliação da expressão do RNAm para a subunidade GluN1 do receptor NMDA por RT-PCR.

Figura 3 – Representação esquemática do procedimento experimental (experimento 3) mostrando o período de tratamento com MK-801, a indicação de uma única administração de CBD ou clozapina no último dia de tratamento com o MK-801 e o dia no qual foi realizado o teste de PPI.

Figura 4 – Representação esquemática do procedimento experimental (experimento 4) mostrando o período de tratamento e os dias nos quais foram realizados os testes de interação social (IS) e reconhecimento de objeto (RO) e a posterior retirada do encéfalo para os ensaios de imunoistoquímica para NeuN, GFAP e Iba-1.

Figura 5 – Representação esquemática do procedimento experimental (experimento 5) mostrando o período de tratamento e os dias nos quais foram realizados o LCE e o teste do campo aberto.

Figura 6 – Efeito do tratamento repetido com MK-801 (0,1, 0,5 ou 1 mg/kg) por 14, 21 e 28 dias no teste de PPI.

Figura 7 – Efeito da administração repetida de CBD (15, 30 ou 60 mg/kg), clozapina (CLO, 1 mg/kg) ou veículo (VEI) seguido do tratamento com salina (SAL) ou MK-801 (1 mg/kg) sobre o peso corporal durante os 28 dias de tratamento.

Figura 8 – Efeito do tratamento com CBD (15, 30 ou 60 mg/kg) e clozapina (CLO, 1 mg/kg) sobre o prejuízo no teste de PPI causado pelo tratamento repetido com MK-801 (1 mg/kg) por 28 dias.

Figura 9 – Efeito de uma única administração de CBD (30 ou 60 mg/kg), clozapina (CLO, 1 mg/kg) ou veículo (VEI) no último dia do tratamento repetido (28 dias) com salina (VEI) ou MK-801 (1 mg/kg) no teste de PPI, que foi realizado 24 h após o fim do tratamento.

Figura 10 – Efeito da administração repetida de clozapina (CLO, 1 mg/kg), CBD (30 ou 60 mg/kg) ou veículo (VEI) sobre o prejuízo na interação social induzido pelo tratamento com MK-801 (1 mg/kg) por 28 dias.

Figura 11 – Efeito da administração repetida de CBD (30 ou 60 mg/kg), clozapina (CLO, 1 mg/kg) ou veículo (VEI) sobre o prejuízo cognitivo induzido pelo tratamento com MK-801 (1 mg/kg) por 28 dias no teste de reconhecimento de objeto.

Figura 12 – Efeito do tratamento repetido com MK-801 (1 mg/kg), clozapina (CLO, 1 mg/kg) e CBD (60 mg/kg) sobre a expressão da proteína FosB/ Δ FosB no CPFm e no NAc *core*.

Figura 13 – Efeito do tratamento repetido com clozapina (CLO, 1 mg/kg); CBD (60 mg/kg) e MK-801 (1 mg/kg) sobre o número de células FosB/ Δ FosB-positivas no estriado dorsal, NAc *shell*, giro denteado, CA1 e CA3.

Figura 14 – Efeito do tratamento repetido com MK-801 (1 mg/kg), clozapina (CLO, 1 mg/kg) e CBD (60 mg/kg) sobre a expressão da proteína parvalbumina no CPFm.

Figura 15 – Efeito do tratamento repetido com clozapina (CLO, 1 mg/kg); CBD (60 mg/kg) e MK-801 (1 mg/kg) sobre o número de células parvalbumina-positivas no estriado dorsal, giro denteado, CA1 e CA3.

Figura 16 – Efeito do tratamento repetido com MK-801 (1 mg/kg), clozapina (CLO, 1 mg/kg) e CBD (60 mg/kg) sobre a expressão da proteína GFAP no CPFm.

Figura 17 – Efeito do tratamento repetido com clozapina (CLO, 1 mg/kg); CBD (60 mg/kg) e MK-801 (1 mg/kg) sobre o número de células GFAP-positivas no estriado dorsal, NAc *core*, NAc *shell*, giro denteado, CA1 e CA3.

Figura 18 – Efeito do tratamento repetido com clozapina (CLO, 1 mg/kg); CBD (60 mg/kg) e MK-801 (1 mg/kg) sobre a reatividade microglial no CPFm, giro denteado e CA1.

Figura 19 – Efeito do tratamento repetido com MK-801 (1 mg/kg), clozapina (CLO; 1 mg/kg) e CBD (60 mg/kg) sobre a expressão do RNAm para o gene da subunidade GluN1 do receptor NMDA (GRN1) no córtex frontal, estriado e hipocampo.

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amplitude da resposta de sobressalto ao pulso avaliada no teste de PPI realizado 24 h após o fim do tratamento com MK-801 por 14, 21 ou 28 dias.

Tabela 2 – Amplitude da resposta de sobressalto ao pulso avaliada no teste de PPI realizado 24 h após o fim do tratamento repetido com CBD, clozapina e MK-801 por 28 dias.

Tabela 3 – Amplitude da resposta de sobressalto ao pulso avaliada no teste de PPI realizado 24 h após o fim do tratamento repetido MK-801 por 28 dias, sendo o CBD e a clozapina administrados apenas no último dia de tratamento com MK-801.

Tabela 4 – Efeitos induzidos pelos tratamentos como MK-801, CBD e clozapina nos comportamentos avaliados no LCE e no teste do campo aberto.

Tabela 5 – Efeito do tratamento repetido com MK-801, CBD e clozapina sobre a expressão de NeuN.

Tabela 6 – Efeito do tratamento repetido com MK-801, CBD e clozapina sobre o número de células Iba-1-positivas e sobre a porcentagem dos diferentes fenótipos morfológicos de microglia.

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	32
1.1. Esquizofrenia.....	33
1.1.1. <i>A origem do termo</i>	<i>33</i>
1.1.2. <i>A natureza atual do problema.....</i>	<i>33</i>
1.2. Hipóteses neuroquímicas da esquizofrenia: foco na hipofunção dos receptores NMDA	36
1.3. Marcadores inflamatórios: mais peças para o complexo quebra-cabeça da esquizofrenia.....	41
1.4. Cannabis e esquizofrenia	43
1.5. O canabidiol (CBD)	45
1.5.1. <i>O CBD e suas propriedades antipsicóticas.....</i>	<i>45</i>
1.5.2. <i>Possíveis estruturas cerebrais e mecanismos de ação envolvidos nos efeitos antipsicóticos do CBD</i>	<i>50</i>
2. HIPÓTESE	55
3. OBJETIVOS.....	56
3.1. Objetivos gerais	57
3.2. Objetivos específicos	57
4. MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1. Animais	60
4.2. Drogas.....	60
4.3. Testes comportamentais	61
4.3.1. <i>Teste de inibição pelo pré-pulso (PPI).....</i>	<i>61</i>
4.3.2. <i>Interação social.....</i>	<i>64</i>
4.3.3. <i>Teste de reconhecimento de objeto.....</i>	<i>64</i>
4.3.4. <i>Labirinto em cruz elevado (LCE).....</i>	<i>65</i>
4.3.5. <i>Avaliação da atividade locomotora em campo aberto.....</i>	<i>66</i>

4.4. Imunoistoquímica para detecção das proteínas FosB/ΔFosB e parvalbumina.....	66
4.5. Imunoistoquímica para detecção das proteínas NeuN, GFAP e Iba-1.....	68
4.6. Avaliação quantitativa das células FosB/ΔFosB, parvalbumina, NeuN, GFAP e Iba-1-positivas.....	70
4.7. Medida da expressão do RNAm para a subunidade obrigatória do receptor NMDA GluN1 por RT-PCR em tempo real.....	74
4.8. Procedimentos experimentais.....	75
4.8.1. <i>Experimento 1: Efeito do tratamento repetido com MK-801 no teste de PPI.....</i>	<i>75</i>
4.8.2. <i>Experimento 2: Efeito do tratamento repetido com CBD e clozapina sobre o prejuízo no teste de PPI induzido pelo tratamento com MK-801.....</i>	<i>76</i>
4.8.3. <i>Experimento 3: Efeito de uma única administração de CBD e clozapina no último dia de tratamento repetido com MK-801 sobre o prejuízo no teste de PPI.....</i>	<i>77</i>
4.8.4. <i>Experimento 4: Efeito do tratamento repetido com CBD e clozapina sobre as alterações nos testes de interação social e reconhecimento de objeto induzidas pelo tratamento com MK-801.....</i>	<i>78</i>
4.8.5. <i>Experimento 5: Avaliação do tratamento repetido com CBD, clozapina e MK-801 nos comportamentos avaliados no LCE e no teste do campo aberto ...</i>	<i>79</i>
4.8.6. <i>Experimento 6: Alterações induzidas pelos tratamentos com MK-801, CBD e clozapina na expressão de FosB/ΔFosB, parvalbumina, NeuN, GFAP e Iba-1 avaliadas por imunoistoquímica.....</i>	<i>80</i>
4.8.7. <i>Experimento 7: Efeito dos tratamentos com MK-801, CBD e clozapina na expressão do RNAm para a subunidade GluN1 do receptor NMDA</i>	<i>81</i>
4.9. Análise dos dados e estatística.....	81
5. RESULTADOS.....	84
5.1. Experimento 1: Efeito do tratamento repetido com o antagonista dos receptores NMDA MK-801 por 14, 21 e 28 dias no teste de PPI.....	85
5.2. Experimento 2: Efeito do CBD e da clozapina sobre o prejuízo no PPI induzido pelo tratamento com MK-801 por 28 dias.....	87

5.3. Experimento 3: Efeito de uma única administração de CBD e clozapina no último dia de tratamento repetido com MK-801 sobre o prejuízo no teste de PPI	90
5.4. Experimento 4: Efeito do tratamento repetido com CBD e clozapina sobre as alterações nos testes de interação social e reconhecimento de objeto induzidas pelo tratamento com MK-801	92
5.5. Experimento 5: Avaliação do tratamento repetido com CBD, clozapina e MK-801 nos comportamentos avaliados no LCE e teste do campo aberto	96
5.6. Alteração na expressão de FosB/ Δ FosB, parvalbumina, NeuN, GFAP, Iba-1 induzida pelo tratamento repetido com MK-801, CBD e clozapina em estruturas cerebrais específicas	97
5.7. Alteração na expressão do RNAm para o gene da subunidade obrigatória GluN1 do receptor NMDA (GRN1) induzida pelo tratamento repetido com MK-801, CBD e clozapina	110
6. DISCUSSÃO	112
7. CONCLUSÃO	130
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
9. ANEXOS	155

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esquizofrenia

1.1.1. A origem do termo

O termo esquizofrenia deriva do grego, significando "cisão das funções mentais" (do grego *schizo* = divisão, cisão; *phrenos* = mente). A primeira descrição do que hoje nós conhecemos como esquizofrenia é usualmente creditada ao psiquiatra alemão Emil Kraepelin. No entanto, Kraepelin, em 1896, para distinguir duas formas principais de insanidade, separou os transtornos afetivos do que chamou, então, "*dementia praecox*". Este nome decorre da progressiva deterioração das funções cognitivas, que se inicia na idade juvenil, ao contrário das demências características da idade tardia. Em 1911, o psiquiatra suíço Eugen Bleuer usou o termo em alemão "*schizophreniegruppe*", referindo-se ao "grupo das esquizofrenias" para designar a mesma condição, salientando, no entanto, as manifestações positivas, como desintegração da personalidade e distúrbios de formulação e expressão do pensamento. Além disso, Bleuer enfatizou que a doença não era uma demência e nem sempre se iniciava na adolescência. Desde então o termo esquizofrenia passou a ser largamente empregado, apesar das numerosas divergências sobre sua abrangência (Jones e Buckley, 2006; Guimarães *et al.*, 2012)

1.1.2. A natureza atual do problema

Cento e quatro anos após o uso do termo esquizofrenia pela primeira vez, este transtorno permanece como uma das doenças mentais mais graves e incapacitantes. A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico crônico, de natureza complexa, que afeta cerca de 1% da população mundial (Mcgrath *et al.*, 2008), com

enorme impacto para os pacientes e suas famílias, assim como para a sociedade como um todo. Estimativas sugerem que 50% das pessoas diagnosticadas com esquizofrenia tornam-se significante e permanentemente incapacitadas (Rupp e Keith, 1993). Em 2001, segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a esquizofrenia aparecia como uma das principais causas de incapacidade (OMS, 2001).

Não há um consenso sobre se a esquizofrenia é uma entidade nosológica única ou um conjunto de disfunções com diversas etiologias. Além disso, apesar de intensa pesquisa, as causas da esquizofrenia são ainda desconhecidas. Mas, como para a maioria das condições psiquiátricas, acredita-se que a esquizofrenia origina-se a partir da interação entre fatores etiológicos como, por exemplo, entre fatores psicológicos, socioambientais e genéticos (Lewis e Lieberman, 2000). Tem sido postulado que a heterogeneidade de sintomas observada nos portadores de esquizofrenia pode ser decorrente de sua etiologia ampla e esta gama de sintomas resultaria de diferentes mecanismos fisiopatológicos ou diferenças constitucionais inatas atuando em conjunto com fatores ambientais (Tsuang *et al.*, 1990; Lewis e Lieberman, 2000).

Os sintomas da esquizofrenia são geralmente agrupados em três grandes grupos denominados de sintomas positivos, negativos e cognitivos (Andreasen, 1995; Wong e Van Tol, 2003). Os sintomas positivos são caracterizados por fenômenos mentais que estão ausentes em indivíduos sadios, que são principalmente alucinações e ideias delirantes. O termo “sintomas negativos” é utilizado para descrever a perda ou o prejuízo significativo de funções psicológicas consideradas normais, como a perda da motivação, comprometimento social e embotamento afetivo (Andreasen, 1995). Já os sintomas cognitivos afetam os processos de

atenção e memória, a função executiva e o funcionamento intelectual geral (Wong *et al.*, 1997; Adad *et al.*, 2000).

A esquizofrenia é tipicamente diagnosticada no final da adolescência ou início da idade adulta, sendo frequentemente associada com períodos de incapacidade ao longo da vida do paciente, especialmente quando não se tem acesso a serviços de saúde adequados, gerando um alto custo econômico (Silverstein *et al.*, 2013), tendo um grande efeito em todos os níveis da sociedade, incluindo empregadores, instituições de saúde, orçamentos públicos (municipais, estaduais e nacional) e pacientes e suas famílias. Apenas nos Estados Unidos, o custo total da esquizofrenia, incluindo os gastos diretos (por exemplo, tratamento farmacoterapêutico e hospitalizações) e indiretos (por exemplo, perda de produtividade no trabalho e desemprego), foi estimado em 62,7 bilhões de dólares por ano, sendo considerado o transtorno psiquiátrico mais oneroso em relação aos gastos por paciente (Wu *et al.*, 2005).

Apesar do considerável progresso no conhecimento da fisiopatologia da esquizofrenia graças ao uso de técnicas de biologia molecular e neuroimagem, em geral, a percepção no campo é que uma compreensão integrada da doença ou de melhores métodos para tratá-la ainda não estão próximos (Insel, 2009). Nenhum progresso ocorreu em uma série de pontos considerados críticos. Por exemplo, o diagnóstico ainda é relativamente tardio no curso da trajetória do neurodesenvolvimento - ocorrendo geralmente após o surgimento dos sintomas psicóticos, mas muitos anos depois do início do declínio cognitivo, acadêmico e social (sintomas negativos). Essa observação é importante, uma vez que evidências sugerem uma associação entre prejuízos cognitivos e sintomas negativos com piores

resultados funcionais na esquizofrenia (Green, 1996; Elvevag e Goldberg, 2000; Lesh *et al.*, 2011).

Adicionalmente, apesar do desenvolvimento de novos antipsicóticos ao longo dos últimos 20 anos, nenhum aumento na eficácia tem sido demonstrado em comparação com os medicamentos desenvolvidos nas décadas de 1950 e 1960, como a clorpromazina e o haloperidol (Lieberman *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2007; Lewis e Lieberman, 2008), e com alta taxa de abandono ao tratamento devido à falta de eficácia e baixa tolerabilidade (Lieberman *et al.*, 2005). Além disso, enquanto os medicamentos existentes têm se mostrado eficazes no tratamento dos sintomas positivos, sua eficácia sobre os sintomas negativos e déficits cognitivos é limitada (Elvevag e Goldberg, 2000; Hanson *et al.*, 2010), o que indica uma grande necessidade de novos agentes farmacológicos para o tratamento da esquizofrenia. Esta deficiência pode refletir em parte a dominância por muitos anos da hipótese baseada em alterações na neurotransmissão dopaminérgica para explicar a doença.

1.2. Hipóteses neuroquímicas da esquizofrenia: foco na hipofunção dos receptores NMDA

Apesar de intensa pesquisa, as causas da esquizofrenia ainda são desconhecidas. As principais hipóteses para explicar a doença são resultantes da ação de drogas na prática clínica ou resultado das similaridades entre os sintomas da doença e os efeitos de certas drogas que induzem efeitos psicotomiméticos, como agonistas dopaminérgicos diretos, como a apomorfina, drogas que promovem a liberação de dopamina, como a anfetamina, e antagonistas dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA), como a

fenciclidina, a quetamina e o MK-801 (Hutchison e Swift, 1999; Jentsch e Roth, 1999).

O desequilíbrio da neurotransmissão dopaminérgica é a hipótese mais aceita para explicar a fisiopatologia da esquizofrenia. O aumento dos níveis de dopamina na via mesolímbica seria responsável pelo surgimento dos sintomas positivos da doença e os sintomas negativos seriam explicados pela redução da neurotransmissão dopaminérgica na via mesocortical (Davis *et al.*, 1991; Seeman e Kapur, 2000). A hipótese dopaminérgica é baseada entre outras, em duas principais observações: o antagonismo de receptores dopaminérgicos do subtipo D2 parece ser um pré-requisito essencial para a eficácia terapêutica da maioria dos antipsicóticos sobre os sintomas positivos da doença e surtos psicóticos podem ser induzidos em indivíduos sadios e exacerbados em pacientes com esquizofrenia por drogas que facilitam ou aumentam a neurotransmissão dopaminérgica (Seeman e Kapur, 2000).

Embora a dopamina apresente um papel central na esquizofrenia, uma hipótese glutamatérgica da esquizofrenia também tem sido apresentada, sugerindo que uma hipofunção da neurotransmissão glutamatérgica poderia relacionar-se com aspectos específicos da doença (Jentsch e Roth, 1999; Tsai e Coyle, 2002; Javitt, 2007). O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), exerce os seus efeitos interagindo com receptores ionotrópicos e metabotrópicos (Dingledine *et al.*, 1999; Kew e Kemp, 2005). Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) possuem sete domínios transmembrana, sendo divididos de acordo com sua homologia, farmacologia e sistema de segundo mensageiros em três grupos: tipo I (mGluR 1 e 5), tipo II (mGluR 2 e 3) e tipo III (mGluR 4, 6, 7 e 8) (Pin e Acher, 2002). Já para os receptores ionotrópicos foram descritos três subtipos: NMDA, AMPA e cainato (Dingledine *et al.*, 1999). Os

receptores glutamatérgicos ionotrópicos, particularmente o subtipo NMDA, são os sítios de ação da quetamina e fenciclidina, drogas antagonistas desses receptores, que são capazes de induzir alterações comportamentais e emocionais que se assemelham aos sintomas de transtornos psicóticos em humanos e animais (Javitt e Zukin, 1991; Tsai e Coyle, 2002; Coyle *et al.*, 2003).

Os receptores NMDA são compostos por quatro ou cinco subunidades, uma subunidade GluN1 obrigatória e uma combinação de subunidades GluN2 (A, B, C, D) e GluN3 (A, B) (Hollmann *et al.*, 1994). A composição de subunidades determina a cinética de abertura e as propriedades farmacológicas do receptor. Além disso, mudanças na sua expressão podem alterar a função e a capacidade de resposta do sistema glutamatérgico (Hollmann *et al.*, 1994). Por exemplo, animais *knockdown* para a subunidade GluN1, expressando apenas 5%-10% dos níveis de receptores NMDA, apresentam anormalidades comportamentais tipo-esquizofrenia que foram atenuadas por antipsicóticos (Mohn *et al.*, 1999). Além disso, há evidências de que a ligação de drogas a esses receptores e a expressão de suas subunidades está alterada em estruturas cerebrais *postmortem*, como no córtex pré-frontal (CPF), de pacientes com esquizofrenia, sendo que estas alterações foram sugeridas estarem envolvidas na fisiopatologia dos sintomas negativos e cognitivos (Weinberger, 1988; Akbarian *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2000; Dracheva *et al.*, 2001). Estes dados sugerem um papel para o glutamato na esquizofrenia e, possivelmente, na manifestação de sintomas específicos da doença. Além disso, há uma íntima e recíproca interação entre glutamato e dopamina em diferentes regiões cerebrais, sugerindo que as anormalidades do sistema dopaminérgico podem afetar a transmissão glutamatérgica e vice-versa (Duncan *et al.*, 1999; Javitt, 2007; Lang *et al.*, 2007; Stone *et al.*, 2007).

Drogas que agem como antagonistas não competitivos dos receptores NMDA, como a fenciclidina e a quetamina induzem, em humanos, alterações semelhantes aos sintomas da esquizofrenia, incluindo transtornos do pensamento, delírios, comprometimento cognitivo e, principalmente, um distanciamento emocional que tem sido comparado com os sintomas negativos da esquizofrenia (Krystal *et al.*, 1994; Javitt, 2007). Em contraste, drogas que aumentam a transmissão dopaminérgica, tais como a anfetamina, não induzem alterações relacionadas aos sintomas negativos e cognitivos (Krystal *et al.*, 2005).

Modelos animais baseados na administração aguda e crônica de antagonistas dos receptores NMDA têm sido extensamente utilizados no estudo da neurobiologia da esquizofrenia e na pesquisa de substância com propriedades antipsicóticos (Javitt e Zukin, 1991; Mandillo *et al.*, 2003; Rujescu *et al.*, 2006; Bubenikova-Valesova *et al.*, 2008). Entretanto, tem sido proposto que os efeitos da administração crônica, ao contrário da aguda, representam melhor as alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroanatômicas observadas em pacientes com esquizofrenia, apresentando boa validade de face e de constructo teórico (Jentsch e Roth, 1999). Entre estas alterações, uma diminuição na expressão de parvalbumina, uma proteína de ligação ao cálcio expressa em uma subclasse de interneurônios GABAérgicos, tem sido observada após o tratamento crônico com antagonistas dos receptores NMDA em roedores (Abdul-Monim *et al.*, 2007).

Os interneurônios GABAérgicos parvalbumina-positivos são neurônios GABAérgicos que formam sinapses inibitórias com o corpo celular (para os interneurônios parvalbumina-positivos do tipo "*basket*") ou o segmento inicial do axônio de neurônios glutamatérgicos piramidais (para os interneurônios parvalbumina-positivos do tipo "*chandelier*"). Assim, as células "*basket*" e "*chandelier*"

controlam, respectivamente, o *input* e o *output* dos neurônios piramidais; e sinapses GABAérgicas recíprocas constituem uma rede celular capaz de sincronizar o estado excitatório de grande número de neurônios piramidais (Bartos *et al.*, 2007), exercendo um controle temporal preciso sobre a informação que flui através desses neurônios.

Uma redução na expressão de parvalbumina também tem sido consistentemente observada no cérebro *postmortem* de pacientes com esquizofrenia (Lewis *et al.*, 2005). Evidências apontam que esta alteração possa ser mediada por uma hipofunção na sinalização mediada pelos receptores NMDA (Gonzalez-Burgos e Lewis, 2012), que resultaria em desequilíbrio no estado redox (Steullet *et al.*, 2014).

Estudos mostram que a deleção da subunidade GluN1 dos receptores NMDA em interneurônios-parvalbumina positivos de camundongos, resultou em redução na expressão de parvalbumina e da enzima glutamato descarboxilase 67 (GAD67), que é responsável pela síntese de GABA, juntamente com estresse oxidativo nessas células (Belforte *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2013). Ainda nesses animais, o isolamento social exacerbou o estresse oxidativo e a redução na expressão de parvalbumina, sendo que essas alterações foram atenuadas pela apocinina, um antioxidante que atua com sequestrador de espécies reativas de oxigênio (Jiang *et al.*, 2013). Além disso, devido a relação entre estresse oxidativo e inflamação, moléculas pró-inflamatórias poderiam estar envolvidas nas alterações observadas em interneurônios parvalbumina-positivos. De fato, Behrens e colaboradores observaram que a interleucina-6, uma citocina pró-inflamatória, mediaría a diminuição da expressão de parvalbumina induzida pela quetamina através do aumento da atividade da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (Behrens *et al.*, 2008).

Alterações na expressão (RNAm e proteína) de subunidades dos receptores NMDA também foram relatadas no cérebro *postmortem* de pacientes com esquizofrenia (Gao *et al.*, 2000; Law e Deakin, 2001; Weickert *et al.*, 2013).

Em relação às alterações comportamentais, tem sido observado prejuízo no filtro sensorio-motor e em funções cognitivas após a administração crônica de antagonistas dos receptores NMDA em testes comportamentais, como nos testes de inibição pelo pré-pulso (PPI) e reconhecimento de objeto (Jentsch *et al.*, 1997; Schulz *et al.*, 2001; Mandillo *et al.*, 2003; Stefani e Moghaddam, 2005; Rujescu *et al.*, 2006; Vales *et al.*, 2006), bem como um prejuízo na interação social em roedores (Rung *et al.*, 2005), um teste utilizado no estudo de sintomas negativos da esquizofrenia (Ellenbroek e Cools, 2000).

Adicionalmente, hipóteses baseadas na disfunção de outros neurotransmissores, como GABA, serotonina e acetilcolina, também têm sido propostas (Higley e Picciotto, 2014; Juckel, 2015).

1.3. Marcadores inflamatórios: mais peças para o complexo quebra-cabeça da esquizofrenia

Alterações em marcadores inflamatórios associadas com doenças neuropsiquiátricas têm sido extensivamente investigadas. Em relação à esquizofrenia, um número crescente de dados clínicos, epidemiológicos e experimentais tem apontando para uma possível associação entre processos inflamatórios e a fisiopatologia da doença. Por exemplo, alguns estudos mostraram: ativação do sistema inflamatório periférico e neuroinflamação em pacientes com esquizofrenia (Doorduyn *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2011); correlação entre esquizofrenia e alterações em genes que controlam a expressão de componentes do

sistema imune (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014); aumento na expressão de marcadores inflamatórios no CPF de pacientes com esquizofrenia em estudos *postmortem* (Fillman *et al.*, 2013); relação entre a exposição pré-natal a agentes inflamatórios com o risco aumentado para esquizofrenia (Rethelyi *et al.*, 2013). Além disso, estudos têm demonstrado que agentes anti-inflamatórios, administrados como adjuvantes ao tratamento antipsicótico, podem melhorar os sintomas da esquizofrenia (Muller *et al.*, 2013).

No SNC, células gliais, como microglia e astrócitos, são responsáveis por mediar as respostas inflamatórias, atuando tanto na indução como na regulação desses processos (Sofroniew e Vinters, 2010; Graeber *et al.*, 2011). Considerando que alterações nestas células têm sido observadas em pacientes com esquizofrenia, foi postulado um envolvimento de processos neuroinflamatórios na patogênese da esquizofrenia (Schnieder e Dwork, 2011; Monji *et al.*, 2013).

Uma das primeiras evidências diretas indicando uma alteração em marcadores gliais no cérebro de pacientes com esquizofrenia foi provido por van Berckel e colaboradores (2008). Usando técnica de imagem por tomografia de emissão de pósitrons, eles mostraram ativação da microglia nos cérebros desses pacientes. Adicionalmente, evidências sugerem que alterações neuroinflamatórias observadas na esquizofrenia também envolveriam uma função anormal dos astrócitos (Rothermundt *et al.*, 2009; Catts *et al.*, 2014). Além disso, estudos de associação genômica ampla indicaram alteração em genes relacionados a sinalização astrocítica nas sinapses em pacientes com esquizofrenia (Goudriaan *et al.*, 2014). Como os astrócitos desempenham um importante papel no metabolismo sináptico do glutamato, GABA e monoaminas, uma disfunção dessas células pode contribuir para as alterações neuroquímicas observadas na esquizofrenia

(Mitterauer, 2014). A ativação microglial também poderia perturbar a neurotransmissão, contribuindo para o aparecimento de sintomas psicóticos na esquizofrenia, uma vez que citocinas secretadas pela microglia ativada, como a interleucina-1 β e interleucina-2, são capazes de modular os níveis de catecolaminas no cérebro (Bernstein *et al.*, 2015).

A maioria dos estudos, entretanto, documenta apenas uma associação entre alterações em marcadores inflamatórios e a esquizofrenia, e não uma associação causa-efeito.

1.4. Cannabis e esquizofrenia

Preparações de *Cannabis sativa* são usadas há muitos séculos antes de Cristo com fins recreativos e medicinais (Zuardi, 2006). Entretanto, apenas em meados do século XX que os principais constituintes ativos da *Cannabis*, também denominados fitocanabinóides, foram isolados e identificados. O componente responsável pela maioria dos efeitos psicotrópicos da *Cannabis* é o Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC), o qual foi isolado, identificado e sintetizado por Raphael Mechoulam e colaboradores na década de 1960 (Gaoni e Mechoulam, 1964).

As investigações sobre o mecanismo de ação do Δ^9 -THC levaram à descoberta de um receptor canabinóide no SNC, denominado CB1 (Devane *et al.*, 1988). O receptor CB1 é o receptor acoplado à proteína G mais abundante no cérebro. Os receptores CB1 localizam-se na membrana do neurônio pré-sináptico e a ativação desse receptor leva a uma inibição da liberação de neurotransmissores, como o glutamato e o GABA (Schlicker e Kathmann, 2001). Sua expressão é particularmente elevada em regiões do encéfalo consideradas importantes para o controle motor, memória, humor e ansiedade, como os núcleos da base, hipocampo,

CPF e amígdala (Herkenham *et al.*, 1990; Herkenham, 1991; Herkenham *et al.*, 1991; Tsou *et al.*, 1998). Um segundo receptor canabinóide, o receptor CB2 (Munro *et al.*, 1993), o qual acreditava-se ser restrito às células imunes, também é expresso no SNC, embora em níveis inferiores aos receptores CB1 (Onaivi, 2006). A descoberta desses receptores levou a uma busca por seus agonistas endógenos (endocanabinóides). O primeiro destes endocanabinóides a ser descoberto, foi denominado anandamida, sendo o termo “ananda” oriundo do sânscrito, que significa “felicidade serena” (Devane *et al.*, 1992). Posteriormente, um segundo endocanabinóide, o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), foi descoberto em 1995 (Mechoulam *et al.*, 1995), e outros logo em seguida (Pacher *et al.*, 2006).

Além das hipóteses baseadas em alterações neuroquímicas, alguns estudos investigam uma possível relação entre o desenvolvimento da esquizofrenia com o uso de drogas de abuso. Por exemplo, uma série de estudos aponta para uma estreita relação entre o consumo de *Cannabis* e esquizofrenia (Arseneault *et al.*, 2004; Hall e Degenhardt, 2008). Foi verificado que a administração aguda de Δ^9 -THC em voluntários sadios induz reações psicóticas e alterações cognitivas similares aos sinais e sintomas da esquizofrenia (D'Souza *et al.*, 2004). Além disso, outros dados indicam que o consumo de *Cannabis* pode piorar os sintomas positivos e cognitivos em pacientes com esquizofrenia (D'Souza *et al.*, 2005). Finalmente, estudos epidemiológicos têm demonstrado que o uso dessa droga pode aumentar o risco para a esquizofrenia (Smit *et al.*, 2004; Semple *et al.*, 2005). No entanto, a existência de uma relação causal entre o consumo de *Cannabis* e a esquizofrenia permanece não comprovada.

1.5. O canabidiol (CBD)

Outro importante constituinte da *Cannabis* é o canabidiol (CBD) que, ao contrário do Δ^9 -THC, é desprovido dos efeitos psicotomiméticos típicos da planta (Zuardi, 2008) e possivelmente não interage com receptores CB1 ou CB2, já que apresenta baixa afinidade para estes receptores (Thomas *et al.*, 1998). O CBD foi isolado em 1940 por Adams e colaboradores, mas sua estrutura e propriedades estereoquímicas foram elucidadas por Mechoulam e Shvo apenas em 1963 (Mechoulam e Shvo, 1963).

Embora o CBD não tenha sido inicialmente reconhecido como um componente ativo, este composto tem atraído recentemente grande interesse devido ao seu potencial terapêutico (Mechoulam *et al.*, 2002), uma vez que diversos estudos clínicos mostram que a administração sistêmica de CBD produz diferentes efeitos farmacológicos, como anticonvulsivante (Cunha *et al.*, 1980; Carlini e Cunha, 1981), neuroprotetor (Hampson *et al.*, 1998; Iuvone *et al.*, 2009), ansiolítico (Crippa *et al.*, 2004) e antipsicótico (Zuardi *et al.*, 2006a).

1.5.1. O CBD e suas propriedades antipsicóticas

Estudos iniciais realizados com animais de laboratório indicaram que o CBD bloqueava os efeitos "excitatórios" induzidos pelo Δ^9 -THC (Karniol e Carlini, 1973). Resultados semelhantes foram posteriormente observados em humanos, nos quais o CBD atenuou a euforia e o comprometimento em tarefas que envolviam percepção temporal induzido pelo Δ^9 -THC em voluntários sadios (Karniol *et al.*, 1974; Dalton *et al.*, 1976). Confirmando e estendendo essas observações, Zuardi e colaboradores (1982) demonstraram que o CBD inibia a ansiedade e os sintomas psicotomiméticos, como pensamentos desconexos, distúrbios de percepção e

despersonalização, induzidos por altas doses de Δ^9 -THC. No mesmo ano, observou-se que pacientes admitidos em um hospital psiquiátrico na África do Sul após o uso de uma variedade de *Cannabis* praticamente desprovida de CBD apresentaram uma maior frequência de episódios psicóticos agudos em comparação com dados de outros países (Rottanburg *et al.*, 1982), sugerindo que a presença de CBD em amostras de *Cannabis* poderia proteger os usuários contra a ocorrência de episódios psicóticos induzidos pelo Δ^9 -THC. E, uma vez que as evidências experimentais indicaram que o efeito do CBD em atenuar os efeitos induzidos pelo Δ^9 -THC não resultava de uma interação farmacocinética entre esses dois canabinóides (Hunt *et al.*, 1981), essas observações iniciais originaram a hipótese de que o CBD possuiria propriedades antipsicóticas. Posteriormente, estudos clínicos e pré-clínicos investigando os efeitos antipsicóticos da administração de CBD obtiveram resultados favoráveis a essa hipótese.

Em um estudo inicial foi investigado se o CBD atenuaria as estereotipias induzidas pela apomorfina, um agonista dos receptores dopaminérgicos, em ratos. Os efeitos do CBD foram comparados com aqueles induzidos pelo antipsicótico típico haloperidol (Zuardi *et al.*, 1991). Ambas as drogas reduziram o comportamento estereotipado induzido pela apomorfina de maneira dose-dependente. Entretanto, diferente do haloperidol, o CBD, mesmo após a administração de doses tão elevadas quanto 480 mg/kg, não induziu catalepsia, um efeito motor extrapiramidal comumente induzido por antipsicóticos típicos. Estes resultados sugerem que o CBD exibe um perfil semelhante ao de drogas antipsicóticas atípicas. Posteriormente, as propriedades antipsicóticas do CBD foram também observadas em modelos animais baseados na disfunção do sistema glutamatérgico, uma vez que esse composto inibiu a hiperlocomoção induzida pela quetamina, um antagonista dos receptores

NMDA, além daquela induzida pela anfetamina, de forma semelhante aos antipsicóticos típico e atípico, haloperidol e clozapina, respectivamente (Moreira e Guimaraes, 2005). Em concordância com essas observações, a administração aguda de CBD, semelhante à clozapina, reverteu o prejuízo no teste de PPI em camundongos, como também reverteu a hiperatividade e a redução da interação social em ratos induzidas pela administração aguda de MK-801, outro antagonista dos receptores NMDA (Long *et al.*, 2006; Gururajan *et al.*, 2011). Antipsicóticos típicos, em contrapartida, são geralmente incapazes de restaurar os déficits nos testes de PPI e de interação social induzidos por antagonistas dos receptores NMDA (Curzon e Decker, 1998; Geyer *et al.*, 2001).

Poucos estudos investigaram os efeitos tipo-antipsicóticos induzidos pelo tratamento repetido com o CBD. Por exemplo, Long e colaboradores (2010) observaram que o tratamento repetido com CBD atenuou a hiperlocomoção induzida pela anfetamina. Entretanto, o tratamento repetido com CBD não atenuou as alterações comportamentais, como hiperlocomoção e prejuízo no teste de PPI, em camundongos transgênicos apresentando uma reduzida expressão da proteína neuroregulina 1 (camundongos NRG1 TM HET), propostos como um modelo de esquizofrenia baseado em susceptibilidade genética (Long *et al.* 2012).

Em humanos, o CBD foi capaz de reverter a inversão de profundidade binocular, um modelo relacionado ao prejuízo na percepção visual durante estados psicóticos (Schneider *et al.*, 2002), induzida pela nabilona (Leweke *et al.*, 2000), um canabinóide sintético que induz efeitos semelhantes ao Δ^9 -THC. Outro modelo utilizado para o estudo de drogas com propriedades antipsicóticas em humanos é baseado na avaliação da atividade dessas drogas sobre os efeitos psicotomiméticos induzidos pela administração intravenosa de doses sub-anestésicas de quetamina.

Esta droga induz alterações que mimetizam os sintomas positivos e negativos e os déficits cognitivos observados em pacientes com esquizofrenia (Krystal *et al.*, 1994). Uma investigação inicial mostrou que o CBD teve uma tendência para reduzir os efeitos dissociativos induzidos pela quetamina em indivíduos saudáveis, mas, ao mesmo tempo, aumentou os efeitos de ativação psicomotora (Hallak *et al.*, 2011). Uma vez que apenas uma dose de CBD foi utilizada, estudos adicionais são necessários para caracterizar os efeitos do CBD neste modelo.

O uso terapêutico do CBD em pacientes com esquizofrenia foi testado pela primeira vez em 1995. Em um estudo de caso aberto, uma paciente de 19 anos com esquizofrenia, apresentando sérios efeitos colaterais após o tratamento com antipsicóticos convencionais, recebeu doses orais crescente de CBD (até 1500 mg/dia) durante 4 semanas (Zuardi *et al.*, 1995). Uma melhora significativa, sem efeitos colaterais, foi observada em todos os itens de uma escala de avaliação psiquiátrica (*Brief Psychiatric Rating Scale* - BPRS) durante o tratamento com CBD, com uma eficácia similar ao haloperidol. Uma piora dos sintomas foi observada após a interrupção da administração de CBD. Em outro estudo de caso, o CBD foi administrado durante 30 dias a três pacientes com esquizofrenia, do sexo masculino e com idade entre 22 e 23 anos, que não eram responsivos ao tratamento com antipsicóticos típicos (Zuardi *et al.*, 2006b). Um paciente apresentou melhora moderada, mas apenas uma ligeira ou nenhuma alteração foi observada nos outros dois pacientes, sugerindo que o CBD não seria eficaz no tratamento da esquizofrenia refratária. Além disso, a administração aguda de CBD não induziu melhora no desempenho de pacientes com esquizofrenia no teste "*Stroop Colour World Test*", que avalia processos de atenção frequentemente prejudicados na

esquizofrenia (Hallak *et al.*, 2010). Entretanto, ainda não se sabe se a administração repetida de CBD poderia melhorar os déficits cognitivos nesse transtorno.

Em estudo avaliando os efeitos do CBD sobre os sintomas psicóticos associados ao uso de L-dopa em pacientes com doença de Parkinson (Zuardi *et al.*, 2009), o tratamento com CBD resultou em efeitos benéficos, reduzindo os escores de um questionário que avalia os sintomas psicóticos na doença de Parkinson (*Parkinson Psychosis Questionnaire*), melhorando os escores totais da BPRS, bem como os itens dessa escala relacionados especificamente aos sintomas positivos e negativos. Confirmando a falta de efeitos motores observados em estudos com animais, o CBD não afetou a função motora desses pacientes.

Portanto, mesmo com alguns resultados negativos, a maioria dos estudos clínicos com indivíduos normais ou pacientes com esquizofrenia sugere que o CBD possua propriedades antipsicóticas. Corroborando essa possibilidade, um ensaio clínico controlado, duplo-cego, de 4 semana e com 42 pacientes com esquizofrenia comparou os efeitos do CBD com os da amisulprida, um antipsicótico atípico, e mostrou que ambos os tratamentos foram igualmente eficazes na redução dos sintomas psicóticos após 2 e 4 semanas de tratamento (Leweke *et al.*, 2012). Além disso, o CBD causou uma menor incidência de sintomas extrapiramidais, ganho de peso e aumento nos níveis de prolactina em comparação com a amisulprida. É importante destacar que nenhum efeito colateral significativo foi observado durante o tratamento com CBD em todos os estudos clínicos citados anteriormente, sugerindo que o CBD é seguro e bem tolerado em pacientes com esquizofrenia ou que apresentam sintomas psicóticos.

1.5.2. Possíveis estruturas cerebrais e mecanismos de ação envolvidos nos efeitos antipsicóticos do CBD

Poucos estudos investigaram as possíveis estruturas cerebrais e os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos antipsicóticos do CBD. No entanto, consistente com resultados obtidos em experimentos comportamentais com animais de laboratório, o CBD e a clozapina, mas não o haloperidol, aumentaram a ativação neuronal, medida pela expressão da proteína c-Fos, no CPF. E, provavelmente, refletindo seus efeitos motores secundários (como, por exemplo, a catalepsia), apenas o haloperidol aumentou a expressão de c-Fos no estriado dorsal. O CBD, além disso, também aumentou a expressão de c-Fos no núcleo *accumbens* (NAc; Guimaraes *et al.*, 2004), um efeito compartilhado por antipsicóticos típicos e atípicos (Robertson e Fibiger, 1992). A administração intracerebroventricular de CBD em ratos também aumentou a expressão da proteína c-Fos em áreas do cérebro relacionadas com a vigília, como o hipotálamo e o núcleo dorsal da rafe (Murillo-Rodriguez *et al.*, 2006), entretanto a relação entre esse achado e as propriedades antipsicóticas do CBD não está clara. Como comentado anteriormente, a expressão da proteína c-Fos pode ser induzida pelo tratamento agudo com antipsicóticos. Entretanto, a sua indução é atenuada dramaticamente pelo tratamento repetido com essas drogas (Hiroi e Graybiel, 1996; Bubser e Deutch, 2002). Além disso, enquanto a proteína c-Fos e maioria das outras proteínas relacionadas a Fos são altamente instáveis e, por isso, desaparecem rapidamente (aproximadamente 2 h) após o fim do estímulo, a proteína FosB e a sua variante truncada Δ FosB acumulam em regiões específicas do cérebro após exposição repetida a diferentes estímulos (Nestler *et al.*, 1999), incluindo a administração repetida de antipsicóticos (Atkins *et al.*, 1999). Assim, as alterações na expressão das proteínas FosB/ Δ FosB induzidas

pelo tratamento repetido com CBD podem indicar possíveis estruturas cerebrais envolvidas nos efeitos deste composto.

Uma série de estudos com voluntários sadios empregando técnicas de neuroimagem comparou os efeitos do CBD e de altas doses de Δ^9 -THC. Consistente com os resultados comportamentais em humanos e roedores, essas drogas causaram efeitos opostos sobre a atividade cerebral no estriado, córtex cingulado anterior, CPF, giro parahipocampal, amígdala, giro temporal superior, giro occipital e cerebelo (Borgwardt *et al.*, 2008; Bhattacharyya *et al.*, 2009; Bhattacharyya *et al.*, 2010; Fusar-Poli *et al.*, 2010; Winton-Brown *et al.*, 2011; Bhattacharyya *et al.*, 2012). Avaliações comportamentais realizadas nesses estudos indicam que algumas dessas mudanças como, por exemplo, a diminuição da ativação do estriado ventral e dorsal e giro cingulado anterior estão associadas com os efeitos psicotomiméticos do Δ^9 -THC (Zuardi *et al.*, 2012), como o CBD é capaz de atenuar esses efeitos induzidos pelo Δ^9 -THC sugere-se que essas estruturas poderiam ser sítios cerebrais de ação do CBD (Campos *et al.*, 2012). No entanto, apenas um estudo investigou as propriedades antipsicóticos da administração intracerebral de CBD em estruturas relacionadas com a neurobiologia da esquizofrenia. Uma atenuação dos prejuízos no teste de PPI induzidos pela administração sistêmica de anfetamina foi observada após a administração intra-NAc de CBD em camundongos (Pedrazzi, 2014), sugerindo que essa estrutura possa estar envolvida nos efeitos tipo-antipsicóticos do CBD.

Em relação aos mecanismos de ação, Leweke e colaboradores (2012), no mesmo estudo citado anteriormente, no qual os efeitos do tratamento com CBD por 4 semanas em pacientes com esquizofrenia foram comparados com aqueles induzidos pela amisulprida, demonstraram que os pacientes com esquizofrenia

tratados com CBD apresentaram maiores níveis séricos de anandamida, um efeito que correlacionou-se positivamente com a melhora dos sintomas psicóticos. Ainda foi observado que o CBD, *in vitro*, inibe a atividade da enzima amido hidrolase de ácidos graxos (FAAH), responsável pelo metabolismo do endocanabinóide anandamida, numa concentração (10 μ M) que não interage com receptores de dopamina, serotonina e glutamato. Assim, indiretamente, devido a ativação de receptores CB1 via aumento dos níveis de anandamida, o CBD poderia modular sistemas neurotransmissores relacionados a estes receptores (Zuardi *et al.*, 2012). Além disso, a facilitação da neurotransmissão mediada por receptores CB1 pelo CBD também aumenta a neurogênese no hipocampo (Wolf *et al.*, 2010), um efeito que pode estar relacionado com um possível efeito benéfico do CBD sobre a atenuação dos déficits cognitivos observados em pacientes com esquizofrenia.

O CBD e a anandamida também podem ativar o receptor vanilóide de potencial transitório 1 (TRPV1). Este mecanismo facilitaria a liberação pré-sináptica de glutamato (Peters *et al.*, 2010). Interessantemente, Long e colaboradores (2006) observaram que os efeitos do CBD, administrado agudamente, na reversão do prejuízo no teste de PPI induzido pelo antagonista dos receptores NMDA MK-801 foram bloqueados pelo pré-tratamento com a capsazepina, um antagonista dos receptores TRPV1. Outros mecanismos que também ajudariam a explicar as propriedades antipsicóticas do CBD são a facilitação da neurotransmissão mediada pelos receptores 5-HT_{1A} (Gomes *et al.*, 2011), um mecanismo compartilhado por alguns antipsicóticos atípicos como, por exemplo, o aripiprazol, que atua como um agonista parcial destes receptores (Jordan *et al.*, 2002), bem como as propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras do CBD (Campos *et al.*, 2012). De fato, em relação as suas propriedades anti-inflamatórias, um número considerável de estudos

indica que o CBD atenua o aumento da reatividade glial associada a condições patológicas (Esposito *et al.*, 2011; Mecha *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2013; Schiavon *et al.*, 2014). No entanto, o envolvimento deste mecanismo nos efeitos antipsicóticos do CBD ainda não foi avaliado em modelos animais de esquizofrenia.

Hipótese

2. HIPÓTESE

Uma vez que as propriedades antipsicóticas do tratamento repetido com CBD, bem como seus efeitos moleculares e as estruturas cerebrais envolvidas, ainda não foram investigadas de forma significativa na literatura. E, como ainda não foi estudado se a administração repetida de CBD seria capaz de reverter as alterações tipo-esquizofrenia observadas após a administração crônica de antagonistas dos receptores NMDA, um modelo que parece representar melhor as alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroanatômicas observadas em pacientes com esquizofrenia, o presente estudo investigou a **hipótese** de que o tratamento repetido com CBD, devido a suas propriedades antipsicóticas, atenua as alterações comportamentais e moleculares induzidas pelo tratamento repetido com MK-801, um antagonista dos receptores NMDA, e que isso envolva uma interação entre neurônios e células da glia.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Avaliar se o CBD é capaz de atenuar alterações comportamentais e moleculares induzidas pelo tratamento repetido com o antagonista dos receptores NMDA MK-801, um modelo animal de esquizofrenia baseado na hipofunção dos receptores NMDA.

3.2. Objetivos específicos

O presente estudo teve como objetivos específicos:

- Avaliar se a administração repetida de CBD modifica os efeitos do tratamento repetido com MK-801 sobre os comportamentos avaliados nos testes de PPI, interação social e reconhecimento de objeto.
- Como os resultados dos testes comportamentais citados anteriormente podem ser influenciados por alterações em comportamentos relacionados a ansiedade e na atividade locomotora e o CBD e o MK-801 podem interferir nesses comportamentos (Dunn *et al.*, 1989; Guimaraes *et al.*, 1990), nós avaliamos se o tratamento repetido com essas drogas alteram os comportamentos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo animal preditivo para drogas com propriedades ansiolíticas e ansiogênicas (Carobrez e Bertoglio, 2005), e a distância total percorrida no teste do campo aberto.
- Investigar alterações na expressão das proteínas FosB/ Δ FosB e parvalbumina e na expressão do RNAm para o gene da subunidade GluN1 do receptor NMDA em estruturas cerebrais relacionadas com a fisiopatologia da

esquizofrenia como CPFm, estriado, NAc e hipocampo, induzidas pelo tratamento repetido com MK-801 na presença e na ausência do tratamento com CBD.

- Avaliar se o tratamento repetido com MK-801 induziria alterações na expressão de marcadores neuronais (NeuN) e gliais (GFAP - astrócito e Iba-1 - microglia) por imunoistoquímica. E, se os possíveis efeitos tipo-antipsicóticos induzidos pelo tratamento com CBD envolveriam alterações na expressão desses marcadores.

- Comparar os efeitos do CBD com aqueles induzidos pelo tratamento com o antipsicótico atípico clozapina.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6J machos, com 6 semanas de idade no início do tratamento, provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo (USP) em Ribeirão Preto, e mantidos, no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP), em grupos de até 5 animais por caixa (41 x 33 x 17 cm), sob ciclo de luz (12 h claro/ 12 h escuro; período claro começando as 6:00 h), temperatura (23 ± 1 °C) e umidade controladas e livre acesso à água e à comida, exceto durante a realização dos testes comportamentais. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as orientações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento para o cuidado e uso de animais de laboratório. As condições de acondicionamento e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da instituição (número do processo: 165/2010; Anexo I).

4.2. Drogas

O canabidiol (15, 30 e 60 mg/kg, THC Pharm, Alemanha) foi dissolvido em Tween 80 2% em salina. Já a clozapina (1 mg/kg, Tocris, EUA) foi dissolvida em salina suplementada com 30 µL de ácido clorídrico 0,1 M; o pH da solução foi ajustado a valor próximo a neutralidade quando necessário. O MK-801 (0,1, 0,5 e 1 mg/kg, Sigma, EUA) foi dissolvido em salina. As drogas foram administradas por via intraperitoneal (ip.) com volume de 10 mL/kg. As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e as doses foram baseadas em trabalhos anteriores (Long *et al.*, 2006; Casarotto *et al.*, 2010; Elhardt *et al.*, 2010).

4.3. Testes comportamentais

4.3.1. Teste de inibição pelo pré-pulso (PPI)

O teste de PPI é um paradigma comportamental utilizado para avaliar mecanismos e/ou alterações no filtro sensorio-motor. No teste de PPI, estímulos de baixas intensidades (pré-pulso), que não desencadeiam uma resposta de sobressalto, apresentados em intervalos curtos antes de um estímulo acústico de maior intensidade e que desencadeia resposta de sobressalto (pulso), atenuam a resposta induzida por este último estímulo (Braff e Geyer, 1990; Geyer *et al.*, 2001). Foi originalmente proposto por Graham (1975) que o pré-pulso ativaria redes neurais envolvidas no processamento sensorial e resultando na inibição da resposta motora (sobressalto) induzida pelo estímulo subsequente. Um prejuízo no teste do PPI é frequentemente observado em pacientes com esquizofrenia (Braff *et al.*, 2001a), bem como em outros transtornos psiquiátricos como, por exemplo, transtorno obsessivo compulsivo, doença de Huntington, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade e síndrome de Tourette (Braff *et al.*, 2001b). Condição semelhante pode ser induzida farmacologicamente por antagonistas dos receptores NMDA em humanos e roedores e este efeito pode ser revertido por drogas antipsicóticas (Geyer *et al.*, 2001). Assim, mesmo induzido experimentalmente, o déficit no teste de PPI per se não constitui um modelo animal de esquizofrenia, mas é um teste válido para investigar alterações no filtro sensorio-motor semelhante às observadas em pacientes com esquizofrenia, com validade farmacológica, de face e de constructo (Swerdlow *et al.*, 2000; Geyer *et al.*, 2001).

O teste de PPI foi realizado de acordo com protocolo previamente descrito pelo laboratório da Prof.^a Dr.^a Elaine Del Bel, do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Patologia Básica da FORP-USP, onde os experimentos foram

realizados (Issy *et al.*, 2009). Brevemente, o teste de PPI foi realizado simultaneamente em dois sistemas idênticos capazes de avaliar a resposta de sobressalto que consistem em gaiolas de barras de aço inoxidável com dimensões internas de 25 x 9 x 9 cm (na qual o animal permanece durante o teste) suspensas em uma armação de PVC (ENV-262A, Med Associates, EUA) que fica fixada a uma plataforma de metal. Cada uma dessas gaiolas fica dentro de uma caixa maior (64 x 60 x 40 cm) fabricada em madeira e com atenuação acústica (ENV-018S, Med Associates, EUA). A resposta de sobressalto do animal gera uma pressão na plataforma que é captada por sensores e amplificada (PHM 250-60, Med Associates, EUA) gerando um sinal analógico que é digitalizado e analisado por um software (Startle Reflex 4.10, Med Associates, EUA) que representará os sinais dessa resposta numericamente por unidades digitais arbitrárias. A apresentação dos estímulos, duração, intensidade e amplitude também são computadorizadas através de uma interface (Med Associates, EUA).

Antes do início de cada sessão experimental foi realizada a calibração da intensidade de som e da plataforma para garantir igual sensibilidade, durante todo o experimento, nas duas caixas de avaliação da resposta de sobressalto acústico. A calibração da plataforma determina o aumento da sua sensibilidade e foi realizada por meio do ajuste do ganho utilizando um peso padrão apropriado para camundongo (40 g). Quando não há peso sobre a plataforma o sinal permanece próximo de zero. Após a colocação do peso sobre a plataforma é exibido um sinal equivalente a 50 unidades arbitrárias. A calibração consiste no aumento desse sinal junto ao amplificador para 150 unidades arbitrárias.

O teste de PPI foi realizado em 3 etapas consecutivas. A primeira consistiu em um período de aclimação (5 min) durante o qual nenhum estímulo foi

apresentado e consistiu na manutenção do animal na gaiola de aço onde o teste é realizado, com ruído de fundo (*background*) pré-estabelecido de 65 ± 1 dB. Na segunda etapa, chamada de habituação, somente o estímulo que desencadeia o sobressalto (pulso) foi apresentado, nesta etapa foi determinada a linha de base, por meio de 10 apresentações do pulso com intervalo entre os estímulos de 30 s. O objetivo desta etapa é a estabilização da resposta de sobressalto ao pulso e não foi considerada para análise estatística da porcentagem de inibição pelo pré-pulso. A resposta do sobressalto foi medida durante os primeiros 200 ms após a apresentação do estímulo de sobressalto. A etapa que propriamente avalia a inibição da resposta de sobressalto ao pulso (PPI) foi composta por 64 apresentações aleatórias dos diferentes estímulos: (I) pulso (ruído branco) de 105 dB com 20 ms de duração, (II) pré-pulso (tom puro, frequência de 7 KHz) de 80, 85 e 90 dB com 10 ms de duração, (III) pré-pulso seguido de pulso com 100 ms de intervalo entre eles e (IV) nulo (sem nenhum estímulo). Durante essa sessão os estímulos foram apresentados em intervalos regulares de 30 s, sendo 8 apresentações de cada estímulo. A porcentagem de PPI foi expressa como a porcentagem de inibição da amplitude do sobressalto em resposta as múltiplas apresentações do pulso precedidas pelo pré-pulso (PP), em função da amplitude da resposta apenas ao pulso (P), o que foi obtido utilizando a seguinte fórmula: $\%PPI = 100 - [100 \times (PP + P/P)]$. Nesta fórmula, 0% representa nenhuma diferença entre a amplitude de sobressalto desencadeada somente pelo pulso ou pelo pulso precedido do pré-pulso e conseqüentemente nenhuma inibição pré-pulso. Essa transformação é realizada com o objetivo de diminuir a variabilidade estatística atribuída às diferenças entre animais e representa uma medida direta da inibição pré-pulso.

4.3.2. Interação social

O teste de interação social, um modelo utilizado para o estudo dos sintomas negativos da esquizofrenia (Ellenbroek e Cools, 2000), foi realizado em uma caixa retangular de acrílico (28 x 17 x 13 cm), onde os animais (testado e não familiar) foram colocados em lados opostos para explorar a caixa livremente durante 10 min. O tempo total de comportamentos sociais ativos executados pelo camundongo "teste" como cheirar, seguir, fazer *grooming* e subir sobre o camundongo não familiar foram registrados. Os animais testados não haviam sido previamente expostos à caixa do teste e ao animal não familiar.

4.3.3. Teste de reconhecimento de objeto

Roedores têm tendência a interagir mais com um objeto novo do que com um objeto familiar (Bevins e Besheer, 2006). Esta tendência tem sido usada para o estudo de funções cognitivas, como memória e aprendizagem, que estão diminuídas em animais tratados com antagonistas de receptores NMDA e em pacientes com esquizofrenia (Wong *et al.*, 1997; Hashimoto *et al.*, 2005). Um modelo animal utilizado para avaliar esses prejuízos é o teste de reconhecimento de objeto.

O teste de reconhecimento de objeto foi realizado em uma arena circular de acrílico (40 cm de diâmetro e altura de 40 cm). Um dia antes do experimento, cada animal foi submetido a uma sessão de habituação a arena com duração de 15 min. No dia do experimento, os animais foram submetidos individualmente a duas sessões. Durante a primeira sessão (sessão de aquisição, T1), os animais foram colocados na arena contendo dois objetos idênticos por um período de 10 min. Para a segunda avaliação (sessão de retenção, T2), que foi realizada 60 min após T1, no qual os objetos presentes em T1 foram trocados por outro objeto idêntico (objeto

conhecido, OC) e por um objeto novo (ON) colocados na mesma posição do T1. Os animais foram colocados na arena por 5 min e o tempo total de exploração de cada objeto foi determinado. A exploração dos objetos foi definida como o animal direcionando sua face ao objeto até uma distância aproximada de 2 cm enquanto observa, cheira ou toca-o. Os objetos tinham aproximadamente 15 cm de altura, peso suficiente para evitar serem deslocados pelos animais e os OC e o ON eram diferentes em forma, cor e textura. A memória de reconhecimento foi avaliada usando o índice de reconhecimento através da fórmula: $\text{índice de reconhecimento} = (\text{ON} - \text{OC} / \text{ON} + \text{OC})$, correspondendo à diferença entre o tempo de exploração do ON e OC em relação ao tempo de exploração total dos dois objetos (Bevins e Besheer, 2006).

4.3.4. Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE foi realizado para avaliar um possível efeito dos tratamentos sobre comportamentos relacionados à ansiedade, uma vez que as drogas utilizadas podem interferir nesses comportamentos (Dunn *et al.*, 1989; Guimaraes *et al.*, 1990; Manzaneque *et al.*, 2002). O LCE utilizado é um aparato de madeira, elevado 50 cm do solo e formado por dois braços abertos (34 x 6,5 cm) que formam uma cruz com dois braços fechados (34 x 6,5 x 15 cm). O animal foi colocado por 5 min no LCE, com a face voltada para um dos braços fechados. Para análise comportamental, a sessão foi registrada e analisada com o auxílio do Software AnyMaze (Stoelting, Irlanda). Foram analisados os seguintes parâmetros: o número de entradas nos braços fechados e a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos do LCE.

4.3.5. Avaliação da atividade locomotora em campo aberto

Para verificar um possível efeito dos tratamentos sobre a atividade locomotora os animais foram submetidos ao teste do campo aberto. O campo aberto consistiu em uma arena circular de acrílico (40 cm de diâmetro). No momento do teste, os animais foram colocados, individualmente, no centro da arena e a distância total percorrida foi determinada durante 5 min utilizando o software AnyMaze (Stoelting, Irlanda).

4.4. Imunoistoquímica para detecção das proteínas FosB/ Δ FosB e parvalbumina

As proteínas FosB/ Δ FosB são consideradas como marcadores de ativação neuronal que se acumulam no cérebro, de maneira estrutura-específica, em resposta a vários tipos de estímulos crônicos, como a administração repetida de drogas, refletindo alterações moleculares de longo-prazo (Nestler *et al.*, 1999; Mcclung *et al.*, 2004; Staples *et al.*, 2009). Já a parvalbumina, uma proteína que se liga ao íon cálcio, é utilizada com um marcador de uma subclasse de interneurônios GABAérgicos conhecidos com interneurônios parvalbumina-positivos e que tem sua expressão alterada no cérebro de pacientes com esquizofrenia (Beasley e Reynolds, 1997). Acredita-se que essas alterações sejam consequência de uma hipofunção mediada pelos receptores NMDA (Moreau e Kullmann, 2013).

Imediatamente após o término da exposição ao teste de PPI, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uretana (25%, 5 mL/kg) e perfundidos transcardiacamente com solução fosfato-salina (PBS) 0,01 M e paraformaldeído (PFA) 4% tamponado em PBS 0,1 M, pH 7,4. Os cérebros foram removidos e posteriormente fixados durante 2 h em solução de PFA 4% tamponado em PBS 0,1 M e crioprotetidos em solução de sacarose 30% tamponada em PBS

0,1 M onde permaneceram a 4 °C por 24 h ou até demonstrarem saturação. Após isso, o congelamento do tecido foi realizado com isopentano (Vetec, Brasil), mantido em gelo seco, à -40 °C. Os encéfalos foram armazenados em *freezer* a temperatura de -80 °C até o processamento dos mesmos. Posteriormente, cortes coronais adjacentes foram obtidos das regiões de interesse com 25 µm de espessura em criostato (CM-1900, Leica, Alemanha) com temperatura de -20 °C. Os encéfalos foram processados com o objetivo de se obterem cortes representativos contendo as seguintes regiões: CPFm, estriado, núcleo *accumbens* e hipocampo dorsal.

Para a técnica de imunoistoquímica, as secções foram inicialmente lavadas (3 x 5 min) em PBS 0,1 M + Triton-X 0,15% (pH 7,4; tampão de lavagem) e então pré-incubadas com H₂O₂ 1% em PBS 0,1 M por 30 min, para redução da atividade da peroxidase endógena. Após 4 lavagens de 5 min cada, as secções foram incubadas com soro albumina bovina (BSA) 1% em tampão de lavagem, durante 20 min, para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-FosB/ΔFosB (1:1000, H-75, sc-7203, Santa Cruz Biotechnology, EUA) ou anticorpo primário policlonal de camundongo anti-parvalbumina (1:1000, P227, Sigma-RBI, EUA). Após 30 h de incubação, as secções foram novamente lavadas (3 x 10 min) antes de serem incubadas com o anticorpo secundário biotilado (1:400) *goat anti-rabbit* (para FosB/ΔFosB) ou *horse anti-mouse* (para parvalbumina) por 1 h. Os anticorpos foram diluídos em tampão de lavagem + BSA, e todas as incubações realizadas a 21 °C com agitação constante. Uma vez removido o anticorpo secundário, através de sucessivas lavagens (3 x 5 min), as secções foram incubadas com o complexo ABC avidina-biotina-peroxidase (1:300, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, EUA), por 1 h. Na imunoistoquímica para parvalbumina, a atividade da

peroxidase foi revelada usando o tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich, EUA) contendo H_2O_2 0,02%, já para FosB/ Δ FosB foi usado solução contendo DAB, sulfato de amônio e níquel 1% e H_2O_2 0,02%. Finalmente, após adequadamente lavadas, as secções foram colocadas em lâminas gelatinizadas, as quais foram desidratadas através de uma série de alcoóis (70%, 80%, 95% e 100%, 5 min cada), clareadas em xilol (2 x 10 min) e cobertas com Permount e lamínulas.

As lâminas foram observadas em microscópio de luz Olympus BX50 (Olympus, Japão) com uma câmera acoplada Olympus DP72 (Olympus, Japão), através da qual as imagens foram capturadas e processadas usando o software Image Pro-Plus 6.0 (Mediacybernetics, EUA).

4.5. Imunoistoquímica para detecção das proteínas NeuN, GFAP e Iba-1

Imediatamente após o término do teste de reconhecimento de objeto, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uretana (25%, 5 mL/kg) e perfundidos transcardiacamente com PBS 0,01M e PFA 4% tamponado em PBS 0,1 M, pH 7,4. Os cérebros foram removidos e fixados durante 2 h em solução de PFA 4% tamponado em PBS 0,1 M. Posteriormente, os cérebros foram lavados 3 vezes (30 min cada) em PBS 0,1 M e, finalmente, mantidos em PBS 0,01 M com 0,02% de azida sódica para serem transportadas, a 4 °C, para a Universidade Complutense de Madrid, Espanha, onde foram realizadas as análises imunoistoquímicas.

Na Universidade Complutense de Madrid, os cérebros foram crioprottegidos em solução de sacarose 11% tamponada em PBS 0,1 M onde permaneceram a 4 °C por 24 h. Posteriormente, as amostras foram transferidas para uma solução de sacarose 33% em PBS 0,1 M e mantidas a 4 °C por 24 h ou até demonstrarem saturação. Após isso, os cérebros foram embebidos em *Tissue*

Freezing Medium (Tissue-Tek® O.C.T, Sakura Finetek, EUA) e armazenados a -30 °C até processamento. Posteriormente, cortes adjacentes foram obtidos das regiões de interesse com 25 µm de espessura em criostato (CM3050; Leica, Alemanha) com temperatura de -22 °C. Os encéfalos foram processados com o objetivo de se obterem cortes representativos, contendo as seguintes regiões: CPFm, estriado, núcleo *accumbens* e hipocampo dorsal. Os tecidos foram coletados em lâminas gelatinizadas, sendo estas armazenadas a -30 °C.

Para os ensaios de imunoistoquímica, as lâminas com os tecidos foram secas a temperatura ambiente por 1 h e, posteriormente, lavadas com PBS 0,1 M contendo 0,3% de Triton X-100 e BSA 0,5% (tampão de lavagem) por 10 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas com H₂O₂ 2% em tampão de lavagem durante 10 min, para redução da atividade da peroxidase endógena. As lâminas foram novamente lavadas com tampão de lavagem (3 x 10 min) e, posteriormente, incubadas *overnight* a 4 °C com anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-NeuN (anti-*neuronal nuclei*; 1:50, A60, Millipore, EUA), anticorpo primário policlonal de coelho anti-Iba-1 (anti-*ionized calcium binding adaptor molecule 1*; 1:1000, 019-19741, Wako, Japão) ou anticorpo primário policlonal de coelho anti-GFAP (anti-*glial fibrillary acidic protein*; 1:2000, Z0334, Dako, Dinamarca). Posteriormente, as secções foram novamente lavadas (3 x 10 min) antes de serem incubadas com o anticorpo secundário biotilado (1:300; NeuN: *rabbit anti-mouse IgG*, Millipore, EUA; para GFAP e Iba-1: *goat anti-rabbit IgG*, ThermoFisher Scientific, EUA) por 2 h. Os anticorpos foram diluídos em tampão de lavagem. Uma vez removido o anticorpo secundário, através de sucessivas lavagens (3 x 10 min), as secções foram incubadas com o complexo ABC avidina-biotina-peroxidase (1:300, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Reino Unido), por 1,5 h. A atividade da peroxidase foi

revelada usando DAB (Sigma-Aldrich, Espanha) contendo H_2O_2 0,01%. Finalmente, após adequadamente lavadas, as lâminas foram desidratadas através de uma série de alcoóis (70%, 80%, 90% e 100%, 2 min cada), clareadas no xilol (5 min) e cobertas com DEPEX (Serva, Alemanha) e lamínulas. Para checar a especificidade da imunorreação, nós incluímos preparações controle (omitindo o anticorpo primário) em cada ensaio. Para avaliação da expressão de GFAP e Iba-1 no hipocampo, antes da desidratação as lâminas foram coradas com cresil violeta (0,005%) com o objetivo de destacar a camada celular do giro denteado (GD) e a camada de células piramidais do CA1 e CA3 para que as mesmas servissem como referências anatômicas. Para avaliação do CPFm, estriado dorsal e NAc, as lâminas não foram coradas com cresil violeta. Essas regiões foram identificadas usando o córtex motor e corpo caloso (CPFm e estriado dorsal), e a comissura anterior (NAc) como referências anatômicas.

As lâminas foram observadas em microscópio Zeiss Axioplan (Zeiss, Alemanha) com uma câmera acoplada (Zeiss Axioplan; Zeiss, Alemanha), através da qual as imagens foram capturadas e processadas usando o software Axiovision 40V 4.1 (Carl Zeiss Vision, Zeiss, Alemanha).

4.6. Avaliação quantitativa das células FosB/ Δ FosB, parvalbumina, NeuN, GFAP e Iba-1-positivas

A captura das fotos para a quantificação das células FosB/ Δ FosB, NeuN, GFAP e Iba-1-positivas foi realizada com objetiva de 20X, já para as células parvalbumina-positivas foi utilizada uma objetiva de 10X. Quatro secções de tecido foram analisadas por área de interesse e animal. Três observadores que desconheciam o tratamento recebido pelos animais realizaram as análises. Como

todas as estruturas estudadas são bilaterais, o valor médio foi calculado e utilizado nas análises. As áreas cerebrais de interesse foram identificadas com o auxílio do Atlas *The Mouse Brain* (Paxinos e Franklin, 2008). As seguintes estruturas cerebrais foram avaliadas: porções pré-límbica (PL) e infra-límbica (IL) do CPFm (exceto para parvalbumina, na qual a quantificação não foi avaliada separadamente nessas porções corticais), estriado dorsal, NAc *core* e *shell* e o hipocampo dorsal (GD, CA1 e CA3). A localização anteroposterior (AP) em relação ao bregma foi: CPFm (AP: 1,98 - 1,70 mm); estriado dorsal e NAc *core* e *shell* (AP: 1,54 - 0,98 mm); hipocampo dorsal (AP: -1,82 - -2,30 mm). Abaixo seguem informações específicas para avaliação de cada imunistoquímica separadamente.

FosB/ΔFosB: Foram consideradas células positivas para FosB/ΔFosB aquelas que apresentaram impregnações roxas em seus núcleos. Em cada estrutura, os núcleos de células imunorreativas foram contados usando o software Image J (Research Services Branch, NIH, EUA), o qual considerou positivos objetos escuros com uma área entre 10 e 80 μm^2 . Todas as células imunorreativas na área analisada para cada região de interesse foram registradas. Os tamanhos das áreas analisadas foram de 0,136 mm^2 para o CPFm (0,068 mm^2 para a porção PL e 0,068 mm^2 para a porção IL), 0,076 mm^2 para o estriado dorsal e NAc *core* e *shell*. Já para o hipocampo as áreas analisadas compreenderam a camada celular do giro denteado (aproximadamente 0,062 mm^2) e a camada de células piramidais de CA1 (aproximadamente 0,020 mm^2) e CA3 (aproximadamente 0,024 mm^2). Os resultados foram expressos como o número de células FosB/ΔFosB-positivas/0,1 mm^2 .

Parvalbumina: Foram considerados neurônios positivos para parvalbumina aqueles que apresentaram impregnações marrons no núcleo e citoplasma das células. Em cada área, as células imunorreativas foram contadas

usando o software Image J. Todas as células imunorreativas na área analisada para cada região de interesse foram registradas. Os tamanhos das áreas analisadas foram de 0,27 mm² para o CPFm, 0,30 mm² para o estriado dorsal e NAc *core* e *shell*. Já para o hipocampo as áreas analisadas compreenderam a camada celular do giro denteado (aproximadamente 0,062 mm²) e a camada de células piramidais de CA1 (aproximadamente 0,020 mm²) e CA3 (aproximadamente 0,024 mm²). Os resultados foram expressos como o número de células parvalbumina-positivas/0,1 mm².

NeuN: Em cada zona, os núcleos de células imunorreativas foram contados usando o software Image J. Todas as células imunorreativas na área analisada para cada região de interesse foram registradas. Os tamanhos das áreas analisadas foram de 0,290 mm² para o CPFm (0,145 mm² para a porção PL e 0,145 mm² para a porção IL) e 0,145 mm² para estriado dorsal e NAc *core* e *shell*. Os resultados foram expressos como o número de células NeuN-positivas/0,1 mm². Entretanto, para as regiões do hipocampo (porções *upper*, *inner* e *outer blade* do giro denteado, CA1 e CA3), devido à sobreposição de células imunorreativas nessas regiões, a análise foi realizada pelo método de densitometria óptica. Os valores foram expressos como a porcentagem de densidade óptica em relação ao grupo controle.

GFAP: Em cada zona, as células imunorreativas foram contadas usando o software Image J. Os tamanhos das áreas analisadas foram de 0,290 mm² para o CPFm (0,145 mm² para a porção PL e 0,145 mm² para a porção IL) e 0,145 mm², estriado dorsal, NAc *core* e *shell*; de 0,072 mm² para o giro denteado do hipocampo (hilus); de 0,055 mm² para CA1 (*stratum radiatum*) e 0,071 mm² para CA3 (*stratum*

radiatum). Os resultados foram expressos como o número de células GFAP-positivas/0,1 mm².

Iba-1: Foi realizada a contagem do número de células Iba-1-positivas e posterior classificação das células em diferentes tipos de acordo com aspectos morfológicos relacionados ao padrão de ativação dessas células usando o software Image J. Todas as células imunorreativas na área analisada para cada região de interesse foram registradas. Os tamanhos das áreas analisadas foram de 0,092 mm² para o CPFm (0,046 mm² para a porção PL e 0,046 mm² para a porção IL) e 0,046 mm² para o estriado dorsal, NAc *core* e *shell*; de 0,072 mm² para o giro denteado do hipocampo (hilus); de 0,055 mm² para CA1 (*stratum radiatum*) e 0,071 mm² para CA3 (*stratum radiatum*). Os resultados foram expressos como o número de células Iba-1-positivas/0,1 mm². Em relação aos diferentes tipos morfológicos das células Iba-1-positivas, as mesmas foram classificadas em 5 tipos morfológicos (Diz-Chaves *et al.*, 2012; Lopez-Rodriguez *et al.*, 2015): Tipo I: células com poucos processos celulares (3 ou menos) e com corpo celular muito pequeno; Tipo II: células apresentando 3-5 prolongamentos; Tipo III: células com prolongamentos numerosos (≥ 5) e mais longos e com pequeno corpo celular (quando comparado aos Tipos IV e V); Tipo IV: células com corpo celular largo e prolongamentos retraídos; e Tipo V: células com corpo celular ameboide, prolongamentos curtos e intensa imunorreatividade. De uma forma geral os Tipos I e II são considerados como microglia em repouso e os Tipos III, IV e V, como microglia reativa (Diz-Chaves *et al.*, 2012; Lopez-Rodriguez *et al.*, 2015; Figura 1).

Figura 1. Células microgliais imunorreativas para Iba-1 e classificadas de acordo com seus aspectos morfológicos. Os Tipos I e II são classificados como microglia em repouso e os Tipos III, IV e V como microglia reativa. Imagens obtidas com objetiva de 40X, barra de escala = 25 μ m.

4.7. Medida da expressão do RNAm para a subunidade obrigatória do receptor NMDA GluN1 por RT-PCR em tempo real

Imediatamente após o teste de PPI, o animais foram anestesiados com uretana 25% (5 mL/kg, ip) e decapitados. O córtex frontal, o estriado e o hipocampo foram isolados. O material obtido foi armazenado a -80 °C. Posteriormente, o material foi homogeneizado em reagente TRizol (Invitrogen, EUA) para separação do RNA de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 750 μ L de TRizol foram adicionados às amostras, agitados durante 30 s e incubados em gelo seco durante 5 min. Para cada mL de suspensão, 200 μ L de clorofórmio (Sigma-Aldrich, EUA) e 10 μ L de glicogênio (20 mg/mL, glicogênio de ostra; USB, EUA) foram adicionados, agitados e incubados em temperatura ambiente durante 5 min e, então, centrifugados (14.000 rpm, 25 min, 4 °C). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 500 μ L de isopropanol foram adicionados. As amostras foram incubadas *overnight* e a -80

°C e, então, centrifugadas (14000 rpm, 15 min, 4 °C). O *pellet* foi suspenso em etanol 70% v/v e centrifugou-se novamente e deixou-se secar à temperatura ambiente. O RNA foi suspenso em 15 µL de água ultra-pura e mantidos a -80 ° C. A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria ultravioleta. O RNA extraído foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para síntese do cDNA utilizando 1 µg do RNA total e um kit de cDNA de alta resolução (Applied Biosystem, EUA). Os níveis relativos da expressão do RNAm para o gene da subunidade GluN1 do receptor NMDA, anteriormente conhecida como NR1, foram avaliados em aparelho *StepOne real-time PCR*[®] usando o kit *Applied Biosystems real-time master mix*[®] com sondas para avaliação de expressão Taqman[®] (Grin1: ID Mm01212171_s1). O RNA total foi normalizado baseado nos valores de Ct para a expressão do normalizador de reação, a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (ID Mm99999915_g1). Todas as reações foram realizadas em duplicata. Para cada amostra, o ciclo de quantificação (Qc) de RNAm foi medido e normalizado em relação a média do gene de referência GAPDH ($\Delta Ct = Ct \text{ do gene avaliado} - Ct \text{ do gene de referência}$). Assim, as alterações na expressão do RNAm para os genes avaliados foram calculadas usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os dados foram apresentados como a porcentagem relativa da expressão de RNAm em relação ao grupo controle.

4.8. Procedimentos experimentais

4.8.1. Experimento 1: Efeito do tratamento repetido com MK-801 no teste de PPI

Os animais receberam administração intraperitoneal (ip) de salina ou MK-801 (0,1, 0,5 e 1 mg/kg) diariamente durante 14, 21 ou 28 dias. Um dia após o fim do tratamento os animais foram submetidos ao teste de PPI.

4.8.2. Experimento 2: Efeito do tratamento repetido com CBD ou clozapina sobre o prejuízo no teste de PPI induzido pelo tratamento com MK-801

Baseado nos resultados do experimento 1, os animais receberam administração ip. de salina ou MK-801 (1 mg/kg) diariamente durante 28 dias e, no sexto dia após o início do tratamento com MK-801 ou salina, grupos independentes de animais receberam injeção ip. de CBD (15, 30 e 60 mg/kg), clozapina (1 mg/kg) ou veículo diariamente, 30 min antes da administração de MK-801 ou salina, até o final do tratamento com MK-801, resultando nos seguintes grupos experimentais: veículo+salina, clozapina+veículo, CBD 60+veículo, veículo+MK-801, clozapina+MK-801, CBD 15+MK-801; CBD 30+MK-801, CBD 60+MK-801. Um dia após o fim do tratamento, os animais foram submetidos ao teste de PPI, sendo sacrificados imediatamente após o PPI para retirada e processamento do encéfalo para avaliação das possíveis alterações na expressão das proteínas FosB/ Δ FosB e parvalbumina (imunoistoquímica) e do RNAm para o gene da subunidade GluN1 do receptor NMDA (RT-PCR em tempo real). Os tratamentos foram realizados no período da manhã (com início as 08:30h). Adicionalmente, nós avaliamos o peso corporal dos animais durante todo o período de tratamento.

A Figura 2 mostra a representação esquemática do procedimento experimental. O regime de tratamento foi baseado nos resultados do experimento 1 e em trabalhos prévios da literatura investigando os efeitos do tratamento com canabinóides (SR141716, um antagonista dos receptores CB1, e o Δ^9 -THC) em um modelo animal de esquizofrenia baseado no tratamento repetido e intermitente com fenciclidina (Vigano *et al.*, 2009; Guidali *et al.*, 2011). Nesses dois estudos o tratamento com canabinóides começou após 5 injeções (1/dia) de fenciclidina.

Figura 2. Representação esquemática do procedimento experimental (experimento 2) mostrando o período de tratamento e o dia no qual foram realizados o teste de PPI e a coleta de material para os experimentos de imunistoquímica para as proteínas FosB/ Δ FosB e parvalbumina e para a avaliação da expressão do RNAm para a subunidade GluN1 do receptor NMDA por RT-PCR. CBD, canabidiol; CLO, clozapina; VEI, veículo; SAL, salina; PPI, teste de inibição pelo pré-pulso.

4.8.3. Experimento 3: Efeito de uma única administração de CBD ou clozapina no último dia de tratamento repetido com MK-801 sobre o prejuízo no teste de PPI

Baseado nos resultados do experimento 2, nós avaliamos os efeitos no PPI de uma única administração de CBD (30 e 60 mg/kg) e clozapina (1 mg/kg) no último dia de tratamento repetido (28 dias) com MK-801, para indicar a necessidade do tratamento repetido com CBD e clozapina e avaliar a possibilidade dos efeitos observados no experimento 2 serem induzidos pela última administração dessas drogas. Assim, os animais receberam administração ip. de salina ou MK-801 (1 mg/kg) diariamente durante 28 dias e, no último dia de tratamento com MK-801 (vigésimo oitavo dia), grupos independentes de animais receberam uma única administração ip. de CBD (30 e 60 mg/kg), clozapina (1 mg/kg) ou veículo, 30 min

antes da administração de MK-801 ou salina. Um dia após o fim do tratamento, ou seja, no vigésimo nono dia, os animais foram submetidos ao teste de PPI (Figura 3).

Figura 3. Representação esquemática do procedimento experimental (experimento 3) mostrando o período de tratamento com MK-801, a indicação de uma única administração de CBD ou clozapina no último dia de tratamento com o MK-801 e o dia no qual foi realizado o teste de PPI. CBD, canabidiol; CLO, clozapina; VEI, veículo; SAL, salina; PPI, teste de inibição pelo pré-pulso.

4.8.4. Experimento 4: Efeito do tratamento repetido com CBD ou clozapina sobre as alterações nos testes de interação social e reconhecimento de objeto induzidas pelo tratamento com MK-801

Os animais receberam administração ip. de salina ou MK-801 (1 mg/kg) diariamente durante 28 dias. No sexto dia após o início do tratamento com MK-801 ou salina, grupos independentes de animais receberam injeção ip. de CBD (30 e 60 mg/kg), clozapina (1 mg/kg) ou veículo diariamente, 30 min antes da administração de MK-801 ou salina, até o final do tratamento com MK-801, resultando nos seguintes grupos experimentais: veículo+salina, clozapina+salina, CBD 60+salina, veículo+MK-801, clozapina+MK-801, CBD 30+MK-801 e CBD 60+MK-801. Um dia

após o fim do tratamento, ou seja, no vigésimo nono dia, os animais foram submetidos ao teste de interação social. Quatro horas depois, os animais foram submetidos ao procedimento de habituação do teste de reconhecimento de objeto. Sendo as sessões T1 e T2 do teste de reconhecimento de objeto realizadas 24 h depois (Figura 4). Os animais foram sacrificados imediatamente após o teste de reconhecimento de objeto para retirada e processamento do encéfalo para os ensaios de imunistoquímica para avaliação da expressão de NeuN, GFAP e Iba-1.

Figura 4. Representação esquemática do procedimento experimental (experimento 4) mostrando o período de tratamento e os dias nos quais foram realizados os testes de interação social (IS) e reconhecimento de objeto (RO) e a posterior retirada do encéfalo para os ensaios de imunistoquímica para NeuN, GFAP e Iba-1. CBD, canabidiol; CLO, clozapina; VEI, veículo; SAL, salina.

4.8.5. Experimento 5: Avaliação do tratamento repetido com CBD, clozapina e MK-801 nos comportamentos avaliados no LCE e no teste do campo aberto

Os animais receberam administração ip. de salina ou MK-801 (1 mg/kg) diariamente durante 28 dias. No sexto dia após o início do tratamento com MK-801 ou salina, grupos independentes de animais receberam injeção ip. de CBD (60

mg/kg), clozapina (1 mg/kg) ou veículo diariamente, 30 min antes da administração de MK-801 ou salina, até o final do tratamento com MK-801, resultando nos seguintes grupos experimentais: veículo+salina, clozapina+salina, CBD 60+salina, veículo+MK-801, clozapina+MK-801 e CBD 60+MK-801. Os animais foram submetidos ao LCE e ao teste do campo aberto 24 e 48 h após o fim dos tratamentos, respectivamente (Figura 5).

Figura 5. Representação esquemática do procedimento experimental (experimento 5) mostrando o período de tratamento e os dias nos quais foram realizados o LCE e o teste do campo aberto. CBD, canabidiol; CLO, clozapina; LCE, labirinto em cruz elevado; VEI, veículo; SAL, salina.

4.8.6. Experimento 6: Alterações induzidas pelos tratamentos com MK-801, CBD e clozapina na expressão de FosB/ Δ FosB, parvalbumina, NeuN, GFAP e Iba-1 avaliadas por imunoistoquímica

Um grupo de animais submetidos ao teste de PPI, no experimento 2, foi utilizado para avaliação das possíveis alterações no padrão de ativação neuronal indicado pelas proteínas FosB/ Δ FosB e na expressão de parvalbumina induzidas pelos tratamentos. Assim, um dia após o fim do tratamento, ou seja, no vigésimo

nono dia, os animais foram submetidos ao teste de PPI, sendo sacrificados imediatamente após o teste para retirada e processamento do encéfalo para os ensaios de imunohistoquímica (FosB/ Δ FosB e parvalbumina). Os animais utilizados no experimento 4 (teste de interação social e reconhecimento de objeto) foram sacrificados imediatamente após o teste de reconhecimento de objeto para retirada e processamento do encéfalo para avaliação da expressão de NeuN, GFAP e Iba-1.

Foram avaliados apenas os efeitos do CBD na dose de 60 mg/kg, uma vez que esta dose foi mais efetiva em atenuar as alterações comportamentais induzidas pelo MK-801.

4.8.7. Experimento 7: Efeito dos tratamentos com MK-801, CBD e clozapina na expressão do RNAm para a subunidade GluN1 do receptor NMDA

Um grupo de animais submetidos ao teste de PPI, no experimento 2, foi utilizado para avaliação das possíveis alterações na expressão do RNAm para a subunidade GluN1 do receptor NMDA induzidas pelos tratamentos. Assim, um dia após o fim do tratamento, ou seja, no vigésimo nono dia, os animais foram submetidos ao teste de PPI, sendo sacrificados imediatamente após o teste para retirada e processamento do encéfalo para posterior análise das alterações na expressão do RNAm para o gene da subunidade GluN1 do receptor NMDA por RT-PCR em tempo real. Apenas os efeitos do CBD na dose de 60 mg/kg foram avaliados.

4.9. Análise dos dados e estatística

Os resultados do teste de PPI (% de inibição pelo pré-pulso) foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas tendo

como medida repetida a intensidade de pré-pulso e como fator independente o tratamento. Quando um efeito do tratamento foi observado, nós realizamos ANOVA de uma via para cada intensidade de pré-pulso. A amplitude da resposta de sobressalto ao pulso no teste de PPI também foi analisada através de ANOVA de uma via. Para a análise do peso corporal, foi realizado ANOVA de medidas repetidas com os tratamentos como medida independente e o tempo como medida repetida. No teste de reconhecimento de objeto, os dados das sessões de aquisição (T1) e de retenção (T2) foram analisados por ANOVA de medidas repetidas com o tratamento como o principal fator independente e o objeto (aquisição: objeto conhecido colocado no lado esquerdo da arena vs. objeto conhecido colocado no lado direito da arena; retenção: objeto conhecido vs. objeto novo) como o fator repetido, seguido de teste t de *Student* para cada grupo quando um efeito significativo foi detectado pela ANOVA. O índice de discriminação, bem como o tempo de interação social, foram analisados por ANOVA de uma via. Já a exploração no LCE, a atividade locomotora no campo aberto e os dados de imunoistoquímica foram analisados através de ANOVA de duas vias sendo o tratamento 1 (administração de veículo, clozapina ou CBD) e o tratamento 2 (administração de salina ou MK-801) como principais fatores. Para avaliação dos diferentes morfotipos de microglia, os dados foram avaliados por meio de ANOVA de medidas repetidas, com os tratamentos como medida independente e o morfotipo como medida repetida. No caso de interação entre esses fatores, nós realizamos ANOVA de duas vias, usando o tratamento 1 (administração de veículo, clozapina ou CBD) e o tratamento 2 (administração de salina ou MK-801) como principais fatores. O pós-teste *Student* de Newman-Keuls (S-N-K) foi utilizado para revelar diferenças específicas em todos os testes. Como os resultados sobre a expressão de RNAm não apresentaram

homogeneidade das variâncias, os mesmos foram expressos como a mediana $\pm$ o intervalo interquartil e foram analisados pelo teste de Kuskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Todos os outros resultados foram representados como a média e o erro padrão da média (EPM). O nível de significância assumido foi de $P < 0,05$.

Como não houve diferença entre os animais que receberam Tween 80 2% em salina (veículo para o CBD) + salina e os animais que receberam salina suplementada com 30 μ L de ácido clorídrico 0,1 M (veículo para a clozapina) + salina nos experimentos comportamentais e moleculares (Anexo II), eles foram agrupados em um único grupo controle (veículo+salina). Além disso, nas imunoistoquímicas para FosB/ Δ FosB, NeuN, GFAP e Iba-1, as porções PL e IL do CPFm foram avaliadas. No entanto, como os resultados foram semelhantes (Anexo III), um valor médio entre estas duas regiões foi utilizado para representar as alterações no CPFm.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1: Efeito do tratamento repetido com o antagonista dos receptores NMDA MK-801 por 14, 21 e 28 dias no teste de PPI

A ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito significativo do tratamento apenas após 28 dias de administração repetida do MK-801 no teste de PPI, onde os animais tratados com MK-801, na dose de 1 mg/kg, apresentaram prejuízo no teste de PPI (após 14 dias: $F_{3,25} = 1,5$, $P > 0,05$; após 21 dias: $F_{3,25} = 1,1$, $P > 0,05$ e após 28 dias: $F_{3,25} = 5,4$, $P < 0,05$, S-N-K, $P < 0,05$, Figura 6). Também foi observado um efeito geral da intensidade de pré-pulso após 14, 21 e 28 dias de tratamento com MK-801 (após 14 dias: $F_{2,50} = 40,9$, $P < 0,05$; após 21 dias: $F_{2,50} = 40,4$, $P < 0,05$ e após 28 dias: $F_{2,50} = 40,5$, $P < 0,05$), mas não houve interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento (após 14 dias: $F_{6,50} = 0,6$, $P > 0,05$; após 21 dias: $F_{6,50} = 0,8$, $P > 0,05$ e após 28 dias: $F_{6,50} = 1,6$, $P > 0,05$).

Figure 6 - Efeito do tratamento repetido com MK-801 (0,1, 0,5 ou 1 mg/kg) por 14, 21 e 28 dias no teste de PPI. Os animais foram submetidos ao teste de PPI 24 h após o fim do tratamento. Foi observado um prejuízo no teste de PPI apenas após o tratamento com MK-801, na dose de 1 mg/kg, por 28 dias ($n = 6-8/\text{grupo}$). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. * indica um efeito geral do tratamento, $P < 0,05$ em relação aos demais grupos, ANOVA de medidas repetidas seguida do teste S-N-K.

O tratamento repetido com MK-801 por 14, 21 ou 28 dias não alterou a resposta de sobressalto ao pulso (Tabela 1).

Tabela 1 - Amplitude da resposta de sobressalto ao pulso avaliada no teste de PPI realizado 24 h após o fim do tratamento com MK-801 por 14, 21 ou 28 dias.

MK-801 (mg/kg)	Resposta de Sobressalto (U.A.)		
	Após 14 dias	Após 21 dias	Após 28 dias
0	1250 $\pm$ 125	1215 $\pm$ 85,7	1221 $\pm$ 145
0,1	1538 $\pm$ 103	1195 $\pm$ 146	1483 $\pm$ 129
0,5	1378 $\pm$ 117	1307 $\pm$ 127	1390 $\pm$ 106
1	1316 $\pm$ 129	1289 $\pm$ 140	1325 $\pm$ 70,1
	$F_{3,25} = 1,1$	$F_{3,25} = 0,2$	$F_{3,25} = 0,9$

Os dados foram expressos como a média $\pm$ EPM. $P > 0,05$, ANOVA de uma via; $n = 6-8/\text{grupo}$. U.A.: unidades arbitrárias.

5.2. Experimento 2: Efeito do CBD e da clozapina sobre o prejuízo no PPI induzido pelo tratamento com MK-801 por 28 dias

Em relação ao ganho de peso corporal durante o experimento, ANOVA de duas vias revelou um efeito do tempo ($F_{9,1040} = 14,6$, $P < 0,05$), mas não houve efeito do tratamento sobre ganho de peso entre os grupos ($F_{7,1040} = 1,9$, $P > 0,05$) ou interação tratamento e tempo ($F_{63,1040} = 0,2$, $P > 0,05$), como pode ser observado na Figura 7.

Figura 7 – Efeito da administração repetida de CBD (15, 30 ou 60 mg/kg), clozapina (CLO, 1 mg/kg) ou veículo (VEI) seguido do tratamento com salina (SAL) ou MK-801 (1 mg/kg) sobre o peso corporal durante os 28 dias de tratamento. Os animais apresentaram um aumento normal do peso corporal que foi independente dos tratamentos ($n = 14$ /grupo). Os dados estão representados como a média e o EPM. $P > 0,05$, ANOVA de medidas repetidas.

No teste de PPI, ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito geral da intensidade de pré-pulso ($F_{2,208} = 103,4$, $P < 0,001$) e do tratamento ($F_{7,104} = 4,6$, $P < 0,001$), houve também uma interação entre a intensidade de pré-pulso e o

tratamento ($F_{14,208} = 2,35$, $P = 0,005$). Adicionalmente, por meio de ANOVA de uma via realizada para cada intensidade de pré-pulso, foi observado um efeito do tratamento nas intensidades de pré-pulso de 80 e 85 dB (80 dB: $F_{7,104} = 4,09$, $P = 0,001$; 85 dB: $F_{7,104} = 5,75$, $P < 0,001$, 90 dB: $F_{7,104} = 0,76$; $P > 0,05$). Na intensidade de pré-pulso de 85 dB, os animais tratados com veículo+MK-801 apresentaram prejuízo no PPI comparado ao grupo controle (veículo+salina), um efeito que não foi atenuado pelo tratamento com CBD ou clozapina (Figura 8). Entretanto, com o pré-pulso na intensidade de 80 dB, o prejuízo no PPI induzido pelo MK-801 foi atenuado pela clozapina e CBD (30 mg/kg). Além disso, foi observado que o CBD na dose de 60 mg/kg foi mais efetivo em reverter o prejuízo no PPI induzido pelo MK-801 ($P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+MK-801, S-N-K; Figura 8).

Figure 8 - Efeito do tratamento com CBD (15, 30 ou 60 mg/kg) e clozapina (CLO, 1 mg/kg) sobre o prejuízo no teste de PPI causado pelo tratamento repetido com MK-801 (1 mg/kg) por 28 dias. O tratamento repetido com CBD (30 e 60 mg/kg) ou com clozapina atenuou o prejuízo no teste de PPI induzido pelo MK-801 na intensidade de pré-pulso de 80 dB (n = 14/grupo). Os dados estão apresentados como média e o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo (VEI)+salina (SAL); # $P < 0,05$ em relação ao grupo VEI+MK-801, ANOVA de uma via para cada intensidade de pré-pulso seguida do teste S-N-K.

Os tratamentos não alteraram a resposta de sobressalto ao pulso (Tabela 2).

Tabela 2 - Amplitude da resposta de sobressalto ao pulso avaliada no teste de PPI realizado 24 h após o fim do tratamento repetido com CBD, clozapina e MK-801 por 28 dias.

Grupo	Resposta de Sobressalto (U.A.)
VEI + SAL	1362 ± 93,2
CLO + SAL	1195 ± 56,7
CBD 60 + SAL	1222 ± 94,6
VEI + MK-801	1147 ± 103
CLO + MK-801	1477 ± 154
CBD 15 + MK-801	1345 ± 115
CBD 30 + MK-801	1408 ± 96,3
CBD 60 + MK-801	1211 ± 122
	$F_{7,104} = 1,1$

Os dados foram expressos como a média ± EPM. $P > 0,05$, ANOVA de uma via; $n = 14$ /grupo. CBD: canabidiol; CLO: clozapina; SAL: salina; VEI: veículo; U.A.: unidades arbitrárias.

5.3. Experimento 3: Efeito de uma única administração de CBD e clozapina no último dia de tratamento repetido com MK-801 sobre o prejuízo no teste de PPI

A ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito geral da intensidade de pré-pulso ($F_{2,98} = 9,7$, $P < 0,05$) e do tratamento ($F_{7,56} = 4,2$, $P < 0,05$), e interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento ($F_{12,98} = 2,9$, $P < 0,05$). Adicionalmente, através de ANOVA de uma via, nós verificamos um efeito do tratamento apenas na intensidade de pré-pulso de 85 dB (80 dB: $F_{7,56} = 1,7$, $P > 0,05$; 85 dB: $F_{7,56} = 4,5$, $P < 0,05$; 90 dB: $F_{7,56} = 0,5$, $P > 0,05$), sendo que, como esperado, o MK-801 foi capaz de induzir prejuízo no teste de PPI após 28 dias de tratamento ($P < 0,05$, S-N-K; Figura 9). A administração de apenas uma dose de CBD (30 ou 60 mg/kg) ou clozapina não foi capaz de atenuar o prejuízo no PPI induzido pelo MK-801 ($P > 0,05$, S-N-K; Figura 9).

Figura 9 – Efeito de uma única administração de CBD (30 ou 60 mg/kg), clozapina (CLO, 1 mg/kg) ou veículo (VEI) no último dia do tratamento repetido (28 dias) com salina (VEI) ou MK-801 (1 mg/kg) no teste de PPI, que foi realizado 24 h após o fim do tratamento. A administração única de CBD ou clozapina não atenuou o prejuízo no teste de PPI induzido pelo MK-801 verificado na intensidade de pré-pulso de 85 dB ($n = 8/\text{grupo}$). Os resultados estão apresentados como a média e o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo VEI+SAL, ANOVA de uma via para cada intensidade de pré-pulso seguida do teste S-N-K.

Os tratamentos não alteraram a resposta de sobressalto ao pulso (Tabela 3).

Tabela 3 - Amplitude da resposta de sobressalto ao pulso avaliada no teste de PPI realizado 24 h após o fim do tratamento repetido MK-801 por 28 dias, sendo o CBD e a clozapina administrados apenas no último dia de tratamento com MK-801.

Grupo	Resposta de Sobressalto (U.A.)
VEI + SAL	1288 ± 113
CLO + SAL	1155 ± 98,8
CBD 60 + SAL	1069 ± 75,6
VEI + MK-801	1054 ± 100
CLO + MK-801	1169 ± 92,3
CBD 15 + MK-801	1057 ± 96,1
CBD 30 + MK-801	1272 ± 113
CBD 60 + MK-801	1355 ± 78,8
	$F_{7,56} = 1,4$

Os dados foram expressos como a média ± EPM. $P > 0,05$, ANOVA de uma via; $n = 8$ /grupo. CBD: canabidiol; CLO: clozapina; SAL: salina; VEI: veículo; U.A.: unidades arbitrárias.

5.4 Experimento 4: Efeito do tratamento repetido com CBD e clozapina sobre as alterações nos testes de interação social e reconhecimento de objeto induzidas pelo tratamento com MK-801

Interação social: A ANOVA de uma via indicou um efeito do tratamento ($F_{6,51} = 5,5$, $P < 0,05$), sendo observado uma redução no tempo de interação social induzido pelo MK-801 ($P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K; Figura 10), um efeito que não foi observado nos animais tratados com CBD 30 mg/kg+MK-801 ($P > 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K). Já o CBD, na dose de 60 mg/kg, e a clozapina foram mais efetivos em reverter as alterações induzidas pelo MK-801 ($P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+MK-801, S-N-K). Adicionalmente, o CBD e a clozapina *per se* não induziram nenhum efeito ($P > 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K).

Figura 10 - Efeito da administração repetida de clozapina (CLO, 1 mg/kg), CBD (30 ou 60 mg/kg) ou veículo (VEI) sobre o prejuízo na interação social induzido pelo tratamento com MK-801 (1 mg/kg) por 28 dias. O tratamentos com CBD (30 ou 60 mg/kg) ou clozapina atenuou a diminuição no tempo de interação social induzida pelo MK-801 ($n = 7-9/\text{grupo}$). Os dados estão apresentados como a média e o EPM.* $P < 0,05$ em relação ao grupo VEI+SAL e # $P < 0,05$ em relação ao grupo VEI+MK-801, ANOVA de uma via seguido do teste S-N-K.

Reconhecimento de objeto: No teste de aquisição (T1), ANOVA de medidas repetidas não revelou efeito significativo no tempo gasto explorando os dois objetos idênticos entre os grupos ($F_{1,49} = 1,7$, $P > 0,05$), indicando que não houve nenhuma preferência para a exploração do objeto colocado no lado esquerdo ou direito da arena (Figura 11A). Por outro lado, no teste de retenção (T2), o tempo gasto explorando o objeto novo *versus* o objeto familiar foi significativamente maior entre os grupos ($F_{1,49} = 117,1$, $P < 0,0001$; Figura 11B). Além disso, para todos os grupos, exceto para os animais tratados com MK-801, o tempo de exploração do

objeto novo foi significativamente maior em comparação ao objeto familiar ($P < 0,05$, exploração do objeto novo vs. objeto familiar, teste t de *Student*; Figura 11B), indicando que a capacidade de discriminação entre objeto novo e familiar foi prejudicada pelo tratamento repetido com MK-801. Consequentemente, esse prejuízo induzido pelo MK-801 foi também indicado pela diminuição do índice de discriminação observado nos animais tratados com veículo+MK-801 ($F_{6,49} = 4,5$, $P < 0,001$, S-N-K; Figura 11C), uma alteração que não foi observada nos animais tratados com CBD 30 mg/kg+MK-801 ($P > 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K). Já o CBD na dose de 60 mg/kg e a clozapina foram mais efetivos em atenuar as alterações induzidas pelo MK-801 ($P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+MK-801, S-N-K; Figura 11C). Adicionalmente, o CBD e a clozapina *per se* não induziram nenhum efeito ($P > 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K).

Figura 11 - Efeito da administração repetida de CBD (30 ou 60 mg/kg), clozapina (CLO, 1 mg/kg) ou veículo (VEI) sobre o prejuízo cognitivo induzido pelo tratamento com MK-801 (1 mg/kg) por 28 dias avaliado no teste de reconhecimento de objeto. **(A)** Efeito dos tratamentos sobre a exploração de dois objetos idênticos na sessão de aquisição (T1). **(B)** Efeito dos tratamentos sobre a exploração de um objeto novo e um objeto familiar no teste de retenção (T2). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. * $P < 0,05$, indica diferença na exploração do objeto novo comparado ao familiar para cada grupo, teste t de *Student*. **(C)** Efeito dos tratamentos sobre o índice de reconhecimento de objeto ($n = 7-9$ /grupo). * $P < 0,05$ em relação ao grupo VEI+SAL e # $P < 0,05$ em relação ao grupo VEI+MK-801 ANOVA de uma via seguida do teste S-N-K.

5.5. Experimento 5: Avaliação do tratamento repetido com CBD, clozapina e MK-801 nos comportamentos avaliados no LCE e no teste do campo aberto

Como indicado na Tabela 4, nenhuma alteração induzida pelos tratamentos foi observada quando os animais foram submetidos ao LCE ou ao campo aberto. Esses resultados indicam que os efeitos observados nos demais testes comportamentais não foram devidos a comportamentos relacionados a ansiedade ou alteração na atividade locomotora.

Tabela 4 - Efeitos induzidos pelos tratamentos como MK-801, CBD e clozapina nos comportamentos avaliados no LCE e no teste do campo aberto.

Tratamento	LCE			Campo aberto
	% Entradas nos braços abertos	% Tempo nos braços abertos	Nº de Entradas nos braços fechados	Distância total percorrida (m)
VEI + SAL	28,6 ± 4,18	14,0 ± 3,6	13,5 ± 0,9	18,1 ± 1,2
CLO + SAL	27,5 ± 3,5	10,4 ± 2,3	11,2 ± 1,2	16,4 ± 1,5
CBD 60 + SAL	37,4 ± 2,8	15,6 ± 3,0	11,0 ± 0,8	18,4 ± 0,8
VEI + MK-801	31,0 ± 2,6	10,9 ± 2,2	12,4 ± 1,1	17,8 ± 0,9
CLO + MK-801	25,6 ± 3,9	9,9 ± 2,6	12,2 ± 0,8	15,6 ± 0,7
CBD 60 + MK-801	34,6 ± 3,5	14,1 ± 2,6	11,0 ± 1,3	15,9 ± 1,4
	$F_{2,47} = 0,3$	$F_{2,47} = 0,1$	$F_{2,47} = 0,5$	$F_{2,47} = 0,6$

Os dados estão apresentados como a média ± EPM. Os valores de F indicam a ausência de interação significativa ($P > 0,05$) entre o primeiro (veículo, clozapina ou CBD) e segundo tratamentos (salina ou MK-801), ANOVA de duas vias ($n = 8$ -10/grupo). CBD, canabidiol; CLO, clozapina; VEI, veículo; SAL, salina.

5.6. Alteração na expressão de FosB/ Δ FosB, parvalbumina, NeuN, GFAP, Iba-1 induzida pelo tratamento repetido com MK-801, CBD e clozapina em estruturas cerebrais específicas

FosB/ Δ FosB: A quantificação das células FosB/ Δ FosB-positivas no CPFm indicou efeito significativo do primeiro (veículo, clozapina ou CBD; $F_{2,36} = 4,0$, $P = 0,02$) e segundo tratamentos (salina ou MK-801; $F_{1,36} = 4,8$, $P = 0,034$), e uma interação entre eles ($F_{2,36} = 4,4$, $P = 0,02$). Análises *posthoc* mostraram que os animais tratados com veículo+MK-801 apresentaram um maior número de células FosB/ Δ FosB-positivas quando comparados aos demais grupos ($P < 0,05$, S-N-K; Figura 12A e 12B), uma alteração que não foi observada nos animais tratados com CBD (60 mg/kg)+MK-801 ou clozapina+MK-801 ($P > 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K; Figura 12A e 12B). Além disso, o CBD e a clozapina *per se* não alteraram a expressão de FosB/ Δ FosB no CPFm ($P > 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K).

No NAc *core* também foram observados efeitos significativos do primeiro (veículo, clozapina ou CBD; $F_{2,36} = 5,1$, $P = 0,01$) e segundo tratamentos (salina ou MK-801; $F_{1,36} = 14,2$, $P = 0,001$), e uma interação entre eles ($F_{2,36} = 3,9$, $P = 0,03$). Foi observado um aumento no número de células FosB/ Δ FosB-positivas nos animais tratados com veículo+MK-801 ($P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K; Figura 12C e 12D). Mas, diferentemente do observado para o CPFm, o tratamento com clozapina ou CBD não atenuou as alterações induzidas pelo MK-801 ($P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K; Figura 12C e 12D). Adicionalmente, a clozapina *per se* também induziu um aumento no número de células FosB/ Δ FosB-positivas no NAc *core* ($P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K; Figura

12C e 12D), mas nenhuma alteração foi induzida pelo CBD ($P > 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K).

Figura 12 - Efeito do tratamento repetido com MK-801 (1 mg/kg), clozapina (CLO, 1 mg/kg) e CBD (60 mg/kg) sobre a expressão da proteína FosB/ Δ FosB **(A e B)** no CPFM e **(C e D)** no NAc core ($n = 7$ /grupo). O MK-801 aumentou o número de células FosB/ Δ FosB-positivas **(A)** no CPFM e **(C)** no NAc core. CBD e clozapina atenuaram as alterações induzidas pelo MK-801 no CPFM, mas não no NAc core. A clozapina *per se* também aumentou o número de células FosB/ Δ FosB-positivas no NAc core. Os dados foram apresentados como a média e o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, ANOVA de duas vias seguida do teste S-N-K. **(B e D)** Fotomicrografias representativas indicando a imunorreatividade para FosB/ Δ FosB no CPFM e NAc core (20X; barra de escala = 100 μ m).

Nenhuma alteração no número de células FosB/ Δ FosB-positivas foi observada no estriado dorsal, NAc *shell* e hipocampo dorsal (giro denteado, CA1 e CA3; Figura 13).

Figura 13 - Efeito do tratamento repetido com clozapina (CLO, 1 mg/kg); CBD (60 mg/kg) e MK-801 (1 mg/kg) sobre o número de células FosB/ Δ FosB-positivas no **(A)** estriado dorsal, **(B)** NAc *shell*, **(C)** giro denteado, **(D)** CA1 e **(E)** CA3 (n = 7 /grupo). Nenhuma alteração induzida pelos tratamentos foi observada. Os dados foram apresentados como a média e o EPM. $P > 0,05$, ANOVA de duas vias.

Parvalbumina: A ANOVA de duas vias indicou uma tendência para o efeito do primeiro tratamento ($F_{2,36} = 3,1$, $P = 0,06$), um efeito significativo do segundo tratamento ($F_{1,36} = 10,4$, $P = 0,003$) e uma interação entre eles ($F_{2,36} = 4,8$,

$P = 0,015$). O tratamento com MK-801 resultou em diminuição no número de células parvalbumina-positivas no CPFm ($P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K; Figura 14A e 14B), uma alteração que não foi observada nos animais tratados com CBD 60 mg/kg+MK-801 ($P > 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K). A clozapina, entretanto, foi mais efetiva em atenuar as alterações induzidas pelo MK-801 ($P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+MK-801, S-N-K; Figura 14 A e 14B). O CBD e a clozapina *per se* não alteraram o número de células parvalbumina-positivas no CPFm ($P > 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K).

Figura 14 - Efeito do tratamento repetido com MK-801 (1 mg/kg), clozapina (CLO, 1 mg/kg) e CBD (60 mg/kg) sobre a expressão da proteína parvalbumina no CPFm ($n = 7$ /grupo). **(A)** O tratamento com MK-801 diminuiu o número de células parvalbumina-positivas. CBD e clozapina atenuaram as alterações induzidas pelo MK-801. Os dados foram apresentados como a média e o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, # $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+MK-801; ANOVA de duas vias seguida do teste S-N-K. **(B)** Fotomicrografias representativas indicando a imunorreatividade para a parvalbumina no CPFm (10X; barra de escala = 200 µm). CC: corpo caloso; CPFm: córtex pré-frontal medial.

Nenhuma alteração no número de células parvalbumina-positivas foi observada no estriado dorsal, e hipocampo dorsal (giro denteado, CA1 e CA3; Figura 15). Além disso, a imunorreatividade para parvalbumina foi fracamente detectada no NAc, indicando que a parvalbumina pode ser expressa em níveis abaixo do limite de detecção nesta estrutura. De fato, Todtenkopf e colaboradores (2004) observaram uma baixa expressão de parvalbumina no NAc de ratos.

Figura 15 - Efeito do tratamento repetido com clozapina (CLO, 1 mg/kg); CBD (60 mg/kg) e MK-801 (1 mg/kg) sobre o número de células parvalbumina-positivas no **(A)** estriado dorsal, **(B)** giro denteado, **(C)** CA1 e **(D)** CA3 (n = 7/grupo). Nenhuma alteração foi observada. Os dados foram apresentados como a média e o EPM. $P > 0,05$, ANOVA de duas vias.

NeuN: Nenhuma alteração no número de células NeuN-positivas foi observada nas estruturas cerebrais estudadas (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeito do tratamento repetido com MK-801, CBD e clozapina sobre a expressão de NeuN.

Estrutura	Número de células NeuN ⁺ /0,1mm ²					
	VEI+SAL	CLO+SAL	CBD+SAL	VEI+MK-801	CLO+MK-801	CBD+MK-801
CPFm	118 ± 15	135 ± 6	112 ± 8	166 ± 12	136 ± 21	108 ± 18
Estriado dorsal	158 ± 16	176 ± 7	167 ± 16	173 ± 14	194 ± 22	179 ± 13
NAc core	217 ± 14	234 ± 9	213 ± 8	249 ± 16	241 ± 17	217 ± 8
NAc shell	253 ± 41	236 ± 26	222 ± 8	241 ± 42	268 ± 31	262 ± 35
Células NeuN⁺ no hipocampo - Densidade óptica (% em relação ao grupo VEI+SAL)						
	VEI+SAL	CLO+SAL	CBD+SAL	VEI+MK-801	CLO+MK-801	CBD+MK-801
GD - <i>Upper blade</i>	100 ± 19	131 ± 25	111 ± 16	136 ± 28	101 ± 11	127 ± 16
GD - <i>Outer blade</i>	100 ± 11	126 ± 18	89 ± 12	108 ± 19	89 ± 22	100 ± 14
GD - <i>Inner blade</i>	100 ± 15	121 ± 21	98 ± 13	127 ± 27	90 ± 21	116 ± 16
CA1	100 ± 18	129 ± 14	92 ± 6	112 ± 10	94 ± 24	107 ± 14
CA3	100 ± 16	103 ± 17	91 ± 22	97 ± 21	102 ± 23	118 ± 12

Nenhuma alteração na expressão de NeuN foi observada. Para as regiões do hipocampo, devido à sobreposição de células imunorreativas, a análise foi realizada pelo método de densitometria óptica e os valores foram expressos como a porcentagem de densidade óptica em relação ao grupo controle. Os dados foram expressos como a média ± EPM. $P > 0,05$, ANOVA de duas vias; $n = 5-7$ /grupo. CBD: canabidiol; CLO: clozapine; CPFm: córtex pré-frontal medial; GD: giro denteado; NAc: núcleo *accumbens*; SAL: salina; VEI: veículo.

GFAP: A quantificação de células GFAP-positivas no CPFm revelou que não houve efeito significativo para o primeiro tratamento (veículo, clozapina ou CBD; $F_{2,33} = 1,4$, $P > 0,05$). Entretanto, houve um efeito significativo para o segundo tratamento (salina ou MK-801; $F_{1,33} = 17,8$, $P = 0,0001$) e uma interação entre o primeiro e o segundo tratamento ($F_{2,33} = 4,8$, $P = 0,015$). Foi observado um aumento no número de células GFAP-positivas no CPFm dos animais tratados com veículo+MK-801 ($P < 0,05$ em relação ao grupo veículo + salina, S-N-K; Figura 16 A e 16B), uma alteração que não foi observada nos animais tratados com CBD 60 mg/kg+MK-801 ($P > 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K). A clozapina, entretanto, foi mais efetiva em atenuar as alterações induzidas pelo MK-801 ($P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+MK-801, S-N-K; Figura 16 A e 16B). Além disso, o CBD e a clozapina *per se* não alteraram o número de células GFAP-positivas ($P > 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, S-N-K).

Figure 16 - Efeito do tratamento repetido com MK-801 (1 mg/kg), clozapina (CLO, 1 mg/kg) e CBD (60 mg/kg) sobre a expressão da proteína GFAP no CPFM ($n = 6-7$ /grupo). **(A)** O tratamento com MK-801 aumentou o número de células GFAP-positivas. CBD e clozapina atenuaram as alterações induzidas pelo MK-801. Os dados foram apresentados como a média e o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, # $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+MK-801; ANOVA de duas vias seguida do teste S-N-K. **(B)** Fotomicrografias representativas indicando a imunorreatividade para GFAP no CPFM (20X; barra de escala = 50 μ m).

Nenhuma alteração no número de células GFAP-positivas foi observada no estriado dorsal, NAc *core* e *shell* e hipocampo dorsal (giro dentado, CA1 e CA3; Figura 17).

Figura 17 - Efeito do tratamento repetido com clozapina (CLO, 1 mg/kg); CBD (60 mg/kg) e MK-801 (1 mg/kg) sobre o número de células GFAP-positivas no **(A)** estriado dorsal, **(B)** NAc core, **(C)** NAc shell, **(D)** giro denteado, **(E)** CA1 e **(F)** CA3 (n= 4-7/grupo). Nenhuma alteração foi observada. Os dados foram apresentados como a média e o EPM. $P > 0,05$, ANOVA de duas vias.

Iba-1: Nenhuma alteração no número de células Iba-1-positivas foi observada nas estruturas cerebrais estudadas (Tabela 6). Entretanto, a avaliação dos diferentes tipos morfológicos das células Iba-1-positivas indicou que o tratamento com MK-801 resultou em diminuição na porcentagem de células microgliais em repouso (Tipos morfológicos I e II) e, consequentemente, em

aumento de microglia em estado reativo (Tipos III, IV e V) no CPFm, giro denteado e CA1 (Figura 18).

ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito significativo do fator "tipo morfológico" em todas as estruturas estudadas (CPFm: $F_{4,112} = 165,7$; estriado dorsal: $F_{4,108} = 351,6$; NAc *core*: $F_{4,104} = 176,3$; NAc *shell*: $F_{4,108} = 194,8$; giro denteado: $F_{4,104} = 276,8$; CA1: $F_{4,100} = 218,3$; CA3: $F_{4,104} = 111,5$; $P < 0,0001$ para todas as estruturas), e uma interação significativa (ou tendência) entre o primeiro tratamento, o segundo tratamento e o fator "tipo morfológico" somente no CPFm ($F_{4,112} = 4,82$; $P = 0,001$), giro denteado ($F_{8,104} = 2,2$; $P = 0,07$) e CA1 ($F_{8,100} = 2,32$; $P = 0,065$). ANOVA de duas vias, seguida do teste *posthoc* S-N-K, realizada para avaliar as alterações nessas três estruturas indicaram uma diminuição na porcentagem de microglia em repouso (Tipos I e II) e um aumento na microglia reativa (Tipos III, IV e V) induzido pelo tratamento com MK-801. Estas alterações foram atenuadas pelo tratamento com CBD e clozapina (Figura 18). Entretanto, o CBD e a clozapina *per se* não induziram nenhuma alteração.

Tabela 6 - Efeito do tratamento repetido com MK-801, CBD e clozapina sobre o número de células Iba-1-positivas e sobre a porcentagem dos diferentes fenótipos morfológicos de microglia.

Tratamento	Número de células Iba-1 ⁺ /0,1mm ²	Células Iba-1-positivas classificadas de acordo com seus aspectos morfológicos (%)				
		Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
CPFm						
VEI + SAL	62,5 ± 4,0	58,6 ± 5,8	28,5 ± 4,6	11,3 ± 3,6	1,6 ± 0,8	0,0 ± 0,0
CLO + SAL	59,0 ± 2,1	51,8 ± 1,8	34,8 ± 2,8	11,6 ± 2,7	1,7 ± 1,1	0,0 ± 0,0
CBD + SAL	56,9 ± 4,8	54,5 ± 5,6	30,0 ± 5,5	13,5 ± 1,5	2,0 ± 1,3	0,0 ± 0,0
VEI + MK-801	67,9 ± 5,6	23,9 ± 2,2*	32,2 ± 2,1	25,6 ± 4,7*	11,9 ± 3,6*	6,3± 0,7*
CLO + MK-801	58,7 ± 2,3	47,4 ± 4,8#	33,5 ± 6,3	14,0 ± 2,0	5,1 ± 3,4	0,0 ± 0,0#
CBD + MK-801	71,4 ± 3,5	60,1 ± 5,8#	26,7 ± 4,8	9,6 ± 2,4#	3,6 ± 1,7	0,0 ± 0,0#
Estriado dorsal						
VEI + SAL	66,0 ± 3,1	51,4 ± 5,0	40,3 ± 4,6	5,8 ± 1,7	1,1 ± 0,7	1,4 ± 1,4
CLO + SAL	53,3 ± 4,0	54,9 ± 3,9	43,9 ± 3,7	0,5 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,7
CBD + SAL	51,8 ± 3,3	63,0 ± 4,0	32,3 ± 3,1	3,9 ± 1,7	0,8 ± 0,8	0,0 ± 0,0
VEI + MK-801	56,6 ± 1,3	48,3 ± 3,0	42,7 ± 4,7	5,4 ± 1,5	1,5 ± 0,9	0,0 ± 0,0
CLO + MK-801	51,8 ± 5,2	57,3 ± 1,1	37,4 ± 1,6	5,3 ± 1,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
CBD + MK-801	59,6 ± 4,5	52,6 ± 6,6	40,9 ± 8,9	6,5 ± 3,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
NAC core						
VEI + SAL	31,9 ± 5,2	48,9 ± 5,1	38,7 ± 6,0	8,9 ± 1,9	3,5 ± 1,6	0,0 ± 0,0
CLO + SAL	28,3 ± 3,1	49,1 ± 2,7	41,7 ± 3,0	7,5 ± 2,1	1,1 ± 0,7	0,0 ± 0,0
CBD + SAL	29,6 ± 4,1	50,1 ± 4,8	41,0 ± 4,9	8,1 ± 2,1	0,7 ± 0,7	0,0 ± 0,0
VEI + MK-801	28,3 ± 5,6	50,1 ± 7,8	30,0 ± 4,7	15,5 ± 5,6	4,7 ± 2,4	0,0 ± 0,0
CLO + MK-801	23,5 ± 4,0	42,5 ± 5,6	46,5 ± 3,7	8,9 ± 3,3	1,4 ± 0,9	0,0 ± 0,0
CBD + MK-801	20,0 ± 2,4	37,8 ± 7,7	53,9 ± 6,6	7,0 ± 3,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
NAC shell						
VEI + SAL	49,3 ± 2,6	38,3 ± 4,4	45,7 ± 5,1	12,2 ± 2,3	2,9 ± 1,5	0,7 ± 0,7
CLO + SAL	40,6 ± 2,8	39,6 ± 5,0	47,6 ± 4,2	10,2 ± 2,2	2,5 ± 1,7	0,0 ± 0,0
CBD + SAL	43,5 ± 5,0	47,0 ± 5,7	41,5 ± 6,0	6,9 ± 2,5	3,7 ± 2,5	0,8 ± 0,8
VEI + MK-801	48,7 ± 3,4	41,1 ± 7,1	42,1 ± 3,0	12,8 ± 3,8	2,8 ± 1,8	1,2 ± 1,2
CLO + MK-801	41,7 ± 4,2	45,2 ± 5,6	45,0 ± 3,9	7,3 ± 2,9	2,7 ± 1,2	0,0 ± 0,0
CBD + MK-801	49,2 ± 1,9	31,1 ± 3,2	51,3 ± 2,0	14,9 ± 1,9	2,7 ± 1,7	0,0 ± 0,0

(continua)

GD (hilus)						
VEI + SAL	63,5 ± 3,8	40,1 ± 3,4	52,9 ± 2,1	6,1 ± 1,0	1,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0
CLO + SAL	53,6 ± 2,9	42,8 ± 5,8	44,4 ± 3,6	9,5 ± 2,9	2,9 ± 1,3	0,4 ± 0,4
CBD + SAL	51,1 ± 4,3	47,1 ± 4,5	44,7 ± 4,1	6,2 ± 2,5	2,0 ± 0,9	0,0 ± 0,0
VEI + MK-801	54,7 ± 4,8	32,9 ± 5,0*	43,1 ± 2,7	12,1 ± 3,0	7,1 ± 2,1*	4,7 ± 2,5*
CLO + MK-801	50,9 ± 3,9	46,1 ± 4,4	46,8 ± 3,2	5,7 ± 1,7	1,2 ± 0,9#	0,0 ± 0,0#
CBD + MK-801	55,5 ± 2,8	36,6 ± 6,6	52,5 ± 3,7	7,0 ± 2,4	3,3 ± 2,1	0,6 ± 0,6
CA1						
(str. radiatum)						
VEI + SAL	45,1 ± 3,4	38,2 ± 4,9	48,5 ± 3,9	10,9 ± 2,2	1,5 ± 1,0	0,9 ± 0,9
CLO + SAL	51,5 ± 2,9	42,5 ± 4,7	49,6 ± 5,1	6,3 ± 1,7	1,5 ± 0,9	0,0 ± 0,0
CBD + SAL	46,1 ± 5,7	41,1 ± 4,4	48,0 ± 5,0	8,3 ± 2,8	2,6 ± 1,1	0,0 ± 0,0
VEI + MK-801	46,8 ± 5,1	26,1 ± 2,3	35,8 ± 0,9	14,8 ± 0,5	21,9 ± 2,7*	1,2 ± 0,8
CLO + MK-801	49,3 ± 4,0	36,4 ± 5,3	47,0 ± 3,9	9,2 ± 1,9	6,9 ± 2,7#	0,6 ± 0,6
CBD + MK-801	43,5 ± 6,9	40,1 ± 4,8	50,4 ± 3,7	8,0 ± 1,8	1,5 ± 1,5#	0,0 ± 0,0
CA3						
(str. radiatum)						
VEI + SAL	29,8 ± 2,0	33,0 ± 4,1	52,1 ± 5,1	11,6 ± 2,7	3,2 ± 1,6	0,0 ± 0,0
CLO + SAL	31,2 ± 1,4	43,1 ± 8,8	44,7 ± 5,6	8,3 ± 1,8	2,9 ± 1,2	0,0 ± 0,0
CBD + SAL	29,0 ± 1,3	42,8 ± 5,2	44,9 ± 3,8	6,5 ± 2,7	3,8 ± 1,0	2,0 ± 1,2
VEI + MK-801	30,1 ± 2,0	35,4 ± 4,8	34,5 ± 5,9	15,0 ± 3,2	11,9 ± 4,1	3,1 ± 2,2
CLO + MK-801	30,9 ± 1,1	38,7 ± 5,7	49,7 ± 5,3	9,0 ± 2,1	1,9 ± 1,3	0,6 ± 0,6
CBD + MK-801	29,9 ± 0,8	49,7 ± 7,8	30,2 ± 9,7	12,8 ± 4,0	7,3 ± 2,4	0,0 ± 0,0

Nenhuma alteração no número de células Iba-1-positivas foi observada nas estruturas avaliadas. Entretanto, alterações na distribuição dos tipos morfológicos dessas células foram observadas no CPFm, GD e CA1 (ver Figura 18). Os dados foram expressos como a média ± EPM. *P < 0,05 em relação ao grupo VEI+SAL, #P < 0,05 em relação ao grupo VEI+MK-801; ANOVA de duas vias seguida pelo teste S-N-K; n = 4-7/grupo. CBD: canabidiol; CLO: clozapina; CPFm: córtex pré-frontal medial; GD: giro denteado; NAc: núcleo *accumbens*; SAL: salina; *str. radiatum*: *stratum radiatum*; VEI: veículo.

Figura 18 - Efeito do tratamento repetido com clozapina (CLO, 1 mg/kg); CBD (60 mg/kg) e MK-801 (1 mg/kg) sobre a reatividade microglial no **(A-B)** CPFm, **(C-D)** giro denteado e **(E-F)** CA1 ($n = 4-7/\text{grupo}$). O tratamento com MK-801 aumentou a porcentagem de microglia Iba-1-positivas com fenótipo reativo (Tipos III, IV e V) nessas estruturas; estas alterações foram atenuadas pelo tratamento com CBD ou clozapina. Os dados foram expressos como a média e o EPM da porcentagem dos

diferentes morfotipos de microglia (Tipos I, II, III, IV e V). * $P < 0,05$ em relação ao grupo VEI+SAL, # $P < 0,05$ em relação ao grupo VEI+MK-801; ANOVA de duas vias seguida pelo teste S-N-K. **(B, D e F)** Fotomicrografias representativas indicando células microgлияis imunorreativas para Iba-1 no CPFm, giro denteado e CA1 (20X; barra de escala = 50 μm).

5.7. Alteração na expressão do RNAm para o gene da subunidade obrigatória GluN1 do receptor NMDA (GRN1) induzida pelo tratamento repetido com MK-801, CBD e clozapina

Os animais tratados com veículo+MK-801 apresentaram expressão reduzida do RNAm para o gene GRN1 no hipocampo em comparação com o grupo controle ($\chi^2 = 16,4$, $P = 0,006$, teste de Dunn, $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, Figura 19), uma alteração não observada nos animais tratados com CBD 60 mg/kg+MK-801 ou clozapina+MK-801 (teste de Dunn, $P > 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina). Além disso, nenhuma alteração induzida pelos tratamentos foi observada no córtex frontal e estriado ($P > 0,05$, Figure 19).

Figure 19 - Efeito do tratamento repetido com MK-801 (1 mg/kg), clozapina (CLO; 1 mg/kg) e CBD (60 mg/kg) sobre a expressão do RNAm para o gene da subunidade GluN1 do receptor NMDA (GRN1) no **(A)** córtex frontal, **(B)** estriado e **(C)** hipocampo (n = 5-7/grupo). O tratamento com MK-801 diminuiu a expressão relativa do RNAm para o gene da subunidade GluN1 do receptor NMDA, um efeito que não foi observado nos animais tratados com clozapina+MK-801 ou CBD+MK-801. Nenhuma alteração induzida pelos tratamentos foi observada no córtex frontal ou estriado. Os dados foram expressos como a mediana $\pm$ o intervalo interquartil. * $P < 0,05$ em relação ao grupo VEI+SAL, Kuskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Corroborando a proposta de que a administração repetida de antagonistas dos receptores NMDA pode ser um modelo animal útil para o estudo da neurobiologia da esquizofrenia, os resultados do presente estudo demonstraram que a administração repetida do MK-801 durante 28 dias induziu prejuízos comportamentais nos testes de PPI, reconhecimento de objeto e interação social, os quais foram realizados 1 (teste de PPI e interação social) ou 2 dias (reconhecimento de objeto) após o fim do tratamento. Nenhum efeito no teste de PPI foi observado após 14 ou 21 dias de tratamento com MK-801. Estes resultados são consistentes com estudos indicando nenhuma alteração no teste de PPI após o tratamento repetido com fenciclidina, um antagonista dos receptores NMDA, durante 14 dias (Martinez *et al.*, 1999) e, também, com estudos mostrando a indução de prejuízos cognitivos pelo tratamento crônico intermitente com fenciclidina por 28 dias (Vigano *et al.*, 2009; Guidali *et al.*, 2011). Adicionalmente, nenhuma alteração no LCE e na avaliação da atividade locomotora no teste do campo aberto foi observada, indicando que as alterações comportamentais induzidas pelo tratamento repetido com MK-801 não estão relacionadas a alterações em comportamentos relacionados à ansiedade ou atividade locomotora.

Além das alterações comportamentais, o tratamento repetido com MK-801 diminuiu o número de células parvalbumina-positivas no CPFm e a expressão do RNAm para o gene da subunidade obrigatória GluN1 do receptor NMDA (GRN1) no hipocampo. Estas alterações são similares às aquelas observadas no cérebro *postmortem* de pacientes com esquizofrenia (Lewis *et al.*, 2005; Weickert *et al.*, 2013). O tratamento com MK-801 também resultou em aumento no número de

células FosB/ Δ FosB-positivas no CPFm e NAc *core*. Um aumento no número de astrócitos GFAP-positivos no CPFm e na porcentagem de células microgliais Iba-1-positivas com fenótipo reativo (Tipos III, IV e V) no CPFm, giro denteado e na porção CA1 do hipocampo, sem alteração no número total de células Iba-1-positivas, também foi observado no cérebro de animais tratados com MK-801. Além disso, nenhuma alteração no número de células NeuN-positivas foi observada. As alterações comportamentais induzidas pelo MK-801 não foram observadas nos animais tratados com CBD 30 mg/kg+MK-801. Entretanto, o CBD, na dose de 60 mg/kg, e a clozapina foram mais eficazes na atenuação dessas alterações. Consequentemente, nós avaliamos apenas os efeitos do CBD na dose de 60 mg/kg sobre as alterações moleculares induzidas pelo MK-801. De forma semelhante às alterações comportamentais, o CBD e a clozapina também atenuaram as alterações moleculares induzidas pelo tratamento com MK-801. No entanto, a clozapina foi mais eficaz em atenuar o aumento do número de células GFAP-positivas e a diminuição das células parvalbumina-positivas induzida pelo MK-801 no CPFm.

Embora o tratamento repetido com antagonistas dos receptores NMDA também induzem alterações comportamentais relacionadas aos sintomas positivos da esquizofrenia (Jentsch *et al.*, 1998), o foco do presente estudo foi sobre as alterações comportamentais relacionadas com disfunções no filtro sensório-motor e cognitiva e com os sintomas negativos da esquizofrenia. Estas alterações, foram avaliadas no presente estudo, no teste de PPI, reconhecimento de objeto e interação social, respectivamente, e que são geralmente observadas após a administração repetida de antagonistas dos receptores NMDA em roedores (Guidali *et al.*, 2011; Mouri *et al.*, 2007; Rujescu *et al.*, 2006; Vigano *et al.*, 2009). Nossos resultados

corroboram esses achados e ainda mostram que essas alterações foram atenuadas pelo tratamento repetido com CBD e com clozapina.

No teste de PPI, embora os prejuízos induzidos pelo MK-801 ocorreram com o pré-pulso nas intensidades de 80 e 85 dB, os efeitos da clozapina e do CBD atenuando esses prejuízos foram observados com o pré-pulso na intensidade de 80 dB, mas não na de 85 dB. Este não é um achado incomum para o teste de PPI e os efeitos das drogas podem variar entre as intensidades de pré-pulso. Além disso, efeitos significativos da intensidade de pré-pulso são geralmente observados (Blumenthal, 1996; Yee *et al.*, 2005; Larrauri e Schmajuk, 2006; Swerdlow *et al.*, 2007; Issy *et al.*, 2009). Entretanto, o significado biológico destes efeitos dependentes do som é desconhecido, mas a novidade ou o contexto relacionado com o sinal (pré-pulso) parece ser um fator crítico (Blumenthal e Levey, 1989; Lane *et al.*, 1991).

Além disso, os resultados do presente estudo são consistentes com trabalhos anteriores mostrando um efeito benéfico do CBD nos déficits observados no teste de PPI após a administração aguda de MK-801 (Long *et al.*, 2006) ou anfetamina (Pedrazzi, 2014) e aqueles observados em ratos espontaneamente hipertensos (linhagem SHR; Levin *et al.*, 2014). Eles também indicam que o tratamento repetido com CBD ou com clozapina é necessário na reversão do prejuízo induzido pelo MK-801 no teste de PPI, uma vez que nenhum efeito foi observado quando os animais receberam apenas uma única administração de CBD ou clozapina no último dia de tratamento com MK-801. Vale ressaltar ainda que os tratamentos não alteraram a resposta de sobressalto ao pulso, um fato que também se relaciona com a ausência de alterações motoras e/ou relacionadas à ansiedade.

Os antipsicóticos típicos, como o haloperidol, parecem ser incapazes de reverter alterações comportamentais induzidas por antagonistas dos receptores NMDA em roedores. Os antipsicóticos atípicos, como clozapina, olanzapina e quetiapina, por outro lado, são eficazes em atenuar essas alterações (Geyer *et al.*, 2001). Neste contexto, semelhante ao observado com o tratamento repetido com a clozapina, o CBD também foi capaz de atenuar as alterações comportamentais induzidas pela administração repetida de MK-801 nos testes de PPI, interação social e reconhecimento de objeto. Estudos do nosso grupo sugerem que o CBD apresenta um perfil semelhante ao de antipsicóticos atípicos. Por exemplo, o CBD não induz catalepsia (Zuardi *et al.*, 1991; Moreira e Guimaraes, 2005; Gomes *et al.*, 2013), um efeito motor extrapiramidal comumente observado após a administração de antipsicóticos típicos. Adicionalmente, semelhante à clozapina, uma única administração de CBD em ratos aumentou a expressão da proteína c-Fos, um marcador de ativação neuronal, no NAc e no CPFm, mas não no estriado dorsolateral (Guimaraes *et al.*, 2004). Apesar destes resultados, nenhum estudo havia investigado o padrão de ativação neuronal induzida pelo tratamento repetido com CBD. Além disso, mesmo que os antagonistas dos receptores NMDA alterem a atividade neuronal em várias estruturas envolvidas na neurobiologia da esquizofrenia, como CPF, hipocampo, estriado e NAc (Duncan *et al.*, 1998), as regiões cerebrais envolvidas nos efeitos induzidos pela administração repetida destas drogas não são completamente conhecidas. Por isso, nós investigamos a expressão da proteína FosB/ Δ FosB nas estruturas cerebrais citadas anteriormente.

Enquanto a proteína c-Fos e maioria das outras proteínas relacionadas a Fos são altamente instáveis e, por isso, desaparecem rapidamente (aproximadamente 2 h) após o fim do estímulo, a proteína FosB e a sua variante

truncada Δ FosB acumulam em regiões específicas do cérebro após exposição repetida a diferentes estímulos (Nestler *et al.*, 1999). Uma vez induzidas, como estas proteínas possuem maior estabilidade (não são degradadas rapidamente), elas persistem no cérebro durante semanas após o estímulo inicial (Nestler *et al.*, 1999). Assim, os níveis de FosB/ Δ FosB podem variar regionalmente dependendo da atividade neuronal e/ou ser influenciada pelo tratamento com drogas ou disfunções neurológicas.

O tratamento repetido com MK-801 por 28 dias aumentou a expressão de FosB/ Δ FosB no CPFm e no NAc *core*. O tratamento concomitante com CBD ou clozapina atenuou as alterações induzidas pelo MK-801 no CPFm, mas não no NAc *core*. Adicionalmente, enquanto o CBD não alterou a expressão de FosB/ Δ FosB *per se*, a clozapina aumentou a expressão de FosB/ Δ FosB no NAc *core*. Assim, mesmo que o CBD possua um perfil semelhante ao da clozapina a partir de um ponto de vista fenotípico como discutido anteriormente, os mecanismos envolvidos podem ser bastante distintos. Isso ajuda a explicar algumas diferenças observadas no presente estudo. Este efeito da clozapina esta parcialmente de acordo com observações anteriores na literatura (Rodriguez *et al.*, 2001; Grande *et al.*, 2004). Mas, contrário a outros estudos (Kontkanen *et al.*, 2002), não foi observado aumento na expressão de FosB/ Δ FosB no CPFm e NAc *shell* induzido pelo tratamento com clozapina. As razões para essas diferenças são desconhecidas, mas podem depender de diferentes espécies, esquemas de tratamento e doses utilizadas.

Os mecanismos envolvidos no aumento da expressão de FosB/ Δ FosB no CPFm e no NAc *core* induzido pelo MK-801 também não são completamente conhecidos. Para o CPFm, no entanto, níveis aumentados de glutamato após o tratamento repetido com antagonistas dos receptores NMDA foram descritos

(Moghaddam *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000). Este aumento nos níveis de glutamato parece ocorrer devido a uma diminuição do controle inibitório tônico que interneurônios GABAérgicos parvalbumina-positivos exercem sobre os neurônios glutamatérgicos piramidais no CPFm (Moghaddam *et al.*, 1997; Krystal *et al.*, 2003; Jodo *et al.*, 2005), resultando em desinibição da liberação de glutamato a partir de neurônios piramidais que estão sob a influência desses interneurônios (Olney e Farber, 1995; Adams e Moghaddam, 1998). O bloqueio dos receptores NMDA, por isso, causaria excitação cortical por interferir no controle inibitório sobre os neurônios glutamatérgicos. De fato, estudos de neuroimagem sugerem que sintomas tipo-esquizofrenia induzidos pela administração de antagonistas dos receptores NMDA em voluntários saudáveis estão associados com aumento da atividade cortical (Lahti *et al.*, 1995; Breier *et al.*, 1997).

A expressão aumentada de FosB/ Δ FosB também tem sido associada com alterações adaptativas/neuroplásticas induzidas por estímulos crônicos que promovem remodelamento sináptico como, por exemplo, a administração repetida de antipsicóticos, a exposição a eventos potencialmente estressantes e estímulos de recompensa (Atkins *et al.*, 1999; Nestler *et al.*, 1999; Lobo *et al.*, 2013). De forma interessante, o aumento da expressão de Δ FosB, mediado por vetor viral, no CPFm de camundongos resultou em prejuízos cognitivos (Dietz *et al.*, 2014). Assim, alterações na expressão de FosB/ Δ FosB, além de indicarem a ativação neuronal induzida por estímulos repetidos, também poderiam ter consequências funcionais. Entretanto, estudos adicionais são claramente necessários para investigar esta hipótese.

Outro resultado potencialmente importante do presente estudo foi a redução significativa na expressão da proteína parvalbumina induzida pelo

tratamento repetido com MK-801 no CPFm, uma alteração que foi atenuada pelo tratamento com CBD e com clozapina. Uma diminuição da neurotransmissão GABAérgica está entre as alterações patológicas mais consistentemente observadas em estudos *postmortem* na esquizofrenia (Reynolds *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2005). Estes déficits são em grande parte restritos a interneurônios GABAérgicos parvalbumina-positivos (Lewis *et al.*, 2005). E, uma hipofunção desses interneurônios parece estar diretamente relacionada com os déficits cognitivos observados em pacientes com esquizofrenia. Evidências indicam que a disfunção dos interneurônios parvalbumina-positivos na esquizofrenia resultaria de uma hipofunção na sinalização mediada pelos receptores NMDA (Belforte *et al.*, 2010; Moreau e Kullmann, 2013).

Os interneurônios parvalbumina-positivos fazem sinapse com o corpo celular e/ou com o segmento inicial do axônio de neurônios glutamatérgicos modulando a atividade dessas células. Nesse contexto, estudos em animais mostram que antagonistas dos receptores NMDA induzem uma desinibição cortical, resultante de um desequilíbrio no balanço excitação-inibição dos circuitos corticais. Moghaddam e colaboradores observaram um aumento e uma diminuição na excitabilidade das células glutamatérgicas piramidais e dos interneurônios GABAérgicos parvalbumina-positivos, respectivamente, bem como um aumento na concentração de glutamato no CPF de ratos após a administração de quetamina, sugerindo que seu efeito ocorreria principalmente sobre os receptores NMDA presentes em interneurônios (Moghaddam *et al.*, 1997; Homayoun e Moghaddam, 2007).

Um efeito preferencial dos antagonistas dos receptores NMDA em interneurônios pode ser explicado pelas propriedades eletrofisiológicas dessas

células. Os receptores NMDA são canais iônicos ativados por ligantes e sensíveis a voltagem, sendo bloqueados pelo Mg^{2+} quando o potencial de membrana está negativo, o que é principalmente observado nas células piramidais em repouso. É necessário uma despolarização significativa (cerca de 20 mV) para remover o bloqueio do Mg^{2+} . Já os interneurônios possuem maior atividade elétrica basal, sendo continuamente despolarizados e, portanto, susceptíveis ao escape do bloqueio pelo Mg^{2+} . Assim, embora os antagonistas dos receptores NMDA possam bloquear todos os receptores NMDA, seu impacto será maior sobre aqueles que estão frequentemente ativos, como os presentes em interneurônios (Tseng e O'Donnell; 2007; O'Donnell, 2011).

Grunze e colaboradores (1996) demonstraram que os interneurônios GABAérgicos são 10 vezes mais sensíveis aos antagonistas dos receptores NMDA do que os neurônios piramidais. Além disso, evidências indicam que uma redução na funcionalidade dos interneurônios parvalbumina-positivos não resultaria apenas em diminuição do controle inibitório sobre as células piramidais, mas também em prejuízo na sincronização da atividade de redes cerebrais mais complexas, resultando, por exemplo, em alterações na regulação da neurotransmissão dopaminérgica (Schwartz *et al.*, 2012). Alterações na expressão de parvalbumina na CPFm induzidas pelo tratamento com MK-801, por conseguinte, podem contribuir para o aumento da atividade neuronal no CPFm e no NAc *core*, refletido no presente estudo pelo aumento do número de células FosB/ Δ FosB-positivas nestas estruturas. Uma observação importante diz respeito ao fato de que a diminuição da imunorreatividade para parvalbumina parece estar associada com uma expressão reduzida da proteína parvalbumina, mas não com a redução no número de interneurônios-parvalbumina positivos (Hashimoto *et al.*, 2003).

Uma redução na expressão de parvalbumina também tem sido observada de forma consistente em uma grande variedade de modelos animais de esquizofrenia (Penschuck *et al.*, 2006; Harte *et al.*, 2007), incluindo o tratamento repetido com outros antagonistas dos receptores NMDA (Abdul-Monim *et al.*, 2007; Amitai *et al.*, 2012). De fato, observações *in vivo* e *in vitro* indicaram que a exposição repetida a quetamina diminuiu a expressão de parvalbumina em interneurônios GABAérgicos no CPF de camundongos (Behrens *et al.*, 2007). A expressão do RNAm para o gene da parvalbumina no CPF foi também diminuída após a administração repetida de fenciclidina em camundongos (Cochran *et al.*, 2003) e em macacos (Morrow *et al.*, 2007). Similar aos resultados observados no presente estudo, Amitai e colaboradores (2012) observaram que o tratamento repetido com clozapina atenuou os déficits cognitivos e a redução na expressão de parvalbumina no CPF induzidos pelo tratamento repetido com fenciclidina. Baseando-se nessas evidências, é possível especular que os efeitos do CBD e da clozapina sobre a atenuação das alterações na expressão de parvalbumina e nos prejuízos observados nos testes de PPI e reconhecimento de objeto induzidos pelo MK-801 podem estar relacionados.

Embora nenhuma alteração no número de células parvalbumina-positivas foi observada no hipocampo de animais submetidos ao tratamento com MK-801, uma densidade reduzida de interneurônios parvalbumina-positivos têm sido observada no hipocampo de pacientes com esquizofrenia (Zhang e Reynolds 2002; Torrey *et al.*, 2005). Estes resultados foram mimetizados pelo tratamento repetido com quetamina em ratos (Keilhoff *et al.*, 2004). As razões para a diferença entre esse e o nosso estudo são desconhecidas, mas podem depender da espécie, da droga e do esquema de tratamento utilizado.

Além dos efeitos sobre a atividade neuronal e sobre a expressão de parvalbumina, algumas evidências sugerem que antagonistas dos receptores NMDA podem induzir danos neuronais e alterar a atividade de células gliais, principalmente de astrócitos e microglia, bem como a expressão dos seus marcadores (Nakki *et al.*, 1995; Nakki *et al.*, 1996). Embora os antagonistas dos receptores NMDA possam modular a proliferação e a morte neuronal (Genius *et al.*, 2012), não foram observadas, no presente estudo, alterações significativas na expressão do marcador neuronal NeuN, sugerindo que as alterações comportamentais e moleculares observadas após a administração repetida de MK-801 não foram devidas a morte ou a proliferação neuronal.

Os astrócitos e a microglia medeiam respostas inflamatórias no SNC. Considerando que alterações nestas células têm sido observadas em pacientes com esquizofrenia, foi postulado um envolvimento de processos neuroinflamatórios na patogênese da esquizofrenia (Schnieder e Dwork, 2011; Monji *et al.*, 2013). De fato, recentemente Fillman e colaboradores (2013) observaram um aumento nos níveis de marcadores inflamatórios no CPF dorsolateral de pacientes com esquizofrenia.

A proteína GFAP, o maior filamento intermediário dos astrócitos, tem sido o marcador de astrócitos mais utilizado em estudos imunoistoquímicos uma vez que ela define a morfologia dos astrócitos e as suas modificações, sendo útil para avaliar a reação astrogliar (Tagliaferro *et al.*, 1997). No presente estudo, os astrócitos foram identificados como células apresentando corpos celulares e prolongamentos expressando GFAP e com morfologia astrocítica clássica.

Os astrócitos desempenham um papel importante na manutenção da função neuronal normal, participando de processos responsáveis pela captação de neurotransmissores, manutenção da homeostase iônica, migração neuronal durante

o desenvolvimento e a síntese, metabolismo e liberação de aminoácidos neuroativos (Bezzi *et al.*, 1999; Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.*, 2011). Já para as células microgliais, foram avaliadas alterações no padrão de expressão da proteína Iba-1, uma proteína de ligação ao cálcio expressa exclusivamente nesse tipo celular. As células microgliais são células imunes residentes do SNC e, desde muito tempo, são reconhecidas pela sua capacidade de detecção ativa de insultos ao SNC (Aguzzi *et al.*, 2013). A microglia é extremamente dinâmica e sua morfologia é representativa da sua função. No SNC saudável, a microglia apresenta morfologia distinta com corpo celular pequeno, arredondado e com numerosas ramificações. Após sua ativação, a microglia pode adotar diferentes fenótipos morfológicos caracterizados por alterações da estrutura celular e redução do comprimento das ramificações ficando com estrutura ameboide em resposta a vários estímulos (Wake *et al.*, 2011). Dependendo do estágio de ativação, as células microgliais podem produzir citocinas pró-inflamatórias e moléculas citotóxicas, que podem induzir apoptose neuronal (Graeber *et al.*, 2011). Assim, enquanto a ativação da microglia é uma resposta imune necessária e benéfica para proteger o SNC de danos, a sua ativação excessiva tem sido associada ao desenvolvimento de inúmeras doenças (Graeber *et al.*, 2011; Aguzzi *et al.*, 2013). Portanto, a inibição destes processos pode resultar em efeitos neuroprotetores.

Evidências sugerem que as alterações neuroinflamatórias observadas na esquizofrenia envolveriam uma função anormal dos astrócitos (Rothermundt *et al.*, 2009; Catts *et al.*, 2014). No entanto, conforme observado para várias outras alterações no cérebro de pacientes com esquizofrenia, os dados disponíveis de estudos que avaliaram a expressão de marcadores astrocíticos são contraditórios, variando desde a ausência de alteração (Hoistad *et al.*, 2013) a uma diminuição

(Rajkowska *et al.*, 2002) ou aumento da expressão desses marcadores (Feresten *et al.*, 2013). Observou-se, no presente estudo, que o tratamento com MK-801 aumentou a expressão de GFAP no CPFm. Um aumento na expressão de GFAP e no número de astrócitos GFAP-positivos são marcadores de astrogliose. No entanto, uma das alterações moleculares observadas em astrócitos reativos é o aumento na expressão de GFAP (Sofroniew e Vinters, 2010), o que torna possível a detecção de astrócitos anteriormente quiescentes, que ficariam abaixo do limite de detecção, por exemplo, em animais controle. Portanto, o aumento no número de células GFAP-positivas no CPFm em resposta ao tratamento com MK-801 poderia também refletir modificações na reatividade dos astrócitos, em vez de alterações em seu número absoluto.

Outro resultado importante do presente estudo foi o aumento na porcentagem de células da microglia Iba-1-positivas com fenótipo reativo no CPFm, giro denteado e CA1 induzido pelo MK-801. Este efeito também foi atenuado pelo CBD e pela clozapina. Estes resultados são consistentes com estudos anteriores que mostraram um aumento da ativação microglial após o antagonismo dos receptores NMDA (Nakki *et al.*, 1995; Nakki *et al.*, 1996; Arif *et al.*, 2007). Similar aos nossos resultados, Ribeiro e colaboradores (2013) mostraram que a administração repetida de clozapina reverteu os déficits cognitivos e a ativação da microglia no hipocampo e CPF observados em um modelo animal de esquizofrenia baseado em alterações no neurodesenvolvimento. Interessantemente, foi observado recentemente que a microglia pode ser importante para mediar ou modular processos inflamatórios no cérebro de pacientes com esquizofrenia.

Embora existam estudos com resultados contraditórios na literatura, a ativação e o aumento da densidade celular da microglia foram observados no

cérebro *postmortem* de pacientes com esquizofrenia (Radewicz *et al.*, 2000). Além disso, estudos de neuroimagem empregando a tomografia por emissão de pósitrons, utilizando o [11C](R)-PK11195 como um marcador *in vivo* de microglia ativada, indicaram um aumento da ativação da microglia no cérebro de pacientes com esquizofrenia (Van Berckel *et al.*, 2008; Doorduyn *et al.*, 2009). Embora não esteja claro como as mudanças na atividade da microglia possam induzir anormalidades que, eventualmente, levam aos sinais e sintomas da esquizofrenia, evidências indicam uma associação entre a ativação da microglia com os sintomas negativos e os déficits cognitivos (Levkovitz *et al.*, 2010; Ribeiro-Santos *et al.*, 2014). Assim, os efeitos protetores do CBD e da clozapina sobre as alterações comportamentais induzidas pelo MK-801 podem estar também relacionados a uma diminuição da ativação da microglia.

De acordo com essa proposta, estudos clínicos realizados com pacientes com esquizofrenia mostraram que a adição de minociclina, uma tetraciclina que tem sido utilizada experimentalmente como um potente inibidor da ativação da microglia, ao tratamento antipsicótico melhorou os sintomas negativos e cognitivos (Levkovitz *et al.*, 2010; Chaudhry *et al.*, 2012). De forma similar, drogas anti-inflamatórias, tais como o celecoxibe e a aspirina, quando administradas como terapia adjuvante ao tratamento antipsicótico, resultaram em melhor resposta terapêutica na atenuação dos sintomas negativos quando comparada ao tratamento apenas com antipsicóticos (Laan *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2010). Além disso, estudos *in vitro* indicaram um possível efeito anti-inflamatório induzido por antipsicóticos atípicos por meio da inibição da microglia ativada (Bian *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2012). Neste contexto, evidências indicam que o CBD também induz efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores. De fato, o CBD atenuou o aumento da expressão de fatores que

contribuem em processos neuroinflamatórios, como a proteína GFAP, a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOs) e a citocina pró-inflamatória interleucina-1 β , em um modelo animal de doença de Alzheimer (Esposito *et al.*, 2007). Além disso, o efeito do CBD em atenuar os prejuízos cognitivos em um modelo animal de doença de Alzheimer foi associado com uma redução na ativação da microglia e nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Martin-Moreno *et al.*, 2011). Adicionalmente, similar aos nossos resultados, os efeitos benéficos do CBD sobre os prejuízos comportamentais, a ativação da microglia e o aumento da expressão de GFAP foram observados em modelos animais de esclerose múltipla e isquemia cerebral (Mecha *et al.*, 2013; Schiavon *et al.*, 2014).

Outra possível explicação para o aumento no número de células GFAP-positivas no CPFm induzido pelo MK-801 pode estar relacionado a diminuição da expressão de parvalbumina, que foi também observada nessa estrutura em animais tratados com MK-801. Como discutido anteriormente, várias são as evidências indicando que uma redução na expressão de parvalbumina resultaria em hipofunção de interneurônios GABAérgicos parvalbumina-positivos, fato que poderia levar ao aumento nas concentrações de glutamato devido ao prejuízo no controle da atividade das células piramidais exercido por esses interneurônios, resultando então em desinibição das células piramidais e, por consequência, aumento da liberação de glutamato (Nakazawa *et al.*, 2012). Uma vez que os astrócitos desempenham um papel importante na manutenção homeostática do conteúdo extracelular de glutamato (Bezzi *et al.*, 1999), um aumento no número destas células no CPFm poderia atuar como um mecanismo compensatório para normalizar a concentração potencialmente aumentada de glutamato induzidos pelo tratamento com MK-801 nesta estrutura. Portanto, o efeito do CBD e da clozapina atenuando o aumento da

expressão de GFAP induzida pelo MK-801 poderia ser indireto, ou seja, ocorreria devido à atenuação da diminuição na expressão de parvalbumina no CPFm induzida pelo tratamento pelo MK-801. Entretanto, esta possibilidade necessita ser investigada. Assim, estudos são necessários para avaliar se alterações gliais na esquizofrenia representam déficits gliais primários ou uma resposta secundária a alterações na função neuronal.

Enquanto uma ativação da microglia induzida pelo tratamento repetido com MK-801 foi observada na CPFm, GD e CA1, uma reação astrogliar, indicada pelo aumento do número de células GFAP-positivas, foi observada apenas no CPFm. O significado dessa diferença não é conhecido, mas pode estar relacionado com a diminuição na expressão de parvalbumina no CPFm, alteração que não foi observada no hipocampo.

Como já discutido, uma diminuição na expressão de parvalbumina pode resultar em alterações nas neurotransmissões GABAérgica e glutamatérgica. Além disso, uma ativação microglial parece preceder as alterações fenotípicas nos astrócitos (Tilleux e Hermans, 2007). No entanto, como sugerido por Xia e colaboradores (2014), devido a heterogeneidade de astrócitos no SNC, manipulações em tipos astrocíticos e circuitos específicos são necessárias para se obter uma melhor compreensão do papel destas células em transtornos neuropsiquiátricos. Por exemplo, Oberheim e colaboradores (2012) observaram que o aumento dos níveis de cálcio intracelular em astrócitos corticais foi induzido pelo glutamato e noradrenalina, enquanto que astrócitos hipocámpais tiveram aumento do cálcio intracelular em resposta ao ATP, GABA, acetilcolina e endocanabinóides. Estes dados sugerem que vários neurotransmissores podem afetar diferentemente astrócitos presentes no córtex e hipocampo. Além disso, também foram observadas

diferenças entre as regiões cerebrais após a exposição a outras drogas psicotomiméticos, como a cocaína. Por exemplo, enquanto um aumento do número de células GFAP-positivas foi observado no estriado e hipocampo de ratos após a administração aguda de cocaína, aumento do número de células Iba-1-positivas foi observado apenas no hipocampo (Blanco-Calvo *et al.*, 2014). Além disso, não há projeções diretas do CPFm para o hipocampo em roedores (Hoover e Vertes, 2007; Verwer *et al.*, 1997), tornando improvável que semelhanças ou diferenças nas alterações induzidas pelo MK-801 sejam devido a interações diretas entre essas regiões. Elas podem envolver, entretanto, diferenças funcionais ou estruturais entre os neurônios presentes nessas duas regiões.

Mesmo que alterações na expressão de RNAm sejam difíceis de serem interpretadas na ausência de informação sobre a expressão da proteína correspondente, os nossos resultados também indicaram que o antagonismo crônico dos receptores NMDA diminuiu a expressão do RNAm do gene da subunidade obrigatória GluN1 do receptor NMDA. Alterações na expressão do RNAm para este gene já foram relatadas no cérebro *postmortem* de pacientes com esquizofrenia (Gao *et al.*, 2000; Law e Deakin, 2001; Weickert *et al.*, 2013). Poucos estudos, entretanto, têm investigado os efeitos do tratamento repetido com antagonistas dos receptores NMDA sobre essas alterações. No nosso estudo, o tratamento repetido com MK-801 diminuiu a expressão do RNAm para o gene da subunidade GluN1 no hipocampo, um efeito que também foi atenuado pelo CBD e pela clozapina. Nenhuma alteração no córtex frontal e no estriado foi observada.

Ainda que resultados contraditórios existam na literatura (Rujescu *et al.*, 2006), a diminuição na expressão do RNAm para o gene da subunidade GluN1 tem sido consistentemente relatada (Gao *et al.*, 2000; Law e Deakin, 2001).

Adicionalmente, um estudo empregando tomografia por emissão de fóton único com um ligante para os receptores NMDA revelou que pacientes com esquizofrenia sem tratamento com antipsicóticos apresentaram menor quantidade do ligante para os receptores NMDA no hipocampo esquerdo, indicando uma redução na densidade desse receptor nessa estrutura. Essa redução não foi observada em pacientes que estavam sendo tratados com clozapina, sendo ainda observada uma correlação inversa entre a quantidade do ligante dos receptores NMDA no hipocampo esquerdo com os sintomas negativos (Pilowsky *et al.*, 2006). E, recentemente, foi observado que a deleção da subunidade GluN1 no hipocampo de camundongos resultou em diminuição da interação social e em prejuízos cognitivos (Finlay *et al.*, 2014).

Embora o presente trabalho não tenha explorado os possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos do CBD, estudos anteriores indicaram que os efeitos tipo-antipsicóticos do CBD poderiam ser mediados pela inibição da FAAH (Leweke *et al.*, 2012) e a ativação dos receptores TRPV1 (Long *et al.*, 2006). A facilitação da neurotransmissão mediada por receptores CB1 pelo CBD aumenta a neurogênese no hipocampo (Wolf *et al.*, 2010), um mecanismo que poderia estar relacionado com um possível efeito benéfico do CBD sobre a atenuação dos déficits cognitivos observados em pacientes com esquizofrenia. Também foi observado que a ativação de receptores PPAR γ pelo CBD estimulou a neurogênese hipocampal, bem como inibiu a astrogliose em um modelo animal de doença de Alzheimer (Esposito *et al.*, 2011). Outros mecanismos que também ajudariam a explicar as propriedades antipsicóticos do CBD são a facilitação da neurotransmissão mediada pelos receptores 5-HT $1A$ (Russo *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2011), bem como as propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras do CBD (Campos *et al.*, 2012). O CBD também pode inibir a captação de adenosina (Carrier *et al.*, 2006) e modular

alostericamente a atividade dos receptores 5-HT₃ (Yang *et al.*, 2010) e μ - e δ -opioides (Kathmann *et al.*, 2006). Entretanto, o envolvimento desses mecanismos nas propriedades antipsicóticas do tratamento repetido com CBD permanece sem ser testado.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo indicam que a administração repetida do antagonista dos receptores NMDA MK-801 parece ser um modelo animal útil para o estudo da neurobiologia da esquizofrenia e avaliação do efeito de drogas com propriedades antipsicóticas, uma vez que o mesmo induziu alterações comportamentais e moleculares, de certa forma, similares às aquelas observadas em pacientes com esquizofrenia. Adicionalmente, o tratamento repetido com CBD, de forma semelhante ao observado para o tratamento com o antipsicótico atípico clozapina, foi capaz de atenuar tanto as alterações comportamentais como as alterações moleculares induzidas pelo tratamento com MK-801. Estes resultados são consistentes com a proposta de que o CBD possui propriedades antipsicóticas. E, embora o possível mecanismo de ação destes efeitos não seja conhecido, ele poderia envolver as propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras desse composto. Além disso, nossos dados também suportam a visão de que a inibição da ativação da microglia possa melhorar os sintomas da esquizofrenia.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-MONIM, Z.; NEILL, J. C.; REYNOLDS, G. P. Sub-chronic psychotomimetic phencyclidine induces deficits in reversal learning and alterations in parvalbumin-immunoreactive expression in the rat. J Psychopharmacol, v. 21, n. 2, p. 198-205, 2007.

ADAD, M. A.; CASTRO, R.; MATTOS, P. Aspectos neuropsicológicos da esquizofrenia. Rev Bras Psiquiatr, v. 22, suppl. 1, p. 31-34, 2000.

ADAMS, B.; MOGHADDAM, B. Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. J Neurosci, v. 18, n. 14, p. 5545-54, 1998.

AGUZZI, A.; BARRES, B. A.; BENNETT, M. L. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? Science, v. 339, n. 6116, p. 156-61, 2013.

AKBARIAN, S.; SUCHER, N. J.; BRADLEY, D.; TAFAZZOLI, A.; TRINH, D.; HETRICK, W. P.; et al. Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics. J Neurosci, v. 16, n. 1, p. 19-30, 1996.

AMITAI, N.; KUCZENSKI, R.; BEHRENS, M. M.; MARKOU, A. Repeated phencyclidine administration alters glutamate release and decreases GABA markers in the prefrontal cortex of rats. Neuropharmacology, v. 62, n. 3, p. 1422-31, 2012.

ANDREASEN, N. C. Symptoms, signs, and diagnosis of schizophrenia. Lancet, v. 346, n. 8973, p. 477-81, 1995.

ARIF, M.; CHIKUMA, T.; AHMED, M. M.; YOSHIDA, S.; KATO, T. Suppressive effect of clozapine but not haloperidol on the increases of neuropeptide-degrading enzymes and glial cells in MK-801-treated rat brain regions. Neurosci Res, v. 57, n. 2, p. 248-58, 2007.

ARSENEAULT, L.; CANNON, M.; WITTON, J.; MURRAY, R. M. Causal association between cannabis and psychosis: examination of the evidence. Br J Psychiatry, v. 184, p. 110-7, 2004.

ATKINS, J. B.; CHLAN-FOURNEY, J.; NYE, H. E.; HIROI, N.; CARLEZON, W. A., JR.; NESTLER, E. J. Region-specific induction of deltaFosB by repeated administration of typical versus atypical antipsychotic drugs. Synapse, v. 33, n. 2, p. 118-28, 1999.

BARTOS, M.; VIDA, I.; JONAS, P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. Nat Rev Neurosci, v. 8, n. 1, p. 45-56, 2007.

BEASLEY, C. L.; REYNOLDS, G. P. Parvalbumin-immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics. Schizophr Res, v. 24, n. 3, p. 349-55, 1997.

BEHRENS, M. M.; ALI, S. S.; DAO, D. N.; LUCERO, J.; SHEKHTMAN, G.; QUICK, K. L.; et al. Ketamine-induced loss of phenotype of fast-spiking interneurons is mediated by NADPH-oxidase. Science, v. 318, n. 5856, p. 1645-7, 2007.

BEHRENS, M. M.; ALI, S. S.; DUGAN, L. L. Interleukin-6 mediates the increase in NADPH oxidase in the ketamine model of schizophrenia. J Neurosci, v. 28, n. 51, 13957-66, 2008.

BELFORTE, J. E.; ZSIROS, V.; SKLAR, E. R.; JIANG, Z.; YU, G.; LI, Y.; QUINLAN, E. M.; et al. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. Nat Neurosci, v. 13, n. 1, p. 76-83, 2010.

BERNSTEIN, H. G.; STEINER, J.; GUEST, P. C.; DOBROWOLNY, H.; BOGERTS, B. Glial cells as key players in schizophrenia pathology: recent insights and concepts of therapy. Schizophr Res, v. 161, n. 1, p. 4-18, 2015.

BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. Nat Protoc, v. 1, n. 3, p. 1306-11, 2006.

BEZZI, P.; VESCE, S.; PANZARASA, P.; VOLTERRA, A. Astrocytes as active participants of glutamatergic function and regulators of its homeostasis. Adv Exp Med Biol, v. 468, p. 69-80, 1999.

BHATTACHARYYA, S.; CRIPPA, J. A.; ALLEN, P.; MARTIN-SANTOS, R.; BORGWARDT, S.; FUSAR-POLI, P.; et al. Induction of psychosis by Delta9-tetrahydrocannabinol reflects modulation of prefrontal and striatal function during attentional salience processing. Arch Gen Psychiatry, v. 69, n. 1, p. 27-36, 2012.

BHATTACHARYYA, S.; FUSAR-POLI, P.; BORGWARDT, S.; MARTIN-SANTOS, R.; NOSARTI, C.; O'CARROLL, C.; et al. Modulation of mediotemporal and ventrostriatal function in humans by Delta9-tetrahydrocannabinol: a neural basis for the effects of Cannabis sativa on learning and psychosis. Arch Gen Psychiatry, v. 66, n. 4, p. 442-51, 2009.

BHATTACHARYYA, S.; MORRISON, P. D.; FUSAR-POLI, P.; MARTIN-SANTOS, R.; BORGWARDT, S.; WINTON-BROWN, T.; et al. Opposite effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human brain function and psychopathology. Neuropsychopharmacology, v. 35, n. 3, p. 764-74, 2010.

BIAN, Q.; KATO, T.; MONJI, A.; HASHIOKA, S.; MIZOGUCHI, Y.; HORIKAWA, H.; et al. The effect of atypical antipsychotics, perospirone, ziprasidone and quetiapine on microglial activation induced by interferon-gamma. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v. 32, n. 1, p. 42-8, 2008.

BLANCO-CALVO, E., RIVERA, P., ARRABAL, S., VARGAS, A., PAVON, F. J., SERRANO, A., et al. Pharmacological blockade of either cannabinoid CB₁ or CB₂ receptors prevents both cocaine-induced conditioned locomotion and cocaine-induced reduction of cell proliferation in the hippocampus of adult male rat. Front Integr Neurosci, v. 7, 106, 2014.

BLUMENTHAL, T. D. Inhibition of the human startle response is affected by both prepulse intensity and eliciting stimulus intensity. Biol Psychol, v. 44, n. 2, p. 85-104, 1996.

BLUMENTHAL, T. D.; LEVEY, B. J. Prepulse rise time and startle reflex modification: different effects for discrete and continuous prepulses. Psychophysiology, v. 26, n. 2, p. 158-65, 1989.

BORGWARDT, S. J.; ALLEN, P.; BHATTACHARYYA, S.; FUSAR-POLI, P.; CRIPPA, J. A.; SEAL, M. L.; et al. Neural basis of Delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol: effects during response inhibition. Biol Psychiatry, v. 64, n. 11, p. 966-73, 2008.

BRAFF, D. L.; GEYER, M. A. Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies. Arch Gen Psychiatry, v. 47, n. 2, p. 181-188, 1990.

BRAFF, D. L.; GEYER, M. A.; LIGHT, G. A.; SPROCK, J.; PERRY, W.; CADENHEAD, K. S.; et al. Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. Schizophr Res, v. 49, n. 1-2, p. 171-178, 2001a.

BRAFF, D. L.; GEYER, M. A.; SWERDLOW, N. R. Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. Psychopharmacology (Berl), v. 156, n. 2-3, p. 234-258, 2001b.

BRAFF, D. L.; GRILLON, C.; GEYER, M. A. Gating and habituation of the startle reflex in schizophrenic patients. Arch Gen Psychiatry, v. 49, n. 3, p. 206-15, 1992.

BREIER, A.; MALHOTRA, A. K.; PINALS, D. A.; WEISENFELD, N. I.; PICKAR, D. Association of ketamine-induced psychosis with focal activation of the prefrontal cortex in healthy volunteers. Am J Psychiatry, v. 154, n. 6, p. 805-11, 1997.

BUBENIKOVA-VALESOVA, V.; HORACEK, J.; VRAJOVA, M.; HOSCHL, C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. Neurosci Biobehav Rev, v. 32, n. 5, p. 1014-23, 2008.

BUBSER, M.; DEUTCH, A. Y. Differential effects of typical and atypical antipsychotic drugs on striosome and matrix compartments of the striatum. Eur J Neurosci, v. 15, n. 4, p. 713-20, 2002.

CAMPOS, A. C.; MOREIRA, F. A.; GOMES, F. V.; DEL BEL, E. A.; GUIMARAES, F. S. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, v. 367, n. 1607, p. 3364-78, 2012.

CARLINI, E. A.; CUNHA, J. M. Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. J Clin Pharmacol, v. 21, n. 8-9 Suppl, p. 417S-427S, 1981.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. Neurosci Biobehav Rev, v. 29, n. 8, p. 1193-205, 2005.

CARRIER, E. J.; AUCHAMPACH, J. A.; HILLARD, C. J. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 103, n. 20, p. 7895-900, 2006.

CASAROTTO, P. C.; GOMES, F. V.; RESSEL, L. B.; GUIMARAES, F. S. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. Behav Pharmacol, v. 21, n. 4, p. 353-8, 2010.

CATTS, V. S.; WONG, J.; FILLMAN, S. G.; FUNG, S. J.; SHANNON WEICKERT, C. Increased expression of astrocyte markers in schizophrenia: Association with neuroinflammation. Aust N Z J Psychiatry, v. 48, n. 8, p. 722-734, 2014.

CHAUDHRY, I. B.; HALLAK, J.; HUSAIN, N.; MINHAS, F.; STIRLING, J.; RICHARDSON, et al. Minocycline benefits negative symptoms in early schizophrenia: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial in patients on standard treatment. J Psychopharmacol, v. 26, n. 9, p. 1185-93, 2012.

COCHRAN, S. M.; KENNEDY, M.; MCKERCHAR, C. E.; STEWARD, L. J.; PRATT, J. A.; MORRIS, B. J. Induction of metabolic hypofunction and neurochemical deficits after chronic intermittent exposure to phencyclidine: differential modulation by antipsychotic drugs. Neuropsychopharmacology, v. 28, n. 2, p. 265-75, 2003.

COYLE, J. T.; TSAI, G.; GOFF, D. Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. Ann N Y Acad Sci, v. 1003, p. 318-27, 2003.

CRIPPA, J. A.; ZUARDI, A. W.; GARRIDO, G. E.; WICHERT-ANA, L.; GUARNIERI, R.; FERRARI, L.; et al. Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. Neuropsychopharmacology, v. 29, n. 2, p. 417-26, 2004.

CUNHA, J. M.; CARLINI, E. A.; PEREIRA, A. E.; RAMOS, O. L.; PIMENTEL, C.; GAGLIARDI, R.; et al. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. Pharmacology, v. 21, n. 3, p. 175-85, 1980.

CURZON, P.; DECKER, M. W. Effects of phencyclidine (PCP) and (+)MK-801 on sensorimotor gating in CD-1 mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v. 22, n. 1, p. 129-46, 1998.

DALTON, W. S.; MARTZ, R.; LEMBERGER, L.; RODDA, B. E.; FORNEY, R. B. Influence of cannabidiol on delta-9-tetrahydrocannabinol effects. Clin Pharmacol Ther, v. 19, n. 3, p. 300-9, 1976.

DAVIES, L. M.; LEWIS, S.; JONES, P. B.; BARNES, T. R.; GAUGHRAN, F.; HAYHURST, et al. Cost-effectiveness of first- v. second-generation antipsychotic drugs: results from a randomised controlled trial in schizophrenia responding poorly to previous therapy. Br J Psychiatry, v. 191, p. 14-22, 2007.

DAVIS, K. L.; KAHN, R. S.; KO, G.; DAVIDSON, M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. Am J Psychiatry, v. 148, n. 11, p. 1474-86, 1991.

DEVANE, W. A.; DYSARZ, F. A., 3RD; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; HOWLETT, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Mol Pharmacol, v. 34, n. 5, p. 605-13, 1988.

DEVANE, W. A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R. G.; STEVENSON, L. A.; GRIFFIN, G.; et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science, v. 258, n. 5090, p. 1946-9, 1992.

DIETZ, D. M.; KENNEDY, P. J.; SUN, H.; MAZE, I.; GANCARZ, A. M.; VIALOU, V.; et al. DeltaFosB induction in prefrontal cortex by antipsychotic drugs is associated with negative behavioral outcomes. Neuropsychopharmacology, v. 39, n. 3, p. 538-44, 2014.

DINGLELINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S. F. The glutamate receptor ion channels. Pharmacol Rev, v. 51, n. 1, p. 7-61, 1999.

DIZ-CHAVES, Y.; PERNIA, O.; CARRERO, P.; GARCIA-SEGURA, L. M. Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. J Neuroinflammation, v. 9, p. 71, 2012.

DOORDUIN, J.; DE VRIES, E. F.; WILLEMSSEN, A. T.; DE GROOT, J. C.; DIERCKX, R. A.; KLEIN, H. C. Neuroinflammation in schizophrenia-related psychosis: a PET study. J Nucl Med, v. 50, n. 11, p. 1801-7, 2009.

DRACHEVA, S.; MARRAS, S. A.; ELHAKEM, S. L.; KRAMER, F. R.; DAVIS, K. L.; HAROUTUNIAN, V. N-methyl-D-aspartic acid receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. Am J Psychiatry, v. 158, n. 9, p. 1400-10, 2001.

D'SOUZA, D. C.; ABI-SAAB, W. M.; MADONICK, S.; FORSELIUS-BIELEN, K.; DOERSCH, A.; BRALEY, G.; et al. Delta-9-tetrahydrocannabinol effects in schizophrenia: implications for cognition, psychosis, and addiction. Biol Psychiatry, v. 57, n. 6, p. 594-608, 2005.

D'SOUZA, D. C.; PERRY, E.; MCDUGALL, L.; AMMERMAN, Y.; COOPER, T.; WU, Y. T.; et al. The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. Neuropsychopharmacology, v. 29, n. 8, p. 1558-72, 2004.

DUNCAN, G. E.; LEIPZIG, J. N.; MAILMAN, R. B.; LIEBERMAN, J. A. Differential effects of clozapine and haloperidol on ketamine-induced brain metabolic activation. Brain Res, v. 812, n. 1-2, p. 65-75, 1998.

DUNCAN, G. E.; SHEITMAN, B. B.; LIEBERMAN, J. A. An integrated view of pathophysiological models of schizophrenia. Brain Res Brain Res Rev, v. 29, n. 2-3, p. 250-64, 1999.

DUNN, R. W.; CORBETT, R.; FIELDING, S. Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and the elevated plus maze. Eur J Pharmacol, v. 169, n. 1, p. 1-10, 1989.

ELHARDT, M.; MARTINEZ, L.; TEJADA-SIMON, M. V. Neurochemical, behavioral and architectural changes after chronic inactivation of NMDA receptors in mice. Neurosci Lett, v. 468, n. 2, p. 166-71, 2010.

ELLENBROEK, B. A.; COOLS, A. R. Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. Behav Pharmacol, v. 11, n. 3-4, p. 223-33, 2000.

ELVEVAG, B.; GOLDBERG, T. E. Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. Crit Rev Neurobiol, v. 14, n. 1, p. 1-21, 2000.

ESPOSITO, G.; SCUDERI, C.; SAVANI, C.; STEARDO, L. JR.; DE FILIPPIS, D.; COTTONE, P., et al. Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1 β and iNOS expression. Br J Pharmacol, v. 151, n. 8, p. 1272-1279, 2007.

ESPOSITO, G.; SCUDERI, C.; VALENZA, M.; TOGNA, G. I.; LATINA, V.; DE FILIPPIS, et al. Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. PLoS One, v. 6, n. 12, p. e28668, 2011.

FERESTEN, A. H.; BARAKAUSKAS, V.; YPSILANTI, A.; BARR, A. M.; BEASLEY, C. L. Increased expression of glial fibrillary acidic protein in prefrontal cortex in psychotic illness. Schizophr Res, v. 150, n. 1, p. 252-7, 2013.

FILLMAN, S. G.; CLOONAN, N.; CATTS, V. S.; MILLER, L. C.; WONG, J.; MCCROSSIN, T.; et al. Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. Mol Psychiatry, v. 18, n. 2, p. 206-14, 2013.

FINLAY, J. M.; DUNHAM, G. A.; ISHERWOOD, A. M.; NEWTON, C. J.; NGUYEN, T. V.; REPPAR, P. C.; et al. Effects of prefrontal cortex and hippocampal NMDA NR1-subunit deletion on complex cognitive and social behaviors. Brain Res, 2014. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.037

FUSAR-POLI, P.; ALLEN, P.; BHATTACHARYYA, S.; CRIPPA, J. A.; MECHELLI, A.; BORGWARDT, S.; et al. Modulation of effective connectivity during emotional processing by Delta 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. Int J Neuropsychopharmacol, v. 13, n. 4, p. 421-32, 2010.

GAO, X. M.; SAKAI, K.; ROBERTS, R. C.; CONLEY, R. R.; DEAN, B.; TAMMINGA, C. A. Ionotropic glutamate receptors and expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in subregions of human hippocampus: effects of schizophrenia. Am J Psychiatry, v. 157, n. 7, p. 1141-9, 2000.

GAONI, Y.; MECOULAM, R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. J Am Chem Soc, v. 86, p. 1646-1647, 1964.

GENIUS, J.; BENNINGHOFF, J.; REUTER, N.; BRAUN, I.; GIEGLING, I.; HARTMANN, A.; et al. Dysequilibrium of neuronal proliferation and apoptosis in a pharmacological animal model of psychosis. Methods, v. 56, n. 4, p. 519-27, 2012.

GEYER, M. A.; KREBS-THOMSON, K.; BRAFF, D. L.; SWERDLOW, N. R. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. Psychopharmacology (Berl), v. 156, n. 2-3, p. 117-54, 2001.

GOMES, F. V.; DEL BEL, E. A.; GUIMARAES, F. S. Cannabidiol attenuates catalepsy induced by distinct pharmacological mechanisms via 5-HT1A receptor activation in mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v. 46, p. 43-7, 2013.

GOMES, F. V.; RESSEL, L. B.; GUIMARAES, F. S. The anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis are mediated by 5-HT1A receptors. Psychopharmacology (Berl), v. 213, n. 2-3, p. 465-73, 2011.

GONZALEZ-BURGOS, G.; LEWIS, D. A. NMDA receptor hypofunction, parvalbumin-positive neurons, and cortical gamma oscillations in schizophrenia. Schizophr Bull, v. 38, n. 5, p. 950-7, 2012.

GOUDRIAAN, A.; DE LEEUW, C.; RIPKE, S.; HULTMAN, C. M.; SKLAR, P.; SULLIVAN, P. F.; et al. Specific glial functions contribute to schizophrenia susceptibility. Schizophr Bull, v. 40, n. 4, p. 925-35, 2014.

GRAEBER, M. B.; LI, W.; RODRIGUEZ, M. L. Role of microglia in CNS inflammation. FEBS Lett, v. 585, n. 23, p. 3798-805, 2011.

GRAHAM, F. K. The more or less startling effects of weak prestimulation. Psychophysiology, v. 12, n. 3, p. 238-248, 1975.

GRANDE, C.; ZHU, H.; MARTIN, A. B.; LEE, M.; ORTIZ, O.; HIROI, N.; et al. Chronic treatment with atypical neuroleptics induces striosomal FosB/DeltaFosB expression in rats. Biol Psychiatry, v. 55, n. 5, p. 457-63, 2004.

GREEN, M. F. What are the functional consequences of neurocognitive deficits in schizophrenia? Am J Psychiatry, v. 153, n. 3, p. 321-30, 1996.

GRUNZE, H. C.; RAINNIE, D. G.; HASSELMO, M. E.; BARKAI, E.; HEARN, E. F.; MCCARLEY, R. W.; et al. NMDA-dependent modulation of CA1 local circuit inhibition. J Neurosci, v. 16, n. 6, p. 2034-43, 1996.

GUIDALI, C.; VIGANO, D.; PETROSINO, S.; ZAMBERLETTI, E.; REALINI, N.; BINELLI, G.; et al. Cannabinoid CB1 receptor antagonism prevents neurochemical and behavioural deficits induced by chronic phencyclidine. Int J Neuropsychopharmacol, v. 14, n. 1, p. 17-28, 2011.

GUIMARAES, F. S.; CHIARETTI, T. M.; GRAEFF, F. G.; ZUARDI, A. W. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. Psychopharmacology (Berl), v. 100, n. 4, p. 558-9, 1990.

GUIMARÃES, F. S.; MOREIRA, F. A.; ZUARDI, A. W. Medicamentos antipsicóticos. In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. (Ed.). *Fundamentos de Psicofarmacologia*. 2ª edição. São Paulo: Atheneu, 2012. p. 93-120.

GUIMARAES, V. M.; ZUARDI, A. W.; DEL BEL, E. A.; GUIMARAES, F. S. Cannabidiol increases Fos expression in the nucleus accumbens but not in the dorsal striatum. Life Sci, v. 75, n. 5, p. 633-8, 2004.

GURURAJAN, A.; TAYLOR, D. A.; MALONE, D. T. Effect of cannabidiol in a MK-801-rodent model of aspects of schizophrenia. Behav Brain Res, v. 222, n. 2, p. 299-308, 2011.

HALL, W.; DEGENHARDT, L. Cannabis use and the risk of developing a psychotic disorder. World Psychiatry, v. 7, n. 2, p. 68-71, 2008.

HALLAK, J. E.; DURSUN, S. M.; BOSI, D. C.; DE MACEDO, L. R.; MACHADO-DE-SOUSA, J. P.; ABRAO, J.; et al. The interplay of cannabinoid and NMDA glutamate receptor systems in humans: preliminary evidence of interactive effects of cannabidiol and ketamine in healthy human subjects. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v. 35, n. 1, p. 198-202, 2011.

HALLAK, J. E.; MACHADO-DE-SOUSA, J. P.; CRIPPA, J. A.; SANCHES, R. F.; TRZESNIAK, C.; CHAVES, C.; et al. Performance of schizophrenic patients in the Stroop Color Word Test and electrodermal responsiveness after acute administration of cannabidiol (CBD). Rev Bras Psiquiatr, v. 32, n. 1, p. 56-61, 2010.

HAMPSON, A. J.; GRIMALDI, M.; AXELROD, J.; WINK, D. Cannabidiol and (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 95, n. 14, p. 8268-73, 1998.

HANSON, E.; HEALEY, K.; WOLF, D.; KOHLER, C. Assessment of pharmacotherapy for negative symptoms of schizophrenia. Curr Psychiatry Rep, v. 12, n. 6, p. 563-71, 2010.

HARTE, M. K.; POWELL, S. B.; SWERDLOW, N. R.; GEYER, M. A.; REYNOLDS, G. P. Deficits in parvalbumin and calbindin immunoreactive cells in the hippocampus of isolation reared rats. J Neural Transm, v. 114, n. 7, p. 893-8, 2007.

HASHIMOTO, K.; FUJITA, Y.; SHIMIZU, E.; IYO, M. Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of clozapine, but not haloperidol. Eur J Pharmacol, v. 519, n. 1-2, p. 114-7, 2005.

HASHIMOTO, T.; VOLK, D. W.; EGGAN, S. M.; MIRNICS, K.; PIERRI, J. N.; SUN, Z.; et al. Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. J Neurosci, v. 23, n. 15, p. 6315-26, 2003.

HERKENHAM, M. Characterization and localization of cannabinoid receptors in brain: an in vitro technique using slide-mounted tissue sections. NIDA Res Monogr, v. 112, p. 129-45, 1991.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; DE COSTA, B. R.; RICHFIELD, E. K. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. Brain Res, v. 547, n. 2, p. 267-74, 1991.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; LITTLE, M. D.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; DE COSTA, B. R.; et al. Cannabinoid receptor localization in brain. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 87, n. 5, p. 1932-6, 1990.

HIGLEY, M. J., PICCIOTTO, M. R. Neuromodulation by acetylcholine: examples from schizophrenia and depression. Curr Opin Neurobiol, v. 29, p. 88-95, 2014.

HIROI, N.; GRAYBIEL, A. M. Atypical and typical neuroleptic treatments induce distinct programs of transcription factor expression in the striatum. J Comp Neurol, v. 374, n. 1, p. 70-83, 1996.

HOISTAD, M.; HEINSEN, H.; WICINSKI, B.; SCHMITZ, C.; HOF, P. R. Stereological assessment of the dorsal anterior cingulate cortex in schizophrenia: absence of changes in neuronal and glial densities. Neuropathol Appl Neurobiol, v. 39, n. 4, p. 348-61, 2013.

HOLLMANN, M.; BOULTER, J.; MARON, C.; HEINEMANN, S. Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc. Ren Physiol Biochem, v. 17, n. 3-4, p. 182-3, 1994.

HOOVER, W. B., VERTES, R. P. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. Brain Struct Funct, v. 212, n. 2, p. 149-179, 2007.

HOMAYOUN, H., MOGHADDAM, B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. J Neurosci, v. 27, n. 43, p.11496–500, 2007.

HU, X.; ZHOU, H.; ZHANG, D.; YANG, S.; QIAN, L.; WU, H. M.; et al. Clozapine protects dopaminergic neurons from inflammation-induced damage by inhibiting microglial overactivation. J Neuroimmune Pharmacol, v. 7, n. 1, p. 187-201, 2012.

HUNT, C. A.; JONES, R. T.; HERNING, R. I.; BACHMAN, J. Evidence that cannabidiol does not significantly alter the pharmacokinetics of tetrahydrocannabinol in man. J Pharmacokinet Biopharm, v. 9, n. 3, p. 245-60, 1981.

HUTCHISON, K. E.; SWIFT, R. Effect of d-amphetamine on prepulse inhibition of the startle reflex in humans. Psychopharmacology (Berl), v. 143, n. 4, p. 394-400, 1999.

INSEL, T. R. Translating scientific opportunity into public health impact: a strategic plan for research on mental illness. Arch Gen Psychiatry, v. 66, n. 2, p. 128-33, 2009.

ISSY, A. C.; SALUM, C.; DEL BEL, E. A. Nitric oxide modulation of methylphenidate-induced disruption of prepulse inhibition in Swiss mice. Behav Brain Res, v. 205, n. 2, p. 475-81, 2009.

IUVONE, T.; ESPOSITO, G.; DE FILIPPIS, D.; SCUDERI, C.; STEARDO, L. Cannabidiol: a promising drug for neurodegenerative disorders? CNS Neurosci Ther, v. 15, n. 1, p. 65-75, 2009.

JAVITT, D. C. Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. Int Rev Neurobiol, v. 78, p. 69-108, 2007.

JAVITT, D. C.; ZUKIN, S. R. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. Am J Psychiatry, v. 148, n. 10, p. 1301-8, 1991.

JENTSCH, J. D.; REDMOND, D. E., JR.; ELSWORTH, J. D.; TAYLOR, J. R.; YOUNGREN, K. D.; ROTH, R. H. Enduring cognitive deficits and cortical dopamine dysfunction in monkeys after long-term administration of phencyclidine. Science, v. 277, n. 5328, p. 953-5, 1997.

JENTSCH, J. D.; ROTH, R. H. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. Neuropsychopharmacology, v. 20, n. 3, p. 201-25, 1999.

JENTSCH, J. D., TAYLOR, J. R., ROTH, R. H. Subchronic phencyclidine administration increases mesolimbic dopaminergic system responsivity and augments stress- and psychostimulant-induced hyperlocomotion. Neuropsychopharmacology, v. 19, n. 2, p. 105-113, 1998.

JIANG, Z.; ROMPALA, G. R.; ZHANG, S.; COWELL, R. M.; NAKAZAWA, K. 2013. Social isolation exacerbates schizophrenia-like phenotypes via oxidative stress in cortical interneurons. Biol Psychiatry, v. 73, n. 10, 1024-34, 2013.

JODO, E.; SUZUKI, Y.; KATAYAMA, T.; HOSHINO, K. Y.; TAKEUCHI, S.; NIWA, S.; KAYAMA, Y. Activation of medial prefrontal cortex by phencyclidine is mediated via a hippocampo-prefrontal pathway. Cereb Cortex, v. 15, n. 5, p. 663-9, 2005.

JONES, P. B.; BUCKLEY, P. F. *Schizophrenia*. Elsevier, 2006. 167p.

JORDAN, S.; KOPRIVICA, V.; CHEN, R.; TOTTORI, K.; KIKUCHI, T.; ALTAR, C. A. The antipsychotic aripiprazole is a potent, partial agonist at the human 5-HT1A receptor. Eur J Pharmacol, v. 441, n. 3, p. 137-40, 2002.

JUCKEL, G. Serotonin: From sensory processing to schizophrenia using an electrophysiological method. Behav Brain Res, v. 277, p. 121-124, 2015.

KARNIOL, I. G.; CARLINI, E. A. Pharmacological interaction between cannabidiol and delta 9-tetrahydrocannabinol. Psychopharmacologia, v. 33, n. 1, p. 53-70, 1973.

KARNIOL, I. G.; SHIRAKAWA, I.; KASINSKI, N.; PFEFERMAN, A.; CARLINI, E. A. Cannabidiol interferes with the effects of delta 9 - tetrahydrocannabinol in man. Eur J Pharmacol, v. 28, n. 1, p. 172-7, 1974.

KATHMANN, M.; FLAU, K.; REDMER, A.; TRANKLE, C.; SCHLICKER, E. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v. 372, n. 5, p. 354-61, 2006.

KEW, J. N.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. Psychopharmacology (Berl), v. 179, n. 1, p. 4-29, 2005.

KEILHOF, G.; BECKER, A.; GRECKSCH, G.; WOLF, G.; BERNSTEIN, H. G. Repeated application of ketamine to rats induces changes in the hippocampal expression of parvalbumin, neuronal nitric oxide synthase and cFOS similar to those found in human schizophrenia. Neuroscience, v. 126, n. 3, p. 591-8, 2004.

KONTKANEN, O.; LAKSO, M.; WONG, G.; CASTREN, E. Chronic antipsychotic drug treatment induces long-lasting expression of fos and jun family genes and activator protein 1 complex in the rat prefrontal cortex. Neuropsychopharmacology, v. 27, n. 2, p. 152-62, 2002.

KRYSTAL, J. H.; D'SOUZA, D. C.; MATHALON, D.; PERRY, E.; BELGER, A.; HOFFMAN, R. NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. Psychopharmacology (Berl), v. 169, n. 3-4, p. 215-33, 2003.

KRYSTAL, J. H.; KARPER, L. P.; SEIBYL, J. P.; FREEMAN, G. K.; DELANEY, R.; BREMNER, J. D.; et al. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. Arch Gen Psychiatry, v. 51, n. 3, p. 199-214, 1994.

KRYSTAL, J. H.; PERRY, E. B., JR.; GUEORGIEVA, R.; BELGER, A.; MADONICK, S. H.; ABI-DARGHAM, A.; et al. Comparative and interactive human psychopharmacologic effects of ketamine and amphetamine: implications for glutamatergic and dopaminergic model psychoses and cognitive function. Arch Gen Psychiatry, v. 62, n. 9, p. 985-94, 2005.

LAAN, W.; GROBBEE, D. E.; SELTEN, J. P.; HEIJNEN, C. J.; KAHN, R. S.; BURGER, H. Adjuvant aspirin therapy reduces symptoms of schizophrenia spectrum disorders: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Clin Psychiatry, v. 71, n. 5, p. 520-7, 2010.

LAHTI, A. C.; HOLCOMB, H. H.; MEDOFF, D. R.; TAMMINGA, C. A. Ketamine activates psychosis and alters limbic blood flow in schizophrenia. Neuroreport, v. 6, n. 6, p. 869-72, 1995.

LANE, S. J.; ORNITZ, E. M.; GUTHRIE, D. Modulatory influence of continuous tone, tone offset, and tone onset on the human acoustic startle response. Psychophysiology, v. 28, n. 5, p. 579-87, 1991.

LANG, U. E.; PULS, I.; MULLER, D. J.; STRUTZ-SEEBOHM, N.; GALLINAT, J. Molecular mechanisms of schizophrenia. Cell Physiol Biochem, v. 20, n. 6, p. 687-702, 2007.

LARRAURI, J.; SCHMAJUK, N. Prepulse inhibition mechanisms and cognitive processes: a review and model. EXS, v. 98, p. 245-78, 2006.

LAW, A. J.; DEAKIN, J. F. Asymmetrical reductions of hippocampal NMDAR1 glutamate receptor mRNA in the psychoses. Neuroreport, v. 12, n. 13, p. 2971-4, 2001.

LESH, T. A.; NIENDAM, T. A.; MINZENBERG, M. J.; CARTER, C. S. Cognitive control deficits in schizophrenia: mechanisms and meaning. Neuropsychopharmacology, v. 36, n. 1, p. 316-38, 2011.

LEVIN, R.; PERES, F. F.; ALMEIDA, V.; CALZAVARA, M. B.; ZUARDI, A. W.; HALLAK, J. E.; et al. Effects of cannabinoid drugs on the deficit of prepulse inhibition of startle in an animal model of schizophrenia: the SHR strain. Front Pharmacol, v. 5, p. 10, 2014.

LEVKOVITZ, Y.; MENDLOVICH, S.; RIWKES, S.; BRAW, Y.; LEVKOVITCH-VERBIN, H.; et al. A double-blind, randomized study of minocycline for the treatment of negative and cognitive symptoms in early-phase schizophrenia. J Clin Psychiatry, v. 71, n. 2, p. 138-49, 2010.

LEWEKE, F. M.; PIOMELLI, D.; PAHLISCH, F.; MUHL, D.; GERTH, C. W.; HOYER, C.; et al. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. Transl Psychiatry, v. 2, p. e94, 2012.

LEWEKE, F. M.; SCHNEIDER, U.; RADWAN, M.; SCHMIDT, E.; EMRICH, H. M. Different effects of nabilone and cannabidiol on binocular depth inversion in Man. Pharmacol Biochem Behav, v. 66, n. 1, p. 175-81, 2000.

LEWIS, D. A.; HASHIMOTO, T.; VOLK, D. W. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. Nat Rev Neurosci, v. 6, n. 4, p. 312-24, 2005.

LEWIS, D. A.; LIEBERMAN, J. A. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. Neuron, v. 28, n. 2, p. 325-34, 2000.

LEWIS, S.; LIEBERMAN, J. CATIE and CULASS: can we handle the truth? Br J Psychiatry, v. 192, n. 3, p. 161-3, 2008.

LIEBERMAN, J. A.; STROUP, T. S.; MCEVOY, J. P.; SWARTZ, M. S.; ROSENHECK, R. A.; PERKINS, D. O.; et al. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. N Engl J Med, v. 353, n. 12, p. 1209-23, 2005.

LOBO, M. K.; ZAMAN, S.; DAMEZ-WERNO, D. M.; KOO, J. W.; BAGOT, R. C.; DINIERI, J. A.; et al. DeltaFosB Induction in Striatal Medium Spiny Neuron Subtypes in Response to Chronic Pharmacological, Emotional, and Optogenetic Stimuli. J Neurosci, v. 33, n. 47, p. 18381-95, 2013.

LONG, L. E.; CHESWORTH, R.; HUANG, X. F.; MCGREGOR, I. S.; ARNOLD, J. C.; KARL, T. A behavioural comparison of acute and chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in C57BL/6JArc mice. Int J Neuropsychopharmacol, v. 13, n. 7, p. 861-76, 2010.

LONG, L. E.; CHESWORTH, R.; HUANG, X. F.; WONG, A.; SPIRO, A.; MCGREGOR, I. S.; et al. Distinct neurobehavioural effects of cannabidiol in transmembrane domain neuregulin 1 mutant mice. PLoS One, v. 7, n. 4, p. e34129, 2012.

LONG, L. E.; MALONE, D. T.; TAYLOR, D. A. Cannabidiol reverses MK-801-induced disruption of prepulse inhibition in mice. Neuropsychopharmacology, v. 31, n. 4, p. 795-803, 2006.

LOPEZ-RODRIGUEZ, A. B.; SIOPI, E.; FINN, D. P.; MARCHAND-LEROUX, C.; GARCIA-SEGURA, L. M.; JAFARIAN-TEHRANI, M.; et al. CB1 and CB2 Cannabinoid Receptor Antagonists Prevent Minocycline-Induced Neuroprotection Following Traumatic Brain Injury in Mice. Cereb Cortex, v. 25, n. 1, p. 35-45, 2015.

MANDILLO, S.; RINALDI, A.; OLIVERIO, A.; MELE, A. Repeated administration of phencyclidine, amphetamine and MK-801 selectively impairs spatial learning in mice: a possible model of psychotomimetic drug-induced cognitive deficits. Behav Pharmacol, v. 14, n. 7, p. 533-44, 2003.

MANZANEQUE, J. M.; BRAIN, P. F.; NAVARRO, J. F. Effect of low doses of clozapine on behaviour of isolated and group-housed male mice in the elevated plus-maze test. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v. 26, n. 2, p. 349-55, 2002.

MARTINEZ, Z. A.; ELLISON, G. D.; GEYER, M. A.; SWERDLOW, N. R. Effects of sustained phencyclidine exposure on sensorimotor gating of startle in rats. Neuropsychopharmacology, v. 21, n. 1, p. 28-39, 1999.

MARTIN-MORENO, A. M.; REIGADA, D.; RAMIREZ, B. G.; MECHOULAM, R.; INNAMORATO, N.; CUADRADO, A.; et al. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. Mol Pharmacol, v. 79, n. 6, p. 964-973, 2011.

MCCLUNG, C. A.; ULERY, P. G.; PERROTTI, L. I.; ZACHARIOU, V.; BERTON, O.; NESTLER, E. J. DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. Mol Brain Res, v. 132, n. 2, p. 146-54, 2004.

MCGRATH, J.; SAHA, S.; CHANT, D.; WELHAM, J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. Epidemiol Rev, v. 30, p. 67-76, 2008.

MECHA, M.; FELIU, A.; INIGO, P. M.; MESTRE, L.; CARRILLO-SALINAS, F. J.; GUAZA, C. Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: a role for A2A receptors. Neurobiol Dis, v. 59, p. 141-50, 2013.

MECHOULAM, R.; BEN-SHABAT, S.; HANUS, L.; LIGUMSKY, M.; KAMINSKI, N. E.; SCHATZ, A. R.; et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. Biochem Pharmacol, v. 50, n. 1, p. 83-90, 1995.

MECHOULAM, R.; PARKER, L. A.; GALLILY, R. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. J Clin Pharmacol, v. 42, n. 11 Suppl, p. 11S-19S, 2002.

MECHOULAM, R.; SHVO, Y. Hashish I: The structure of cannabidiol. Tetrahedron, v. 19, p. 2073-2078, 1963.

MEYER, U.; SCHWARZ, M. J.; MULLER, N. Inflammatory processes in schizophrenia: a promising neuroimmunological target for the treatment of negative/cognitive symptoms and beyond. Pharmacol Ther, v. 132, n. 1, p. 96-110, 2011.

MITTERAUER, B.J. Pathophysiology of schizophrenia based on impaired glial-neuronal interactions. Open J Med Psychol, v. 3, n. 2, 126-40, 2014.

MOGHADDAM, B.; ADAMS, B.; VERMA, A.; DALY, D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. J Neurosci, v. 17, n. 8, p. 2921-7, 1997.

MOHN, A. R.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G.; KOLLER, B. H. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. Cell, v. 98, n. 4, p. 427-36, 1999.

MONJI, A.; KATO, T. A.; MIZOGUCHI, Y.; HORIKAWA, H.; SEKI, Y.; KASAI, M.; et al. Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v. 42, p. 115-21, 2013.

MOREAU, A. W.; KULLMANN, D. M. NMDA receptor-dependent function and plasticity in inhibitory circuits. Neuropharmacology, v. 74, p. 23-31, 2013.

MOREIRA, F. A.; GUIMARAES, F. S. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. Eur J Pharmacol, v. 512, n. 2-3, p. 199-205, 2005.

MORROW, B. A.; ELSWORTH, J. D.; ROTH, R. H. Repeated phencyclidine in monkeys results in loss of parvalbumin-containing axo-axonic projections in the prefrontal cortex. Psychopharmacology (Berl), v. 192, n. 2, p. 283-90, 2007.

MOURI, A.; NODA, Y.; ENOMOTO, T.; NABESHIMA, T. Phencyclidine animal models of schizophrenia: approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. Neurochem Int, v. 51, n. 2-4, p. 173-84, 2007.

MULLER, N.; KRAUSE, D.; DEHNING, S.; MUSIL, R.; SCHENNACH-WOLFF, R.; OBERMEIER, M.; et al. Celecoxib treatment in an early stage of schizophrenia: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of celecoxib augmentation of amisulpride treatment. Schizophr Res, v. 121, n. 1-3, p. 118-24, 2010.

MULLER, N.; MYINT, A. M.; KRAUSE, D.; WEIDINGER, E.; SCHWARZ, M. J. Anti-inflammatory treatment in schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v. 42, p. 146-53, 2013.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature, v. 365, n. 6441, p. 61-5, 1993.

MURILLO-RODRIGUEZ, E.; MILLAN-ALDACO, D.; PALOMERO-RIVERO, M.; MECHOULAM, R.; DRUCKER-COLIN, R. Cannabidiol, a constituent of Cannabis sativa, modulates sleep in rats. FEBS Lett, v. 580, n. 18, p. 4337-45, 2006.

NAKAZAWA, K.; ZSIROS, V.; JIANG, Z.; NAKAO, K.; KOLATA, S.; ZHANG, S.; et al. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. Neuropharmacology, v. 62, n. 3, p. 1574-83, 2012.

NAKKI, R.; KOISTINAHO, J.; SHARP, F. R.; SAGAR, S. M. Cerebellar toxicity of phencyclidine. J Neurosci, v. 15, n. 3 Pt 2, p. 2097-108, 1995.

NAKKI, R.; NICKOLENKO, J.; CHANG, J.; SAGAR, S. M.; SHARP, F. R. Haloperidol prevents ketamine- and phencyclidine-induced HSP70 protein expression but not microglial activation. Exp Neurol, v. 137, n. 2, p. 234-41, 1996.

NESTLER, E. J.; KELZ, M. B.; CHEN, J. DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. Brain Res, v. 835, n. 1, p. 10-7, 1999.

OBERHEIM, N. A., GOLDMAN, S. A., NEDERGAARD, M. Heterogeneity of astrocytic form and function. Methods Mol Biol, v. 814, p. 23-45, 2012.

O'DONNELL, P. Adolescent Onset of Cortical Disinhibition in Schizophrenia: Insights From Animal Models. Schizophr Bull, v. 37, n. 3, p. 484-92, 2011.

OLNEY, J. W.; FARBER, N. B. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. Arch Gen Psychiatry, v. 52, n. 12, p. 998-1007, 1995.

OMS, Organização Mundial da Saúde. Relatório Sobre a Saúde no Mundo - Saúde Mental: nova concepção, nova esperança. OMS, 2001. 150p.

ONAIVI, E. S. Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. Neuropsychobiology, v. 54, n. 4, p. 231-46, 2006.

PACHER, P.; BATKAI, S.; KUNOS, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. Pharmacol Rev, v. 58, n. 3, p. 389-462, 2006.

PAXINOS, G; FRANKLIN, K. B. J. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 3th Ed. New York: Academic Press, 2008: 360p.

PEDRAZZI, J. F. C. *Canabidiol e seu análogo HU-219 atenuam o prejuízo induzido por anfetamina no filtro sensorio-motor*. 2014. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

PENSCHUCK, S.; FLAGSTAD, P.; DIDRIKSEN, M.; LEIST, M.; MICHAEL-TITUS, A. T. Decrease in parvalbumin-expressing neurons in the hippocampus and increased phencyclidine-induced locomotor activity in the rat methylazoxymethanol (MAM) model of schizophrenia. Eur J Neurosci, v. 23, n. 1, p. 279-84, 2006.

PEREZ, M.; BENITEZ, S. U.; CARTAROZZI, L. P.; DEL BEL, E.; GUIMARAES, F. S.; OLIVEIRA, A. L. Neuroprotection and reduction of glial reaction by cannabidiol treatment after sciatic nerve transection in neonatal rats. Eur J Neurosci, v. 38, n. 10, p. 3424-34, 2013.

PETERS, J. H.; MCDUGALL, S. J.; FAWLEY, J. A.; SMITH, S. M.; ANDRESEN, M. C. Primary afferent activation of thermosensitive TRPV1 triggers asynchronous glutamate release at central neurons. Neuron, v. 65, n. 5, p. 657-69, 2010.

PILOWSKY, L. S.; BRESSAN, R. A.; STONE, J. M.; ERLANDSSON, K.; MULLIGAN, R. S.; KRYSTAL, J. H.; et al. First in vivo evidence of an NMDA receptor deficit in medication-free schizophrenic patients. Mol Psychiatry, v. 11, n. 2, p. 118-9, 2006.

PIN, J. P.; ACHER, F. The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, v. 1, n. 3, p. 297-317, 2002.

RADEWICZ, K.; GAREY, L. J.; GENTLEMAN, S. M.; REYNOLDS, R. Increase in HLA-DR immunoreactive microglia in frontal and temporal cortex of chronic schizophrenics. J Neuropathol Exp Neurol, v. 59, n. 2, p. 137-50, 2000.

RAJKOWSKA, G.; MIGUEL-HIDALGO, J. J.; MAKKOS, Z.; MELTZER, H.; OVERHOLSER, J.; STOCKMEIER, C. Layer-specific reductions in GFAP-reactive astroglia in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. Schizophr Res, v. 57, n. 2-3, p. 127-38, 2002.

RETHELYI, J. M.; BENKOVITS, J.; BITTER, I. Genes and environments in schizophrenia: The different pieces of a manifold puzzle. Neurosci Biobehav Rev, v. 37, n. 10 Pt 1, p. 2424-37, 2013.

REYNOLDS, G. P.; BEASLEY, C. L.; ZHANG, Z. J. Understanding the neurotransmitter pathology of schizophrenia: selective deficits of subtypes of cortical GABAergic neurons. J Neural Transm, v. 109, n. 5-6, p. 881-9, 2002.

RIBEIRO, B. M.; DO CARMO, M. R.; FREIRE, R. S.; ROCHA, N. F.; BORELLA, V. C.; DE MENEZES, A. T.; et al. Evidences for a progressive microglial activation and increase in iNOS expression in rats submitted to a neurodevelopmental model of schizophrenia: reversal by clozapine. Schizophr Res, v. 151, n. 1-3, p. 12-9, 2013.

RIBEIRO-SANTOS, R.; TEIXEIRA, A. L.; SALGADO, J. V. Evidence for an immune role on cognition in schizophrenia: a systematic review. Curr Neuropsychopharmacol, v. 12, n. 3, p. 273-280, 2014.

ROBERTSON, G. S.; FIBIGER, H. C. Neuroleptics increase c-fos expression in the forebrain: contrasting effects of haloperidol and clozapine. Neuroscience, v. 46, n. 2, p. 315-28, 1992.

RODRIGUEZ, J. J.; GARCIA, D. R.; NAKABEPPU, Y.; PICKEL, V. M. Enhancement of laminar FosB expression in frontal cortex of rats receiving long chronic clozapine administration. Exp Neurol, v. 168, n. 2, p. 392-401, 2001.

ROTHERMUNDT, M.; AHN, J. N.; JORGENSEN, S. S100B in schizophrenia: an update. Gen Physiol Biophys, v. 28 Spec No Focus, p. F76-81, 2009.

ROTTANBURG, D.; ROBINS, A. H.; BEN-ARIE, O.; TEGGIN, A.; ELK, R. Cannabis-associated psychosis with hypomanic features. Lancet, v. 2, n. 8312, p. 1364-6, 1982.

RUJESCU, D.; BENDER, A.; KECK, M.; HARTMANN, A. M.; OHL, F.; RAEDER, H.; et al. A pharmacological model for psychosis based on N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction: molecular, cellular, functional and behavioral abnormalities. Biol Psychiatry, v. 59, n. 8, p. 721-9, 2006.

RUNG, J. P.; CARLSSON, A.; RYDEN MARKINHUHTA, K.; CARLSSON, M. L. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v. 29, n. 5, p. 827-32, 2005.

RUPP, A.; KEITH, S. J. The costs of schizophrenia. Assessing the burden. Psychiatr Clin North Am, v. 16, n. 2, p. 413-23, 1993.

RUSSO, E. B.; BURNETT, A.; HALL, B.; PARKER, K. K. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1A} receptors. Neurochem Res, v. 30, n. 8, p. 1037-43, 2005.

SCHIAVON, A. P.; SOARES, L. M.; BONATO, J. M.; MILANI, H.; GUIMARAES, F. S.; WEFFORT DE OLIVEIRA, R. M. Protective effects of cannabidiol against

hippocampal cell death and cognitive impairment induced by bilateral common carotid artery occlusion in mice. Neurotox Res, v. 26, n. 4, p. 307-16, 2014.

SCHLICKER, E.; KATHMANN, M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. Trends Pharmacol Sci, v. 22, n. 11, p. 565-572, 2001.

SCHIZOPHRENIA WORKING GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. Nature, v. 511, n. 7510, p. 421-7, 2014.

SCHNEIDER, U.; BORSUTZKY, M.; SEIFERT, J.; LEWEKE, F. M.; HUBER, T. J.; ROLLNIK, J. D.; et al. Reduced binocular depth inversion in schizophrenic patients. Schizophr Res, v. 53, n. 1-2, p. 101-8, 2002.

SCHNIEDER, T. P.; DWORK, A. J. Searching for neuropathology: gliosis in schizophrenia. Biol Psychiatry, v. 69, n. 2, p. 134-9, 2011.

SCHULZ, B.; FENDT, M.; PEDERSEN, V.; KOCH, M. Sensitization of prepulse inhibition deficits by repeated administration of dizocilpine. Psychopharmacology (Berl), v. 156, n. 2-3, p. 177-81, 2001.

SCHWARTZ, T. L.; SACHDEVA, S.; STAHL, S. M. Glutamate neurocircuitry: theoretical underpinnings in schizophrenia. Front Pharmacol, v. 3, p. 195, 2012.

SEEMAN, P.; KAPUR, S. Schizophrenia: more dopamine, more D2 receptors. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 97, n. 14, p. 7673-5, 2000.

SEMPLE, D. M.; MCINTOSH, A. M.; LAWRIE, S. M. Cannabis as a risk factor for psychosis: systematic review. J Psychopharmacol, v. 19, n. 2, p. 187-94, 2005.

SIDORYK-WEGRZYNOWICZ, M.; WEGRZYNOWICZ, M.; LEE, E.; BOWMAN, A. B.; ASCHNER, M. Role of astrocytes in brain function and disease. Toxicol Pathol, v. 39, n. 1, p. 115-23, 2011.

SILVERSTEIN, S. M.; MOGHADDAM, B.; WYKES, T. *Schizophrenia: evolution and synthesis*. The MIT Press, 2013. 390p.

SMIT, F.; BOLIER, L.; CUIJPERS, P. Cannabis use and the risk of later schizophrenia: a review. Addiction, v. 99, n. 4, p. 425-30, 2004.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol, v. 119, n. 1, p. 7-35, 2010.

STAPLES, L. G.; MCGREGOR, I. S.; HUNT, G. E. Long-lasting FosB/DeltaFosB immunoreactivity in the rat brain after repeated cat odor exposure. Neurosci Lett, v. 462, n. 2, p. 157-61, 2009.

STEFANI, M. R.; MOGHADDAM, B. Transient N-methyl-D-aspartate receptor blockade in early development causes lasting cognitive deficits relevant to schizophrenia. Biol Psychiatry, v. 57, n. 4, p. 433-6, 2005.

STEULLET, P.; CABUNGAL, J. H.; MONIN, A.; DWIR, D.; O'DONNELL, P.; CUENOD, M.; et al. Redox dysregulation, neuroinflammation, and NMDA receptor hypofunction: A "central hub" in schizophrenia pathophysiology? Schizophr Res, 2014. doi: 10.1016/j.schres.2014.06.021.

STONE, J. M.; MORRISON, P. D.; PILOWSKY, L. S. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia--a synthesis and selective review. J Psychopharmacol, v. 21, n. 4, p. 440-52, 2007.

SWERDLOW, N. R.; BLUMENTHAL, T. D.; SUTHERLAND, A. N.; WEBER, E.; TALLEDO, J. A. Effects of prepulse intensity, duration, and bandwidth on perceived intensity of startling acoustic stimuli. Biol Psychol, v. 74, n. 3, p. 389-95, 2007.

SWERDLOW, N. R.; GEYER, M. A.; BRAFF, D. L. Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. Psychopharmacology (Berl), v. 156, p. 194-215, 2001.

TAGLIAFERRO, P.; RAMOS, A. J.; LOPEZ, E. M.; PECCI SAAVEDRA, J.; BRUSCO, A. Neural and astroglial effects of a chronic parachlorophenylalanine-induced serotonin synthesis inhibition. Mol Chem Neuropathol, v. 32, n. 1-3, p. 195-211, 1997.

THOMAS, B. F.; GILLIAN, A. F.; BURCH, D. F.; ROCHE, M. J.; SELTZMAN, H. H. Comparative Receptor Binding Analyses of Cannabinoid Agonists and Antagonists. J Pharmacol Exp Ther, v. 285, n. 1, p. 285-92, 1998.

TILLEUX, S.; HERMANS, E. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. J Neurosci Res, v. 85, n. 10, p. 2059-2070, 2007.

TODTENKOPF, M. S.; STELLAR, J. R.; WILLIAMS, E. A.; ZAHM, D. S. Differential distribution of parvalbumin immunoreactive neurons in the striatum of cocaine sensitized rats. Neuroscience, v. 127, n. 1, p. 35-42, 2004.

TORREY, E. F.; BARCI, B. M.; WEBSTER, M. J.; BARTKO, J. J.; MEADOR-WOODRUFF, J. H.; KNABLE, M. B. Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression in postmortem brains. Biol Psychiatry, v. 57, n. 3, p. 252-60, 2005.

TSAI, G.; COYLE, J. T. Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v. 42, p. 165-79, 2002.

TSENG, K. Y.; O'DONNELL, P. Dopamine modulation of prefrontal cortical interneurons changes during adolescence. Cereb Cortex, v. 17, n. 5, p. 1235-40, 2007.

TSOU, K.; BROWN, S.; SANUDO-PENA, M. C.; MACKIE, K.; WALKER, J. M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. Neuroscience, v. 83, n. 2, p. 393-411, 1998.

TSUANG, M. T.; LYONS, M. J.; FARAONE, S. V. Heterogeneity of schizophrenia. Conceptual models and analytic strategies. Br J Psychiatry, v. 156, p. 17-26, 1990.

VALES, K.; BUBENIKOVA-VALESOVA, V.; KLEMENT, D.; STUCHLIK, A. Analysis of sensitivity to MK-801 treatment in a novel active allothetic place avoidance task and in the working memory version of the Morris water maze reveals differences between Long-Evans and Wistar rats. Neurosci Res, v. 55, n. 4, p. 383-8, 2006.

VAN BERCKEL, B. N.; BOSSONG, M. G.; BOELLAARD, R.; KLOET, R.; SCHUITMAKER, A.; CASPERS, E.; et al. Microglia activation in recent-onset schizophrenia: a quantitative (R)-[11C]PK11195 positron emission tomography study. Biol Psychiatry, v. 64, n. 9, p. 820-2, 2008.

VERWER, R. W., MEIJER, R. J., VAN UUM, H. F., WITTER, M. P. Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. Hippocampus, v. 7, n. 4, p. 397-402, 1997.

VIGANO, D.; GUIDALI, C.; PETROSINO, S.; REALINI, N.; RUBINO, T.; DI MARZO, V.; et al. Involvement of the endocannabinoid system in phencyclidine-induced cognitive deficits modelling schizophrenia. Int J Neuropsychopharmacol, v. 12, n. 5, p. 599-614, 2009.

WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; NABEKURA, J. Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. Neuron Glia Biol, v. 7, n. 1, p. 47-53, 2011.

WANG, H. D.; TAKIGAWA, M.; HAMADA, K.; SHIRATANI, T.; TAKENOUCHI, K.; WANG, G. Reciprocal information flow between prefrontal cortex and ventral tegmental area in an animal model of schizophrenia. Neuroreport, v. 11, n. 9, p. 2007-11, 2000.

WEICKERT, C. S.; FUNG, S. J.; CATTS, V. S.; SCHOFIELD, P. R.; ALLEN, K. M.; MOORE, L. T.; et al. Molecular evidence of N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction in schizophrenia. Mol Psychiatry, v. 18, n. 11, p. 1185-92, 2013.

WEINBERGER, D. R. Schizophrenia and the frontal lobe. Trends Neurosci, v. 11, n. 8, p. 367-70, Aug 1988.

WINTON-BROWN, T. T.; ALLEN, P.; BHATTACHARYYA, S.; BORGWARDT, S. J.; FUSAR-POLI, P.; CRIPPA, J. A.; et al. Modulation of auditory and visual processing by delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol: an FMRI study. Neuropsychopharmacology, v. 36, n. 7, p. 1340-8, 2011.

WOLF, S. A.; BICK-SANDER, A.; FABEL, K.; LEAL-GALICIA, P.; TAUBER, S.; RAMIREZ-RODRIGUEZ, G.; et al. Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis. Cell Commun Signal, v. 8, p. 12, 2010.

WONG, A. H.; VAN TOL, H. H. Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. Neurosci Biobehav Rev, v. 27, n. 3, p. 269-306, 2003.

WONG, A. H.; VORUGANTI, L. N.; HESLEGRAVE, R. J.; AWAD, A. G. Neurocognitive deficits and neurological signs in schizophrenia. Schizophr Res, v. 23, n. 2, p. 139-46, 1997.

WU, E. Q.; BIRNBAUM, H. G.; SHI, L.; BALL, D. E.; KESSLER, R. C.; MOULIS, M.; et al. The economic burden of schizophrenia in the United States in 2002. J Clin Psychiatry, v. 66, n. 9, p. 1122-9, 2005.

XIA, M.; ABAZYAN, S.; JOUROUKHIN, Y.; PLETNIKOV, M. Behavioral sequelae of astrocyte dysfunction: focus on animal models of schizophrenia. Schizophr Res, 2014. doi: 10.1016/j.schres.2014.10.044.

YANG, K. H.; GALADARI, S.; ISAEV, D.; PETROIANU, G.; SHIPPENBERG, T. S.; OZ, M. The nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol inhibits 5-hydroxytryptamine_{3A} receptor-mediated currents in *Xenopus laevis* oocytes. J Pharmacol Exp Ther, v. 333, n. 2, p. 547-54, 2010.

YEE, B. K.; CHANG, T.; PIETROPAOLO, S.; FELDON, J. The expression of prepulse inhibition of the acoustic startle reflex as a function of three pulse stimulus intensities, three prepulse stimulus intensities, and three levels of startle responsiveness in C57BL/6/J mice. Behav Brain Res, v. 163, n. 2, p. 265-76, 2005.

ZHANG, Z. J.; REYNOLDS, G. P. A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia. Schizophr Res, v. 55, n. 1-2, p. 1-10, 2002.

ZUARDI, A. W. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. Rev Bras Psiquiatr, v. 30, n. 3, p. 271-80, 2008.

ZUARDI, A. W. History of cannabis as a medicine: a review. Rev Bras Psiquiatr, v. 28, n. 2, p. 153-7, 2006.

ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A.; HALLAK, J. E.; BHATTACHARYYA, S.; ATAKAN, Z.; MARTIN-SANTOS, R.; et al. A critical review of the antipsychotic effects of cannabidiol: 30 years of a translational investigation. Curr Pharm Des, v. 18, n. 32, p. 5131-40, 2012.

ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A.; HALLAK, J. E.; MOREIRA, F. A.; GUIMARAES, F. S. Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug. Braz J Med Biol Res, v. 39, n. 4, p. 421-9, 2006a.

ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A.; HALLAK, J. E.; PINTO, J. P.; CHAGAS, M. H.; RODRIGUES, G. G.; et al. Cannabidiol for the treatment of psychosis in Parkinson's disease. J Psychopharmacol, v. 23, n. 8, p. 979-83, 2009.

ZUARDI, A. W.; HALLAK, J. E.; DURSUN, S. M.; MORAIS, S. L.; SANCHES, R. F.; MUSTY, R. E.; et al. Cannabidiol monotherapy for treatment-resistant schizophrenia. J Psychopharmacol, v. 20, n. 5, p. 683-6, 2006b.

ZUARDI, A. W.; MORAIS, S. L.; GUIMARAES, F. S.; MECHOULAM, R. Antipsychotic effect of cannabidiol. J Clin Psychiatry, v. 56, n. 10, p. 485-6, 1995.

ZUARDI, A. W.; RODRIGUES, J. A.; CUNHA, J. M. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. Psychopharmacology (Berl), v. 104, n. 2, p. 260-4, 1991.

ZUARDI, A. W.; SHIRAKAWA, I.; FINKELFARB, E.; KARNIOL, I. G. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. Psychopharmacology (Berl), v. 76, n. 3, p. 245-50, 1982.

Anexos

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 165/2010, sobre o projeto intitulado “*Avaliação dos efeitos do canabidiol sobre as alterações comportamentais e moleculares induzidas pelo tratamento repetido com MK-801*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Francisco Silveira Guimarães** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 22 de novembro de 2010.

(We certify that the protocol nº 165/2010, about “*Evaluation of CBD effects on the molecular and behavioral changes induced by repeated treatment with MK-801*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 11/22/2010.

Ribeirão Preto, 22 de novembro de 2010.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

ANEXO II

Tabela I - Comparação entre os animais do grupo controle tratados com Tween 80 2% em salina (veículo para o CBD) + salina ou salina suplementada com 30 µL de ácido clorídrico 0,1 M (veículo para a clozapina) + salina nos experimentos comportamentais e moleculares.

Experimentos	Tratamento		t
	VEI CBD + SAL	VEI CLO + SAL	
Testes comportamentais			
Teste de PPI (Experimento 2; % de PPI)			
Pré-pulso de 90 dB	65,1 ± 2,9	62,4 ± 3,6	t ₁₂ = 0,59
Pré-pulso de 85 dB	52,3 ± 4,2	57,7 ± 5,0	t ₁₂ = 0,24
Pré-pulso de 80 dB	48,9 ± 3,8	48,0 ± 3,2	t ₁₂ = 0,17
Interação social (tempo; em segundos)	117,0 ± 8,5	120,5 ± 9,9	t ₆ = 0,27
Reconhecimento de objeto (índice de discriminação)	0,50 ± 0,14	0,66 ± 0,11	t ₆ = 0,86
LCE			
% entradas nos braços abertos	23,1 ± 5,7	34,0 ± 5,0	t ₆ = 1,43
% tempo nos braços abertos	10,8 ± 4,9	17,1 ± 5,3	t ₆ = 0,87
Nº de entradas nos braços fechados	13,0 ± 1,6	14,0 ± 1,1	t ₆ = 0,52
Atividade locomotora (distância percorrida, em metros)	17,27 ± 1,4	19,0 ± 1,9	t ₆ = 0,70
Análises de IHQ			
FosB/ΔFosB (Nº de células imunorreativas/0,1mm ²)			
CPFm	108,6 ± 6,0	101,1 ± 8,4	t ₄ = 0,73
Estriado dorsal	122,2 ± 16,6	127,6 ± 27,6	t ₄ = 0,17
NAc core	181,0 ± 11,1	185,2 ± 14,5	t ₅ = 0,25
NAc shell	143,6 ± 8,6	156,4 ± 19,3	t ₅ = 0,42
GD	194,5 ± 16,0	187,4 ± 24,3	t ₄ = 0,55
CA1	103,3 ± 8,6	112,4 ± 13,4	t ₄ = 0,38
CA3	105,5 ± 6,1	107,3 ± 21,8	t ₄ = 0,89
Parvalbumina (Nº de células imunorreativas/0,1mm ²)			
CPFm	19,8 ± 1,8	22,0 ± 3,7	t ₅ = 0,57
Estriado dorsal	4,9 ± 1,3	6,9 ± 1,0	t ₅ = 1,14
NAc core	-	-	-
NAc shell	-	-	-
GD	5,9 ± 1,1	8,9 ± 4,0	t ₅ = 0,89
CA1	48,3 ± 6,7	43,3 ± 4,4	t ₅ = 0,63
CA3	37,5 ± 6,4	28,1 ± 2,6	t ₅ = 1,52

NeuN			
CPFm (<i>Número de células imunorreativas/0,1mm²</i>)	113,4 ± 21,9	122,2 ± 25,9	t ₄ = 0,25
Estriado dorsal	150,5 ± 17,5	164,7 ± 29,8	t ₄ = 0,41
NAc core	210,3 ± 19,9	224,5 ± 22,7	t ₄ = 0,47
NAc shell	246,8 ± 42,6	258,6 ± 81,2	t ₄ = 0,13
GD - <i>Upper blade</i> (<i>densidade óptica - % em relação ao grupo controle</i>)	104,3 ± 26,5	93,6 ± 39,1	t ₃ = 0,24
GD - <i>Outer blade</i>	103,4 ± 18,7	95,0 ± 14,8	t ₃ = 0,32
GD - <i>Inner blade</i>	104,6 ± 21,8	93,1 ± 27,9	t ₃ = 0,33
CA1	102,3 ± 42,8	98,5 ± 22,6	t ₃ = 0,09
CA3	98,8 ± 28,6	100,8 ± 23,3	t ₃ = 0,05
GFAP (<i>Número de células imunorreativas/0,1mm²</i>)			
CPFm	23,4 ± 3,7	24,0 ± 3,2	t ₅ = 0,13
Estriado dorsal	15,8 ± 3,6	14,1 ± 0,7	t ₄ = 0,45
NAc core	14,7 ± 1,8	13,1 ± 0,7	t ₃ = 0,66
NAc shell	12,1 ± 6,2	13,2 ± 2,4	t ₃ = 0,21
GD (<i>Hilus</i>)	126,4 ± 29,3	131,5 ± 3,6	t ₃ = 0,23
CA1 (<i>str. radiatum</i>)	89,0 ± 30,9	100,8 ± 7,3	t ₃ = 0,47
CA3 (<i>str. radiatum</i>)	76,7 ± 13,4	92,0 ± 14,8	t ₃ = 0,71
Iba-1 (<i>Número de células imunorreativas/0,1mm²</i>)			
CPFm	63,9 ± 8,6	61,5 ± 4,5	t ₅ = 0,26
Estriado dorsal	68,9 ± 3,2	63,1 ± 5,5	t ₄ = 0,92
NAc core	34,1 ± 11,4	29,7 ± 1,4	t ₄ = 0,38
NAc shell	48,6 ± 4,8	50,1 ± 3,3	t ₄ = 0,25
GD (<i>Hilus</i>)	64,2 ± 5,3	62,8 ± 6,6	t ₄ = 0,16
CA1 (<i>str. radiatum</i>)	47,8 ± 4,9	42,4 ± 5,3	t ₄ = 0,75
CA3 (<i>str. radiatum</i>)	29,1 ± 2,8	30,5 ± 3,4	t ₄ = 0,32
RNA para o gene GNR1			
Córtex frontal	120,8 ± 30,0	94,0 ± 26,4	t ₅ = 0,64
Estriado	106,9 ± 19,5	111,3 ± 19,4	t ₅ = 0,16
Hipocampo	131,6 ± 35,8	128,5 ± 29,8	t ₅ = 0,15

Nenhuma diferença foi observada. $P > 0,05$; teste t de *Student*. CBD: canabidiol; CLO: clozapina; CPFm: córtex pré-frontal medial; GD: giro denteado; IHQ: imunoistoquímica; LCE: labirinto em cruz elevado; NAc: núcleo *accumbens*; PPI: inibição pelo pré-pulso; SAL: salina; *str. radiatum*: *stratum radiatum*; VEI: veículo.

ANEXO III

Tabela II - Expressão das proteínas FosB/ Δ FosB, NeuN, GFAP e Iba-1 induzida pelos tratamentos nas porções pré-límbica (PL) e infra-límbica (IL) do córtex pré-frontal medial.

Proteína	Tratamento					
	VEI+SAL	CLO+SAL	CBD+SAL	VEI+MK-801	CLO+MK-801	CBD+MK-801
FosB/ΔFosB						
PL	109 $\pm$ 4	123 $\pm$ 13	104 $\pm$ 6	158 $\pm$ 14 *	123 $\pm$ 10	119 $\pm$ 6
IL	105 $\pm$ 4	122 $\pm$ 13	107 $\pm$ 4	150 $\pm$ 13 *	124 $\pm$ 12	115 $\pm$ 18
NeuN						
PL	114 $\pm$ 19	134 $\pm$ 11	92 $\pm$ 12	162 $\pm$ 16	123 $\pm$ 38	112 $\pm$ 24
IL	122 $\pm$ 18	136 $\pm$ 5	133 $\pm$ 17	169 $\pm$ 9	148 $\pm$ 31	105 $\pm$ 20
GFAP						
PL	25 $\pm$ 4	27 $\pm$ 3	29 $\pm$ 2	44 $\pm$ 4 *	31 $\pm$ 3 #	36 $\pm$ 3
IL	23 $\pm$ 2	26 $\pm$ 3	29 $\pm$ 3	45 $\pm$ 3 *	30 $\pm$ 3 #	35 $\pm$ 4
Iba-1						
PL						
Nº de células	62 $\pm$ 4	60 $\pm$ 2	57 $\pm$ 5	67 $\pm$ 7	60 $\pm$ 2	72 $\pm$ 4
Tipo I (%)	57 $\pm$ 5	53 $\pm$ 2	52 $\pm$ 6	26 $\pm$ 2 *	49 $\pm$ 6 #	60 $\pm$ 5 #
Tipo II (%)	29 $\pm$ 5	35 $\pm$ 3	29 $\pm$ 6	32 $\pm$ 5	31 $\pm$ 7	27 $\pm$ 4
Tipo III (%)	10 $\pm$ 4	9 $\pm$ 2	14 $\pm$ 1	26 $\pm$ 5 *	15 $\pm$ 3 #	8 $\pm$ 2 #
Tipo IV (%)	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2	12 $\pm$ 3 *	5 $\pm$ 2	4 $\pm$ 3 #
Tipo V (%)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	6 $\pm$ 1 *	0 $\pm$ 0 #	0 $\pm$ 0 #
IL						
Nº de células	63 $\pm$ 4	59 $\pm$ 3	57 $\pm$ 5	69 $\pm$ 6	58 $\pm$ 5	71 $\pm$ 4
Tipo I (%)	61 $\pm$ 7	51 $\pm$ 4	55 $\pm$ 7	25 $\pm$ 4 *	46 $\pm$ 4 #	60 $\pm$ 8 #
Tipo II (%)	28 $\pm$ 4	35 $\pm$ 3	30 $\pm$ 6	32 $\pm$ 2	32 $\pm$ 6	26 $\pm$ 6
Tipo III (%)	10 $\pm$ 3	14 $\pm$ 3	13 $\pm$ 2	28 $\pm$ 5 *	13 $\pm$ 2 #	11 $\pm$ 3
Tipo IV (%)	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0	3 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2 *	9 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2
Tipo V (%)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	7 $\pm$ 2 *	0 $\pm$ 0 #	0 $\pm$ 0 #

Os dados foram expressos como a média $\pm$ EPM. *P < 0,05 em relação ao grupo VEI+SAL, #P < 0,05 em relação ao grupo VEI+MK-801; ANOVA de duas vias seguida pelo teste S-N-K. CBD: canabidiol; CLO: clozapina; IL: córtex pré-frontal medial infra-límbico; PL: córtex pré-frontal medial pré-límbico; SAL: salina e VEI: veículo.

RESEARCH ARTICLE

Cannabidiol Attenuates Sensorimotor Gating Disruption and Molecular Changes Induced by Chronic Antagonism of NMDA receptors in Mice

Felipe V. Gomes, PhD; Ana Carolina Issy, PhD; Frederico R. Ferreira, PhD; Maria-Paz Viveros, PhD; Elaine A. Del Bel, PhD; Francisco S. Guimarães, PhD

Department of Pharmacology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (Gomes and Guimarães); Department of Physiology, Faculty of Odontology of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (Issy and Del Bel); Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences, University of São Paulo, Brazil (Gomes, Issy, Del Bel, and Guimarães); Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil (Ferreira); Department of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Spain (Viveros).

Correspondence: Felipe V. Gomes, MD, Department of Pharmacology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 3900 Bandeirantes Ave, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil (gomesfv@usp.br).

Abstract

Background: Preclinical and clinical data suggest that cannabidiol (CBD), a major non-psychotomimetic compound from *Cannabis sativa*, induces antipsychotic-like effects. However, the antipsychotic properties of repeated CBD treatment have been poorly investigated. Behavioral changes induced by repeated treatment with glutamate N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antagonists have been proposed as an animal model of schizophrenia-like signs. In the present study, we evaluated if repeated treatment with CBD would attenuate the behavioral and molecular modifications induced by chronic administration of one of these antagonists, MK-801.

Methods: Male C57BL/6J mice received daily i.p. injections of MK-801 (0.1, 0.5, or 1 mg/kg) for 14, 21, or 28 days. Twenty-four hours after the last injection, animals were submitted to the prepulse inhibition (PPI) test. After that, we investigated if repeated treatment with CBD (15, 30, and 60 mg/kg) would attenuate the PPI impairment induced by chronic treatment with MK-801 (1 mg/kg; 28 days). CBD treatment began on the 6th day after the start of MK-801 administration and continued until the end of the treatment. Immediately after the PPI, the mice brains were removed and processed to evaluate the molecular changes. We measured changes in FosB/ Δ FosB and parvalbumin (PV) expression, a marker of neuronal activity and a calcium-binding protein expressed in a subclass of GABAergic interneurons, respectively. Changes in mRNA expression of the NMDAR GluN1 subunit gene (GRN1) were also evaluated. CBD effects were compared to those induced by the atypical antipsychotic clozapine.

Results: MK-801 administration at the dose of 1 mg/kg for 28 days impaired PPI responses. Chronic treatment with CBD (30 and 60 mg/kg) attenuated PPI impairment. MK-801 treatment increased FosB/ Δ FosB expression and decreased PV expression in the medial prefrontal cortex. A decreased mRNA level of GRN1 in the hippocampus was also observed. All the molecular changes were attenuated by CBD. CBD by itself did not induce any effect. Moreover, CBD effects were similar to those induced by repeated clozapine treatment.

Received: July 15, 2014; Revised: September 05, 2014; Accepted: September 09, 2014

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of CINP.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

Conclusions: These results indicate that repeated treatment with CBD, similar to clozapine, reverses the psychotomimetic-like effects and attenuates molecular changes observed after chronic administration of an NMDAR antagonist. These data support the view that CBD may have antipsychotic properties.

Keywords: antipsychotic, cannabidiol, cannabinoid, clozapine, NMDA receptor hypofunction, schizophrenia

Introduction

Cannabidiol (CBD), a major compound from *Cannabis sativa*, is devoid of the typical psychoactive effects induced by Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC). In fact, CBD attenuates the psychotomimetic effects induced by high doses of THC in humans (Zuardi et al., 1982; Bhattacharyya et al., 2010). These findings led to the hypothesis that CBD could have antipsychotic properties. Accordingly, several pre-clinical studies have indicated that CBD induces antipsychotic-like effects (for review see Campos et al., 2012). These effects have also been described in open-label clinical studies (Zuardi et al., 1995, 2006) and recently confirmed in a controlled, randomized, double-blind clinical trial (Leweke et al., 2012). Nevertheless, the mechanism of action of CBD is poorly understood.

Animal models based on acute and chronic administration of N-methyl-D-aspartate-receptor (NMDAR) antagonists, such as phencyclidine (PCP), ketamine, and MK-801, are widely used to investigate the neurobiology of schizophrenia and the effects induced by compounds with antipsychotic properties (Javitt and Zukin, 1991; Rujescu et al., 2006; Bubenikova-Valesova et al., 2008). Although the pathophysiology of schizophrenia is quite complex, involving several neurotransmitters, evidence indicates the participation of the glutamatergic system. For example, administration of NMDAR antagonists in rodents and humans can evoke positive and negative symptoms, as well as cognitive deficits that resemble those seen in schizophrenia patients, supporting the proposal that this treatment could be a valid animal model of this disorder (Krystal et al., 1994, 2005; Lisman et al., 2008). Moreover, in laboratory animals, the effects induced by chronic administration of these antagonists, unlike those seen after acute injection, are proposed to more closely resemble the behavioral, neurochemical, and neuroanatomical changes observed in schizophrenia patients (Jentsch and Roth, 1999). Among these changes, a decrease in parvalbumin (PV) expression, a calcium-binding protein expressed in a subclass of fast-spiking GABAergic interneurons centrally involved in information processing in the brain, has been observed after chronic treatment with NMDAR antagonists in rodents (Abdul-Monim et al., 2007). This finding has been consistently observed in the post-mortem brains of schizophrenia patients (Lewis et al., 2005) and has been suggested to be a consequence of an NMDAR signaling hypofunction (Gonzalez-Burgos and Lewis, 2012).

The prepulse inhibition (PPI) test is a behavioral paradigm used to assess sensorimotor gating mechanisms. In a PPI test, a weaker non-startling stimulus (prepulse) presented at a short interval before a startling acoustic stimulus (pulse) reduces the processing of, and attenuates the response to, the latter stimulus (Braff and Geyer, 1990; Geyer et al., 2001). It was originally proposed by Graham (1975) that the prepulse triggers sensory-neuronal processing routines that need to be protected against disruption, leading to inhibition of the subsequent response to the startling stimulus. A disruption in this inhibitory processes is frequently observed in schizophrenia patients (Braff, Geyer, Light, et al., 2001), and in other psychiatric disorders as well (Braff, Geyer, and Swerdlow, 2001). Thus, although PPI deficit, even if experimentally induced, does not constitute an animal model of schizophrenia *per se*,

it is a valid model to investigate sensorimotor gating disruption similar to that seen in schizophrenia patients, with face, predictive, and construct validity (Swerdlow et al., 2000; Geyer et al., 2001).

Although there are acute studies indicating positive effects of CBD in NMDAR-based animal models of schizophrenia (Long et al., 2006; Gururajan et al., 2011, 2012), at the moment no study has investigated the effects of this drug in models based on repeated administration of NMDAR antagonists. Therefore, in the present study we investigated whether repeated treatment with CBD would attenuate behavioral changes in the PPI test induced by chronic administration of the NMDAR antagonist MK-801. We also measured changes in PV expression in brain structures related to the neurobiology of schizophrenia, such as the medial prefrontal cortex (mPFC), dorsal striatum (dSTR), nucleus accumbens (NAc) core and shell, and dorsal hippocampus (dentate gyrus; DG, CA1, and CA3). Since a decrease in PV expression has been related to hypofunction of NMDAR-mediated neurotransmission, we evaluated the mRNA expression of the NMDAR GluN1 subunit gene (GRN1). The GluN1 subunit is an obligatory subunit of NMDAR and, although changes in its expression have been associated with schizophrenia (Weickert et al., 2013), few studies have analyzed the effects of chronic blockade of these receptors on mRNA expression of this gene. Finally, as the brain sites of CBD antipsychotic-like effects are unknown, we decided to evaluate changes in FosB/ Δ FosB protein expression, a marker of neuronal activity. FosB/ Δ FosB accumulates and persists in a region-specific manner in the brain for relatively long periods due to its stability in response to different kinds of chronic stimuli, including repeated administration of antipsychotics (Atkins et al., 1999).

Material and Methods

Animals

The experiments were performed using male C57BL/6J mice that were 6 weeks of age at the beginning of the treatment. Animals were housed in groups of four per cage (41 x 33 x 17 cm) in a temperature-controlled room ($24.3 \pm 1^\circ\text{C}$) under standard laboratory conditions with free access to food and water and a 12h light/dark cycle (lights on at 6:00 AM). Procedures were conducted in conformity with the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior guidelines for the care and use of laboratory animals, which are in compliance with international laws and politics. The institution's Animal Ethics Committee approved the housing conditions and experimental procedures (process number: 165/2010).

Drugs

The following drugs were used: CBD (THC Pharm), clozapine (Tocris), and MK-801 (Sigma-Aldrich). CBD was diluted in 2% Tween 80 in saline, while clozapine was diluted in saline

supplemented with 30 µl of 0.1M hydrochloric acid; the pH was adjusted to a value close to neutrality when necessary. MK-801 was diluted in saline. The drugs were injected intraperitoneally (i.p.) in a 10mL/kg volume.

Experimental Design

Animals received daily i.p. injections of saline or MK-801 (0.1, 0.5, or 1 mg/kg) for 14, 21, or 28 days ($n = 6-8/\text{group}$). Twenty-four hours after the last injection, the animals were submitted to the PPI test. Based on the results of this experiment, we investigated whether repeated treatment with CBD (15, 30, and 60 mg/kg) or clozapine (1 mg/kg) would attenuate the PPI impairment induced by chronic treatment with MK-801 (1 mg/kg) for 28 days (Figure 1). CBD or clozapine treatment began on the 6th day after the start of MK-801 administration and continued until the end of the treatment ($n = 14/\text{group}$). One day later, animals were submitted to the PPI. CBD and clozapine were administered 30 min before MK-801 or saline. Immediately after the PPI test, animals were euthanized and their brains processed to assess changes in FosB/ Δ FosB and PV protein expression ($n = 7/\text{group}$) or NMDA-receptor GluN1 subunit gene mRNA expression ($n = 5-7/\text{group}$). The doses and the experimental design were based on previous studies (Long et al., 2006; Vigano et al., 2009; Casarotto et al., 2010; Elhardt et al., 2010; Guidali et al., 2011). We also tested the effects of a single CBD or clozapine administration in the last (28th) day of treatment with MK-801 in the PPI to test whether repeated CBD or clozapine administration would be required for the observed drug effects ($n = 7/\text{group}$; Supplementary Figure 1).

Mice showed a normal increase in body weight (measured every day) that was independent of treatment (Supplementary Figure 2).

Procedure

Pre-pulse Inhibition Test

The PPI test was performed according to a protocol previously described by our group (Issy et al., 2009). Briefly, it was conducted simultaneously in two identical startle response systems (Med Associates). A continuous acoustic signal provided a background white noise level of 65 ± 1 dB. The pulse (pulse alone) was a burst of white noise of 105 dB with a rise/decay of 5 ms and duration of 20 ms, and the prepulse intensities were set to 80, 85, and 90 dB of pure tone, 7 KHz frequency, and duration of 10 ms. The cages were calibrated before each test to ensure equal sensitivity of both response platforms

throughout the procedure. The platform calibration was done by adjusting the gain on the load cell amplifier to 150 arbitrary units at a standard weight appropriated for mice (40 g). The limits of the load cell were -2047 to $+2047$ arbitrary units. After a 5 min acclimatization period in which mice received no stimuli except the background noise, they were presented with a series of 10 stimuli (pulse alone). The first 10 pulse-alone trials allowed the within-session habituation to the startle stimulus and were not considered for statistical analysis of the percentage of PPI. The PPI test consisted of 64 trials pseudorandomly divided into eight different categories presented with an inter-stimulus interval of 30 s: pulse alone (105 dB); prepulse alone (80, 85, or 90 dB); prepulse + pulse with 100 ms interval between prepulse and pulse; and null, where no stimulus was presented. Prepulse stimulus did not elicit an acoustic startle response. Mean acoustic startle response to pulse-alone (P) trials and each prepulse + pulse (PP + P) trial was calculated for each subject. These data were used in the statistical analysis to assess drug-induced changes in startle amplitude and in PPI. The level of PPI was determined by expressing the PP + P startle amplitude as a percentage decrease from P startle amplitude, according to the following formula: $\%PPI = 100 - [100 \times (PP + P/P)]$. This transformation reduces statistical variability attributable to differences between animals and is a direct measure of the PPI level.

Immunohistochemical Detection of FosB/ Δ FosB and PV

Some animals, immediately after the exposure to the PPI, were deeply anesthetized with a lethal dose of urethane (25%, 5 mL/kg; i.p.) and transcardially perfused with phosphate buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer. Then, the brains were removed and post-fixed in 4% paraformaldehyde for 2 h. After that they were immersed in 30% sucrose in 0.1M phosphate buffer for cryoprotection over 48 h. The brains were frozen at -40°C on dry ice and isopentane and 25 µm-thick serial coronal sections were obtained using a cryostat microtome at -20°C (CM-1900, Leica). The free-floating sections were rinsed (3 times, 5 min each) in PBS 0.1M + 0.15% Triton-X (pH 7.4; washing buffer) and then pre-incubated for 30 min with 1% hydrogen peroxide in PBS to remove endogenous peroxidase activity. To avoid unspecific activity, free-floating sections were also incubated in a solution containing 5% bovine serum albumin, washing buffer, and 5% normal goat (FosB/ Δ FosB) or horse (PV) serum for 1 h. Sections were incubated overnight at 21°C with polyclonal rabbit anti-FosB/ Δ FosB antibodies (1:1000, H-75, sc-7203, Santa Cruz Biotechnology) or monoclonal mouse anti-PV antibodies (1:1000, P227, Sigma-RBI). Subsequent to the

Figure 1. Experimental design. The animals received daily i.p. injections of saline (SAL) or MK-801 (1 mg/kg) for 28 days. CBD (15, 30, and 60 mg/kg) or vehicle (VEH) treatment began on the 6th day after the start of MK-801 administration and continued until the end of the treatment. One day later, animals were submitted to the prepulse inhibition (PPI) test. Immediately after the PPI, their brains were removed and processed to assess immunohistochemical changes in FosB/ Δ FosB and parvalbumin (PV) expression and changes in mRNA expression of the NMDAR GluN1 subunit gene by RT-PCR. CBD effects were compared to those induced by the atypical antipsychotic clozapine (CLZ; 1 mg/kg).

primary antibody incubation, sections were successively washed (washing buffer) and incubated for 1 h in a secondary antibody solution (PBS) containing biotinylated goat anti-rabbit or horse anti-mouse antibodies (1:400; Vector Laboratories). The sections were then incubated with the avidin-biotin immunoperoxidase complex for 2 h (1:300, Vectastain ABC kit, Vector Lab). Afterwards, FosB/ Δ FosB and PV-like immunoreactivity were revealed by the addition of chromogen diaminobenzidine (DAB; Sigma-Aldrich) into acetate buffer, H₂O₂ 0.02%, and nickel ammonium sulfate 1% or DAB into Tris-buffered saline and H₂O₂ 0.02%, respectively. All the reactions were performed at the temperature of 21°C.

Slides immunostaining for PV or FosB/ Δ FosB were observed under phase contrast microscopy (Olympus BX50, Olympus). The microscope has an attached camera (Olympus DP72, Olympus) that captured the images for analysis with the help of the Image Pro-Plus 6.0 software (Mediacybernetics). The follow brain structures were evaluated: mPFC, dSTR, NAc core, and shell and dorsal hippocampus (DG, CA1, and CA3).

Quantification of PV or FosB/ Δ FosB-positive cells was made with the 10X or 20X objective, respectively. An observer blinded to group assignment performed the analysis. For each brain structure, 3–4 tissue sections from each animal were analyzed. All stained cells in the whole area of each brain region of interest were recorded (FosB/ Δ FosB-mPFC: approximately 0.068 mm²; dSTR and NAc core and shell: 0.076 mm²; DG: 0.062 mm²; CA1: 0.020 mm²; CA3: 0.024 mm²; PV-mPFC: approximately 0.27 mm²; dSTR and NAc core and shell: 0.30 mm²; DG: 0.062 mm²; CA1: 0.020 mm²; CA3: 0.024 mm²). Immunoreactive cells were counted using ImageJ software (Research Services Branch, National Institutes of Health). Those cells with purple or brown impregnations with areas between 10 and 80 μ m² were considered FosB/ Δ FosB- and PV-positive cells, respectively. As the brain structures evaluated are bilateral; the mean value was calculated. The results were expressed as the number of positive cells/0.1 mm². Neuroanatomical sites were identified with the help of the Franklin and Paxinos mouse brain atlas (Franklin and Paxinos, 2008). The anterior–posterior localization from bregma of the analyzed regions was: mPFC, 1.98–1.70 mm; dSTR and NAc core and shell, 1.54–0.98 mm; and dorsal hippocampus, -1.82 to -2.30 mm.

Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Animals were deeply anesthetized with a lethal dose of urethane (25%, 5 mL/kg; i.p.) and decapitated immediately after the exposure to the PPI. After decapitation, the frontal cortex, striatum, and hippocampus were collected by microdissection in RNase-free conditions and stored at -80°C until RNA isolation. Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen), and cDNA reaction was performed using 1 μ g of total RNA in a high-capacity cDNA kit (Applied Biosystem) according to the

manufacturer's instructions. The relative level of mRNA expression of the NMDAR GluN1 subunit gene (GRN1) was evaluated in the StepOne real-time PCR system, using Applied Biosystems real-time master mix with Taqman® gene expression probes (Assay ID Mm01212171_s1). Total RNA was normalized based on Ct values for the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) housekeeping gene (Assay ID Mm99999915_g1). All reactions were duplicated, and fold change was calculated using the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method. Data are shown as a relative percentage of mRNA expression to the control group.

Statistical Analysis

The PPI results were analyzed by mixed-design analysis of variance (ANOVA) with treatment as the main independent factor and prepulse intensity (80, 85, and 90 dB) as the repeated factor. The immunohistochemical data were analyzed by two-way ANOVA using the first (vehicle, CBD, or clozapine) and the second (MK-801 or saline) treatment as main factors. In cases of significant interactions between factors, specific one-way ANOVAs were performed. The Student-Newman-Keuls (S-N-K) test was used for post hoc analysis. mRNA expression results failed to reach homogeneity of variances and were analyzed by Kuskal-Wallis followed by the Dunn test. All data are represented as the mean $\pm$ the standard error of mean (SEM). Results of statistical tests with $p < 0.05$ were considered significant. Since there was no difference in PPI and immunohistochemical results between animals that received Tween80 2% in saline (used to dissolve CBD) + saline or saline supplemented with 30 μ l of 0.1 M hydrochloric acid (used to dissolve clozapine) + saline, they were joined together in a control group (vehicle + saline).

Results

Effects of NMDAR Antagonist MK-801 for 14, 21 or 28 days on PPI

There was a significant treatment effect only after 28 days of repeated drug administration, where animals treated with MK-801 1 mg/kg had a greater PPI impairment compared to all other groups ($F_{3,25} = 5.36$, $p = 0.005$; S-N-K., $p < 0.05$; Figure 2). There was also a significant effect of intensity at all measurements, with louder prepulse stimuli causing greater PPI ($F_{2,50} = 40.39$ – 40.9 , $p < 0.001$; Figure 2), but there was no significant interaction between treatment and prepulse intensity ($F_{6,50} = 1.55$, $p > 0.05$). MK-801 treatment for 14, 21, or 28 days did not modify the acoustic startle response to the pulse-only trials, which would be indicative of a motor-impairing effect (Supplementary Table 1).

Figure 2. Mice received daily i.p. injections of saline or MK-801 (0.1, 0.5, or 1 mg/kg) for 14, 21, or 28 days. Twenty-four hours after the last injection, the animals were submitted to the PPI test. MK-801 (1 mg/kg) disrupted PPI only after 28 days of treatment ($n = 6$ – 8 /group). The data are presented as the mean $\pm$ SEM. *A general treatment effect: $p < 0.05$ vs. all other groups using a mixed-design ANOVA followed by S-N-K.

CBD and Clozapine Effects on PPI Impairment Induced by MK-801

Both CBD (30 and 60mg/kg) and clozapine attenuated the PPI disruption induced by treatment with MK-801 for 28 days (Figure 3). Mixed-design ANOVA indicated significant effects of prepulse intensity ($F_{2,208} = 103.4$, $p < 0.001$) and treatment ($F_{7,104} = 4.6$, $p < 0.001$). There was also an interaction between prepulse intensity and treatment ($F_{14,208} = 2.35$, $p = 0.005$). One-way ANOVA analyses conducted at each prepulse intensity showed significant effects at 85 dB ($F_{7,104} = 5.75$, $p < 0.001$) and 80 dB ($F_{7,104} = 4.09$, $p = 0.001$). At 85 dB animals treated with vehicle + MK-801 showed a significant impairment of PPI compared to control (vehicle + saline), an effect not prevented by clozapine or CBD (S-N-K, $p < 0.05$). At 80 dB, however, PPI impairment induced by MK-801 was attenuated by clozapine and CBD (30mg/kg). Moreover, animals treated with CBD (60mg/kg) + MK-801 presented a significantly lower PPI impairment compared to those receiving vehicle + MK-801 (S-N-K, $p < 0.05$).

The treatments did not modify the acoustic startle response to the pulse-only trials (Supplementary Table 2).

We also observed that CBD or clozapine administration given once on the last day of MK-801 treatment did not attenuate the chronic MK-801-induced PPI impairment (Supplementary Figure 3), indicating that CBD and clozapine effects seem to depend on the repeated treatment and are not due to the last injection of these drugs.

Changes in FosB/ Δ FosB Expression in Specific Brain Regions

Quantification of FosB/ Δ FosB-positive cells in the mPFC revealed significant effects of the first (vehicle, clozapine, or CBD; $F_{2,36} = 4.00$, $p = 0.02$) and second treatments (saline or MK-801; $F_{1,36} = 4.84$, $p = 0.034$) and an interaction between them ($F_{2,36} = 4.39$, $p = 0.02$; Figure 4A and B). Post hoc analysis showed that animals treated with vehicle + MK-801 had a significantly higher number of FosB/ Δ FosB-positive cells compared to all other groups (S-N-K, $p < 0.05$). Neither CBD (60mg/kg) nor clozapine affected FosB/ Δ FosB expression in the mPFC per se ($p > 0.05$).

In the NAc core, there were also significant effects of the first (vehicle, clozapine, or CBD; $F_{2,36} = 5.11$, $p = 0.01$) and second treatments (saline or MK-801; $F_{1,36} = 14.23$, $p = 0.001$) and an interaction between them ($F_{2,36} = 3.93$, $p = 0.03$; Figure 4C and D). It was observed an increase in the number of FosB/ Δ FosB-positive cells in the NAc core of vehicle + MK-801-treated mice compared to control (vehicle + saline group, S-N-K, $p < 0.05$). Different from the mPFC, clozapine and CBD were unable to attenuate the MK-801-induced changes in the NAc core (S-N-K,

Figure 3. CBD (30 and 60mg/kg) attenuated the PPI impairment induced by repeated treatment with MK-801 (1mg/kg) for 28 days. Similar to CBD, clozapine (CLZ; 1mg/kg) attenuated the MK-801-induced PPI disruption ($n = 14$ /group). The data are presented as the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs. VEH + SAL group, # $p < 0.05$ vs. VEH + MK-801 group; mixed-design ANOVA followed by S-N-K.

$p < 0.05$). Clozapine per se also induced an increase in the number of FosB/ Δ FosB-positive cells (S-N-K, $p < 0.05$), but CBD did not induce any change by itself (S-N-K, $p > 0.05$).

No change in FosB/ Δ FosB expression was observed in the dSTR, NAc shell, DG, CA1, or CA3 (Supplementary Figure 4).

Changes in PV Expression in Specific Brain Regions

MK-801 induced a decrease in PV expression in the mPFC. This change was attenuated by concomitant treatment with CBD or clozapine. There was a tendency for a significant effect of the first treatment ($F_{2,36} = 3.06$, $p = 0.060$), a significant effect of the second treatment ($F_{1,36} = 10.41$, $p = 0.003$), and an interaction between the treatments ($F_{2,36} = 4.76$, $p = 0.015$; Figure 5). Animals treated with vehicle + MK-801 presented a decrease in the number of PV-positive cells compared to control (vehicle + saline; S-N-K, $p < 0.05$), a change attenuated by CBD and clozapine. Neither CBD nor clozapine affected PV expression in the mPFC (S-N-K, $p > 0.05$).

No change in the PV expression was observed in the dSTR, DG, CA1, or CA3 (Supplementary Figure 5). Moreover, PV immunostaining was poorly detected in the NAc, indicating that PV may be expressed at levels below the limit of detection within the NAc core and shell. Indeed, low levels of PV-positive cells in the NAc were observed by Todtenkopf et al. (2004) in rats.

Changes in mRNA Expression of GRN1 in Specific Brain Regions

Animals treated with vehicle + MK-801 presented a significantly lower mRNA expression in the hippocampus compared to controls (vehicle + saline; $\chi^2 = 16.4$, d.f. = 5, $p = 0.006$; Dunn test, $p < 0.05$; Figure 6). These effects were attenuated by CBD and clozapine. The treatments did not modify GluR1 mRNA expression in the frontal cortex and striatum ($p > 0.05$; Figure 6).

Discussion

Corroborating the proposal that repeated administration of NMDAR antagonists could be a useful animal model of schizophrenia, the results of the present study show that repeated administration of the NMDAR antagonist MK-801 for 28 days impaired PPI performed 24h after the end of the treatment. No effect was observed after 14 or 21 days of MK-801 treatment. These results are consistent with those indicating a lack of PPI impairment after repeated treatment with the NMDAR antagonist PCP for 14 days (Martinez et al., 1999) and those showing cognitive deficits after 28 days of chronic intermittent PCP treatment (Vigano et al., 2009; Guidali et al., 2011). Besides the PPI disruption, chronic MK-801 treatment also decreased the number of PV-positive cells in the mPFC and the mRNA levels of the NMDAR GluN1 subunit gene (GRN1) in the hippocampus. These molecular changes are proposed to be similar to those observed in schizophrenia patients (Lewis et al., 2005; Weickert et al., 2013). In addition, MK-801 treatment also increased the number of FosB/ Δ FosB-positive cells in the mPFC and NAc core. Both the behavioral and molecular changes induced by MK-801 treatment were attenuated by repeated treatment with CBD or the atypical antipsychotic clozapine.

The effects of clozapine and CBD on improving the PPI deficits were seen only at the 80 dB prepulse intensity. This is not an uncommon finding, since drug effects may vary across prepulse intensities in the PPI session. Significant effects of the prepulse

Figure 4. Effects of chronic MK-801 (1 mg/kg), clozapine (CLZ; 1 mg/kg), and CBD (60 mg/kg) treatment on FosB/ Δ FosB protein expression in the mice mPFC (A and B) and NAc core (C and D). MK-801 induced a significant increase in the number of FosB/ Δ FosB-positive cells in the mPFC (A) and NAc core (C). CBD and clozapine blocked FosB/ Δ FosB increase in the mPFC, but did not modify FosB/ Δ FosB increase in the NAc core. Clozapine also induced an increase in the number of FosB/ Δ FosB-positive cells in the NAc core (C). The data are presented as the mean $\pm$ SEM ($n = 7$ /group). * $p < 0.05$ vs. VEH + SAL group; two-way ANOVA followed by S-K-N test. Photomicrographs of FosB/ Δ FosB-like immunoreactivity (20X; Bar = 100 μ m) in the mPFC (B) and NAc core (D).

Figure 5. Effects of chronic MK-801 (1 mg/kg), clozapine (CLZ; 1 mg/kg), and CBD (60 mg/kg) treatment on PV protein expression in mouse mPFCs ($n = 7$ /group). (A) MK-801 induced a decrease in the number of PV-positive cells in the mPFC. CBD and clozapine attenuated PV decrease in the mPFC. The data are presented as the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs. VEH + SAL group, # $p < 0.05$ vs. VEH + MK-801 group; two-way ANOVA followed by S-K-N test. (B) Photomicrographs of PV-like immunoreactivity in the mPFC (10X; Bar = 200 μ m). CC: corpus callosum; mPFC: medial prefrontal cortex.

Figure 6. Effects of chronic MK-801 (1 mg/kg), clozapine (CLZ; 1 mg/kg), and CBD (60 mg/kg) treatment on mRNA expression of the NMDAR GluN1 subunit gene (GRN1) in the (A) frontal cortex, (B) striatum, and (C) hippocampus. The data are presented as the mean $\pm$ SEM ($n = 5-7$ /group). * $p < 0.05$ vs. VEH + SAL group; Kuskal-Wallis followed by the Dunn test.

intensity are usually seen (Blumenthal, 1996; Swerdlow et al., 2003, 2007; Yee et al., 2005; Larrauri and Schmajuk, 2006; Issy et al., 2009). The biological significance of this sound-parameter dependence is not completely understood, but the novelty or the context associated with the preceding signal (prepulse) appears to be a critical factor (Blumenthal and Levey, 1989; Lane et al., 1991).

The present results are consistent with previous studies showing a beneficial effect of CBD on PPI deficits in schizophrenia-like models that employ acute drug administration (Long et al., 2006; Levin et al., 2014). They also indicate, however, that repeated treatment with CBD is necessary to counteract the PPI deficit induced by chronic MK-801. Moreover, contrary to the study by Long et al. (2012) showing tolerance after chronic CBD treatment for the PPI deficits presented by transgenic mice (Nrg1 TM HET), our results suggest that CBD repeated treatment does not induce tolerance.

Typical antipsychotics, such as haloperidol, seem to be unable to reverse behavioral changes induced by NMDAR antagonists in rodents. Atypical antipsychotics such as clozapine, olanzapine, and quetiapine, on the other hand, are effective in attenuating those changes (Geyer et al., 2001). Accordingly, CBD attenuation of PPI impairment induced by repeated MK-801 administration was similar to that produced by clozapine. Indeed, previous studies from our group suggest that CBD exhibits a profile similar to atypical antipsychotic drugs. For example, it does not induce catalepsy (Zuadi et al., 1991; Moreira and Guimaraes, 2005), a characteristic extrapyramidal motor effect induced by typical antipsychotics. Moreover, similar to clozapine, a single CBD administration in rats induced c-Fos protein expression, a marker of neuronal activation, in the NAc and mPFC, but not in the striatum (Guimaraes et al., 2004). Despite these results, no study had investigated the pattern of neuronal activation induced by repeated treatment with CBD. Moreover, even if NMDAR antagonists alter cell activity in several structures involved in the neurobiology of schizophrenia and modulation of sensorimotor gating, such as the PFC, hippocampus, and NAc (Duncan et al., 1998), the brain regions involved in the effects induced by repeated administration of these drugs are not completely known. Therefore, we decided to investigate FosB/ Δ FosB protein expression in the aforementioned brain structures. Whereas c-Fos and most of the other Fos-related proteins are highly unstable and therefore rapidly disappear after the stimulus, FosB and its truncated splice variant Δ FosB accumulate in specific brain regions after repeated exposure to several stimuli (Nestler et al., 1999). Once induced, these proteins are stable and persist in the brain for weeks after the original stimulus (Nestler et al., 1999). Thus, levels of FosB/ Δ FosB may vary regionally (depending on neuronal activity in

normal animals) and/or be markedly influenced by drug treatment or neurological disorders.

We observed an increase in FosB/ Δ FosB expression in the mPFC and NAc core of animals repeatedly treated with MK-801. Concomitant treatment with CBD or clozapine attenuated the changes induced by MK-801 in the mPFC, but not in the NAc core. However, even if CBD exhibits a pre-clinical and clinical profile similar to clozapine from a phenotypic point of view, the mechanisms involved could be rather distinct. This could help to explain some differences observed in our study. For example, while CBD did not change FosB/ Δ FosB expression per se, clozapine increased this expression in the NAc core. This latter effect partially corroborated previous findings in the literature (Rodriguez et al., 2001; Grande et al., 2004). Contrary to other studies (Kontkanen et al., 2002), however, clozapine failed to increase FosB/ Δ FosB expression in the mPFC and NAc shell. The reasons for these differences are unknown but could depend on different species, treatment schedules, and doses.

The mechanisms involved in the increase of FosB/ Δ FosB expression in the mPFC induced by MK-801 are not completely understood. However, increased glutamate levels after long-term treatment with NMDAR antagonists have been described in this brain region (Moghaddam et al., 1997; Wang et al., 2000). It may depend on the blockade of a tonic inhibitory influence of GABAergic interneurons over excitatory projections to the mPFC (Moghaddam et al., 1997; Krystal et al., 2003; Jodo et al., 2005), leading to a disinhibition of glutamate release from neurons targeted by those interneurons (Olney and Farber, 1995; Adams and Moghaddam, 1998). NMDAR blockade, therefore, may cause overall cortical excitation by disinhibiting glutamatergic pyramidal neurons. Indeed, neuroimaging data suggest that the schizophrenia-like symptoms caused by NMDAR antagonists are associated with frontal cortical activation (Lahti et al., 1995; Breier et al., 1997).

Increased FosB/ Δ FosB expression has also been associated with neuroplastic/adaptive changes induced by chronic stimuli that promote synaptic remodeling, including repeated administration of antipsychotics, stress stimuli, and reward stimuli (Atkins et al., 1999; Nestler et al., 1999; Lobo et al., 2013). Moreover, viral-mediated overexpression of Δ FosB in mouse PFC induced cognitive deficits (Dietz et al., 2014). These results suggest that changes in FosB/ Δ FosB expression, in addition to indicating cellular activation after repeated stimuli, could also have functional consequences. Additional studies are clearly needed to address this question.

Another potentially important finding of the present study was the significant reduction in PV immunoreactivity induced by repeated MK-801 treatment in the mPFC, an effect attenuated

by CBD. A more robust attenuation was induced by clozapine. Decreased GABAergic signaling is among the most consistent postmortem pathological changes observed in schizophrenia (Reynolds et al., 2002; Lewis et al., 2005). These deficits are largely restricted to GABAergic PV-positive interneurons (Lewis et al., 2005). It has been suggested that the PV interneuron dysfunction in schizophrenia could result from a hypofunction of NMDAR-mediated signaling (Belforte et al., 2010; Moreau and Kullmann, 2013). These neurons synapse on the cell body or the axon initial segment of glutamatergic neurons, where they regulate pyramidal cell output. Furthermore, it is likely that a reduction in PV interneuron functionality results not only in a decreased inhibitory control over pyramidal cell activity, but also a reduction in the coordinated activity of large brain networks leading, for example, to a loss of the dopaminergic neurotransmission regulation (Schwartz et al., 2012). Changes in PV expression in the mPFC induced by MK-801, therefore, could contribute to increased neuronal activity in the mPFC and NAC core, reflected by the increase in the number of FosB/ Δ FosB-positive cells. Importantly, a decrease in PV immunoreactivity appears to be associated with reduced expression of PV protein, but not with a reduced number of PV interneurons (Hashimoto et al., 2003).

A decrease in the number of PV-positive cells is also consistently observed in a diverse variety of animal models of schizophrenia (Penschuck et al., 2006; Harte et al., 2007), including repeated treatment with other NMDAR antagonists (Abdul-Monim et al., 2007; Amitai et al., 2012). Repeated ketamine treatment decreases PV levels in GABAergic interneurons in vitro and in the mouse PFC (Behrens et al., 2007). mRNA levels of PV gene were also reduced in the PFCs of mice (Cochran et al., 2003) and monkeys (Morrow et al., 2007) after repeated PCP administration. Similar to our findings, Amitai et al. (2012) observed that repeated treatment with clozapine prevented the cognitive deficits and reduced PV expression in the PFC following repeated PCP treatment. Based on these pieces of evidence, it is possible to speculate that the attenuation of PV changes and MK-801-induced PPI impairment by CBD and clozapine could be related. Moreover, the decrease in PV-positive cells was restricted to the mPFC. Since this region is thought to modulate, rather than mediate, PPI (Swerdlow et al., 2001), this result suggests that CBD effects depend on changes in modulatory PPI processes.

Even if changes in mRNA expression are difficult to interpret in the absence of information on the levels of the corresponding protein, our results suggest that chronic blockade of NMDAR decreases mRNA expression of the NMDAR obligatory GluN1 subunit. Changes in mRNA expression of the GluN1 subunit gene have already been reported in the post mortem brains of schizophrenia patients (Gao et al., 2000; Law and Deakin, 2001; Weickert et al., 2013). Few studies, however, have investigated the effects of repeated treatment with NMDAR antagonists on these changes. In our study, repeated MK-801 treatment decreased GluN1 mRNA expression in the hippocampus, but not in the frontal cortex and striatum, an effect that was also attenuated by CBD and clozapine. Even if contradictory results exist in the literature (Rujescu et al., 2006), reduction in mRNA expression of this subunit in the hippocampus of schizophrenia patients has been reported (Gao et al., 2000; Law and Deakin, 2001). In addition, a study using a single photon emission tomography ligand for NMDAR revealed that medication-free schizophrenia patients had lower NMDAR binding in the left hippocampus, a change not observed in clozapine-treated patients (Pilowsky et al., 2006).

In conclusion, the present results indicate specific behavioral and molecular changes induced by chronic administration of the NMDAR antagonist MK-801. Repeated CBD treatment, similar to the atypical antipsychotic clozapine, reversed or attenuated MK-801-induced behavioral psychotomimetic-like effects and the associated molecular changes. These results are consistent with the proposal that CBD may have antipsychotic properties.

Supplementary Material

For supplementary material accompanying this paper, visit <http://www.ijnp.oxfordjournals.org/>

Acknowledgments

The authors thank José Carlos de Aguiar and Celia A. da Silva for technical assistance. FVG has a FAPESP fellowship (2010/17343-0). Research was supported by grants from FAPESP and CNPq.

Statement of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Abdul-Monim, Z, Neill, JC, Reynolds, GP (2007) Sub-chronic psychotomimetic phencyclidine induces deficits in reversal learning and alterations in parvalbumin-immunoreactive expression in the rat. *J Psychopharmacol* 21(2):198–205.
- Adams, B, Moghaddam, B (1998) Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. *J Neurosci* 18(14):5545–5554.
- Amitai, N, Kuczenski, R, Behrens, MM, Markou, A (2012) Repeated phencyclidine administration alters glutamate release and decreases GABA markers in the prefrontal cortex of rats. *Neuropharmacology* 62(3):1422–1431.
- Atkins, JB, Chlan-Fourney, J, Nye, HE, Hiroi, N, Carlezon, WA, Jr., Nestler, EJ (1999) Region-specific induction of deltaFosB by repeated administration of typical versus atypical antipsychotic drugs. *Synapse* 33(2):118–128.
- Behrens, MM, Ali, SS, Dao, DN, Lucero, J, Shekhtman, G, Quick, KL, Dugan, LL (2007) Ketamine-induced loss of phenotype of fast-spiking interneurons is mediated by NADPH-oxidase. *Science* 318(5856):1645–1647.
- Belforte, JE, Zsiros, V, Sklar, ER, Jiang, Z, Yu, G, Li, Y, Quinlan, EM, Nakazawa, K (2010) Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat Neurosci* 13(1):76–83.
- Bhattacharyya, S, Morrison, PD, Fusar-Poli, P, Martin-Santos, R, Borgwardt, S, Winton-Brown, T, Nosarti, C, O'Carroll, CM, Seal, M, Allen, P, Mehta, MA, Stone, JM, Tunstall, N, Giampietro, V, Kapur, S, Murray, RM, Zuardi, AW, Crippa, JA, Atakan, Z, McGuire, PK (2010) Opposite effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human brain function and psychopathology. *Neuropsychopharmacology* 35(3):764–774.
- Blumenthal, TD (1996) Inhibition of the human startle response is affected by both prepulse intensity and eliciting stimulus intensity. *Biol Psychology* 44(2):85–104.
- Blumenthal, TD, Levey, BJ (1989) Prepulse rise time and startle reflex modification: Different effects for discrete and continuous prepulses. *Psychophysiology* 26(2):158–165.

- Braff, DL, Geyer, MA (1990) Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies. *Arch Gen Psychiatry* 47(2):181–188.
- Braff, DL, Geyer, MA, Light, GA, Sprock, J, Perry, W, Cadenhead, KS, Swerdlow, NR (2001) Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Schizophr Res* 49(1–2):171–178.
- Braff, DL, Geyer, MA, Swerdlow, NR (2001) Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology (Berl)* 156(2–3):234–258.
- Breier, A, Malhotra, AK, Pinals, DA, Weisenfeld, NI, Pickar, D (1997) Association of ketamine-induced psychosis with focal activation of the prefrontal cortex in healthy volunteers. *Am J Psych* 154(6):805–811.
- Bubenikova-Valesova, V, Horacek, J, Vrajova, M, Hoschl, C (2008) Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 32(5):1014–1023.
- Campos, AC, Moreira, FA, Gomes, FV, Del Bel, EA, Guimaraes, FS (2012) Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Phil Trans R Soc B* 367(1607):3364–3378.
- Casarotto, PC, Gomes, FV, Resstel, LB, Guimaraes, FS (2010) Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. *Behav Pharmacol* 21(4):353–358.
- Cochran, SM, Kennedy, M, McKerchar, CE, Steward, LJ, Pratt, JA, Morris, BJ (2003) Induction of metabolic hypofunction and neurochemical deficits after chronic intermittent exposure to phencyclidine: differential modulation by antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology* 28(2):265–275.
- Dietz, DM, Kennedy, PJ, Sun, H, Maze, I, Gancarz, AM, Vialou, V, Koo, JW, Mouzon, E, Ghose, S, Tamminga, CA, Nestler, EJ (2014) DeltaFosB induction in prefrontal cortex by antipsychotic drugs is associated with negative behavioral outcomes. *Neuropsychopharmacology* 39(3):538–544.
- Duncan, GE, Leipzig, JN, Mailman, RB, Lieberman, JA (1998) Differential effects of clozapine and haloperidol on ketamine-induced brain metabolic activation. *Brain Res* 812(1–2):65–75.
- Elhardt, M, Martinez, L, Tejada-Simon, MV (2010) Neurochemical, behavioral and architectural changes after chronic inactivation of NMDA receptors in mice. *Neurosci Lett* 468(2):166–171.
- Franklin KBJ, Paxinos G (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 3th ed. New York: Academic Press.
- Gao, XM, Sakai, K, Roberts, RC, Conley, RR, Dean, B, Tamminga, CA (2000) Ionotropic glutamate receptors and expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in subregions of human hippocampus: effects of schizophrenia. *Am J Psych* 157(7):1141–1149.
- Geyer, MA, Krebs-Thomson, K, Braff, DL, Swerdlow, NR (2001) Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* 156(2–3):117–154.
- Gonzalez-Burgos, G, Lewis, DA (2012) NMDA receptor hypofunction, parvalbumin-positive neurons, and cortical gamma oscillations in schizophrenia. *Schizophr Bull* 38(5):950–957.
- Graham, FK (1975) The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology* 12(3):238–248.
- Grande, C, Zhu, H, Martin, AB, Lee, M, Ortiz, O, Hiroi, N, Moratalla, R (2004) Chronic treatment with atypical neuroleptics induces striosomal FosB/DeltaFosB expression in rats. *Biol Psychiatry* 55(5):457–463.
- Guidali, C, Vigano, D, Petrosino, S, Zamberletti, E, Realini, N, Binelli, G, Rubino, T, Di Marzo, V, Parolaro, D (2011) Cannabinoid CB1 receptor antagonism prevents neurochemical and behavioural deficits induced by chronic phencyclidine. *Int J Neuropsychopharmacology* 14(1):17–28.
- Guimaraes, VM, Zuardi, AW, Del Bel, EA, Guimaraes, FS (2004) Cannabidiol increases Fos expression in the nucleus accumbens but not in the dorsal striatum. *Life Sci* 75(5):633–638.
- Gururajan, A, Taylor, DA, Malone, DT (2011) Effect of cannabidiol in a MK-801-rodent model of aspects of schizophrenia. *Behav Brain Res* 222(2):299–308.
- Gururajan, A, Taylor, DA, Malone, DT (2012) Cannabidiol and clozapine reverse MK-801-induced deficits in social interaction and hyperactivity in Sprague-Dawley rats. *J Psychopharmacol* 26(10):1317–1332.
- Harte, MK, Powell, SB, Swerdlow, NR, Geyer, MA, Reynolds, GP (2007) Deficits in parvalbumin and calbindin immunoreactive cells in the hippocampus of isolation reared rats. *J Neural Transm* 114(7):893–898.
- Hashimoto, T, Volk, DW, Eggen, SM, Mirnics, K, Pierri, JN, Sun, Z, Sampson, AR, Lewis, DA (2003) Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J Neurosci* 23(15):6315–6326.
- Issy, AC, Salum, C, Del Bel, EA (2009) Nitric oxide modulation of methylphenidate-induced disruption of prepulse inhibition in Swiss mice. *Behav Brain Res* 205(2):475–481.
- Javitt, DC, Zukin, SR (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psych* 148(10):1301–1308.
- Jentsch, JD, Roth, RH (1999) The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20(3):201–225.
- Jodo, E, Suzuki, Y, Katayama, T, Hoshino, KY, Takeuchi, S, Niwa, S, Kayama, Y (2005) Activation of medial prefrontal cortex by phencyclidine is mediated via a hippocampo-prefrontal pathway. *Cereb Cortex* 15(5):663–669.
- Kontkanen, O, Lakso, M, Wong, G, Castren, E (2002) Chronic antipsychotic drug treatment induces long-lasting expression of fos and jun family genes and activator protein 1 complex in the rat prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 27(2):152–162.
- Krystal, JH, Karper, LP, Seibyl, JP, Freeman, GK, Delaney, R, Bremner, JD, Heninger, GR, Bowers, MB, Jr., Charney, DS (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51(3):199–214.
- Krystal, JH, D'Souza, DC, Mathalon, D, Perry, E, Belger, A, Hoffman, R (2003) NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology (Berl)* 169(3–4):215–233.
- Krystal, JH, Perry, EB, Jr., Gueorguieva, R, Belger, A, Madonick, SH, Abi-Dargham, A, Cooper, TB, Macdougall, L, Abi-Saab, W, D'Souza, DC (2005) Comparative and interactive human psychopharmacologic effects of ketamine and amphetamine: implications for glutamatergic and dopaminergic model psychoses and cognitive function. *Arch Gen Psychiatry* 62(9):985–994.
- Lahti, AC, Holcomb, HH, Medoff, DR, Tamminga, CA (1995) Ketamine activates psychosis and alters limbic blood flow in schizophrenia. *Neuroreport* 6(6):869–872.
- Lane, SJ, Ornitz, EM, Guthrie, D (1991) Modulatory influence of continuous tone, tone offset, and tone onset on the human acoustic startle response. *Psychophysiology* 28(5):579–587.
- Larrauri J, Schmajuk N (2006) Prepulse inhibition mechanisms and cognitive processes: a review and model. *EXS* 98:245–278.

- Law, AJ, Deakin, JF (2001) Asymmetrical reductions of hippocampal NMDAR1 glutamate receptor mRNA in the psychoses. *Neuroreport* 12(13):2971–2974.
- Levin, R, Peres, FF, Almeida, V, Calzavara, MB, Zuardi, AW, Hallak, JE, Crippa, JA, Abílio, VC (2014) Effects of cannabinoid drugs on the deficit of prepulse inhibition of startle in an animal model of schizophrenia: the SHR strain. *Front Pharmacol* 5:10.
- Leweke, FM, Piomelli, D, Pahlisch, F, Muhl, D, Gerth, CW, Hoyer, C, Klosterkotter, J, Hellmich, M, Koethe, D (2012) Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry* 2:e94.
- Lewis, DA, Hashimoto, T, Volk, DW (2005) Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6(4):312–324.
- Lisman, JE, Coyle, JT, Green, RW, Javitt, DC, Benes, FM, Heckers, S, Grace, AA (2008) Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci* 31(5):234–242.
- Lobo, MK, et al. (2013) DeltaFosB Induction in Striatal Medium Spiny Neuron Subtypes in Response to Chronic Pharmacological, Emotional, and Optogenetic Stimuli. *J Neurosci* 33(47):18381–18395.
- Long, LE, Malone, DT, Taylor, DA (2006) Cannabidiol reverses MK-801-induced disruption of prepulse inhibition in mice. *Neuropsychopharmacology* 31(4):795–803.
- Long, LE, Chesworth, R, Huang, XF, Wong, A, Spiro, A, McGregor, IS, Arnold, JC, Karl T (2012) Distinct neurobehavioural effects of cannabidiol in transmembrane domain neuregulin 1 mutant mice. *PLOS ONE* 7(4):e34129.
- Martinez, ZA, Ellison, GD, Geyer, MA, Swerdlow, NR (1999) Effects of sustained phencyclidine exposure on sensorimotor gating of startle in rats. *Neuropsychopharmacology* 21(1):28–39.
- Moghaddam, B, Adams, B, Verma, A, Daly, D (1997) Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 17(8):2921–2927.
- Moreau, AW, Kullmann, DM (2013) NMDA receptor-dependent function and plasticity in inhibitory circuits. *Neuropharmacology* 74:23–31.
- Moreira, FA, Guimaraes, FS (2005) Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. *Eur J Pharmacol* 512(2–3):199–205.
- Morrow, BA, Elsworth, JD, Roth, RH (2007) Repeated phencyclidine in monkeys results in loss of parvalbumin-containing axo-axonic projections in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* 192(2):283–290.
- Nestler, EJ, Kelz, MB, Chen, J (1999) DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Res* 835(1):10–17.
- Olney, JW, Farber, NB (1995) Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 52(12):998–1007.
- Penschuck, S, Flagstad, P, Didriksen, M, Leist, M, Michael-Titus, AT (2006) Decrease in parvalbumin-expressing neurons in the hippocampus and increased phencyclidine-induced locomotor activity in the rat methylazoxymethanol (MAM) model of schizophrenia. *Eur J Neurosci* 23(1):279–284.
- Pilowsky, LS, Bressan, RA, Stone, JM, Erlandsson, K, Mulligan, RS, Krystal, JH, Ell, PJ (2006) First in vivo evidence of an NMDA receptor deficit in medication-free schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 11(2):118–119.
- Reynolds, GP, Beasley, CL, Zhang, ZJ (2002) Understanding the neurotransmitter pathology of schizophrenia: selective deficits of subtypes of cortical GABAergic neurons. *J Neural Transm* 109(5–6):881–889.
- Rodriguez, JJ, Garcia, DR, Nakabeppu, Y, Pickel, VM (2001) Enhancement of laminar FosB expression in frontal cortex of rats receiving long chronic clozapine administration. *Exp Neurol* 168(2):392–401.
- Rujescu, D, Bender, A, Keck, M, Hartmann, AM, Ohl, F, Raeder, H, Giegling, I, Genius, J, McCarley, RW, Moller, HJ, Grunze, H (2006) A pharmacological model for psychosis based on N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction: molecular, cellular, functional and behavioral abnormalities. *Biol Psychiatry* 59(8):721–729.
- Schwartz, TL, Sachdeva, S, Stahl, SM (2012) Glutamate neurocircuitry: theoretical underpinnings in schizophrenia. *Front Pharmacol* 3:195.
- Swerdlow, NR, Braff, DL, Geyer, MA (2000) Animal models of deficient sensorimotor gating: what we know, what we think we know, and what we hope to know soon. *Behav Pharmacol* 11(3–4):185–204.
- Swerdlow, NR, Geyer, MA, Braff, DL (2001) Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology (Berl)* 156:194–215.
- Swerdlow, NR, Stephany, N, Wasserman, LC, Talledo, J, Shoemaker, J, Auerbach, PP (2003) Amphetamine effects on prepulse inhibition across-species: replication and parametric extension. *Neuropsychopharmacology* 28(4):640–650.
- Swerdlow, NR, Blumenthal, TD, Sutherland, AN, Weber, E, Talledo, JA (2007) Effects of prepulse intensity, duration, and bandwidth on perceived intensity of startling acoustic stimuli. *Biol Psychology* 74:389–395.
- Todtenkopf, MS, Stellar, JR, Williams, EA, Zahm, DS (2004) Differential distribution of parvalbumin immunoreactive neurons in the striatum of cocaine sensitized rats. *Neuroscience* 127(1):35–42.
- Vigano, D, Guidali, C, Petrosino, S, Realini, N, Rubino, T, Di Marzo, V, Parolaro, D (2009) Involvement of the endocannabinoid system in phencyclidine-induced cognitive deficits modeling schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 12(5):599–614.
- Wang, HD, Takigawa, M, Hamada, K, Shiratani, T, Takenouchi, K, Wang, G (2000) Reciprocal information flow between prefrontal cortex and ventral tegmental area in an animal model of schizophrenia. *Neuroreport* 11(9):2007–2011.
- Weickert, CS, Fung, SJ, Catts, VS, Schofield, PR, Allen, KM, Moore, LT, Newell, KA, Pellen, D, Huang, XF, Catts, SV, Weickert, TW (2013) Molecular evidence of N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 18(11):1185–1192.
- Yee, BK, Chang, T, Pietropaolo, S, Feldon, J (2005) The expression of prepulse inhibition of the acoustic startle reflex as a function of three pulse stimulus intensities, three prepulse stimulus intensities, and three levels of startle responsiveness in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 163(2):265–276.
- Zuardi, AW, Shirakawa, I, Finkelfarb, E, Karniol, IG (1982) Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology (Berl)* 76(3):245–250.
- Zuardi, AW, Rodrigues, JA, Cunha, JM (1991) Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. *Psychopharmacology (Berl)* 104(2):260–264.
- Zuardi, AW, Morais, SL, Guimarães, FS, Mechoulam, R (1995) Antipsychotic Effect of Cannabidiol. *J Clin Psychiatry* 56(10):485–486.
- Zuardi, AW, Hallak, JE, Dursun, SM, Morais, SL, Sanches, RF, Musty, RE, Crippa, JA (2006) Cannabidiol monotherapy for treatment-resistant schizophrenia. *J Psychopharmacol* 20(5):683–686.

Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol

Felipe V. Gomes^{a,b,*}, Ricardo Llorente^c, Elaine A. Del Bel^{b,d}, Maria-Paz Viveros^e, Meritxell López-Gallardo^c, Francisco S. Guimarães^{a,b,*}

^a Department of Pharmacology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil

^b Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences (NAPNA), University of São Paulo, Brazil

^c Department of Physiology, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, Spain

^d Department of Physiology, Faculty of Odontology of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil

^e Department of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 October 2014

Received in revised form 6 January 2015

Accepted 8 January 2015

Available online 10 February 2015

Keywords:

Cannabinoid

Psychosis

Microglia

Astrocytes

NeuN

NMDA receptor

MK-801

Clozapine

ABSTRACT

NMDA receptor hypofunction could be involved, in addition to the positive, also to the negative symptoms and cognitive deficits found in schizophrenia patients. An increasing number of data has linked schizophrenia with neuroinflammatory conditions and glial cells, such as microglia and astrocytes, have been related to the pathogenesis of schizophrenia. Cannabidiol (CBD), a major non-psychotomimetic constituent of *Cannabis sativa* with anti-inflammatory and neuroprotective properties induces antipsychotic-like effects. The present study evaluated if repeated treatment with CBD (30 and 60 mg/kg) would attenuate the behavioral and glial changes observed in an animal model of schizophrenia based on the NMDA receptor hypofunction (chronic administration of MK-801, an NMDA receptor antagonist, for 28 days). The behavioral alterations were evaluated in the social interaction and novel object recognition (NOR) tests. These tests have been widely used to study changes related to negative symptoms and cognitive deficits of schizophrenia, respectively. We also evaluated changes in NeuN (a neuronal marker), Iba-1 (a microglia marker) and GFAP (an astrocyte marker) expression in the medial prefrontal cortex (mPFC), dorsal striatum, nucleus accumbens core and shell, and dorsal hippocampus by immunohistochemistry. CBD effects were compared to those induced by the atypical antipsychotic clozapine. Repeated MK-801 administration impaired performance in the social interaction and NOR tests. It also increased the number of GFAP-positive astrocytes in the mPFC and the percentage of Iba-1-positive microglia cells with a reactive phenotype in the mPFC and dorsal hippocampus without changing the number of Iba-1-positive cells. No change in the number of NeuN-positive cells was observed. Both the behavioral disruptions and the changes in expression of glial markers induced by MK-801 treatment were attenuated by repeated treatment with CBD or clozapine. These data reinforces the proposal that CBD may induce antipsychotic-like effects. Although the possible mechanism of action of these effects is still unknown, it may involve CBD anti-inflammatory and neuroprotective properties. Furthermore, our data support the view that inhibition of microglial activation may improve schizophrenia symptoms.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Individuals suffering from schizophrenia manifest a range of behavioral changes, including positive (delusions and hallucinations) and negative symptoms (social withdrawal, anhedonia), as well as cognitive impairment. Cognitive deficits and negative symptoms are present even before the onset of psychosis and are frequently associated with poor

long-term outcome (Elvevag and Goldberg, 2000; Lesh et al., 2011). While the existing medications have proven effective in treating positive symptoms, their efficacy on negative symptoms and cognitive deficits is limited (Elvevag and Goldberg, 2000; Hanson et al., 2010), indicating a great need for new psychopharmacologic agents.

Although the etiology of schizophrenia is still unknown, evidence suggests that an impaired function of the prefrontal cortex mediated by a glutamate NMDA receptor hypofunction could be involved in the negative and cognitive symptoms of schizophrenia (Gonzalez-Burgos and Lewis, 2012; Nakazawa et al., 2012). This proposal is based essentially on studies showing that acute and chronic administration of NMDA receptor antagonists, such as phencyclidine, ketamine, and MK-801, in animals and healthy volunteers induces schizophrenia-like

* Corresponding authors at: Department of Pharmacology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 3900 Bandeirantes Ave, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil. Tel.: +55 16 36023325; fax: +55 16 36332301.

E-mail addresses: gomesfv@usp.br (F.V. Gomes), fsguimar@fmrp.usp.br (F.S. Guimarães).

signs (Krystal et al., 1994; Jentsch and Roth, 1999). Moreover, when administered to schizophrenia patients these drugs can worsen the psychotic symptoms (Krystal et al., 2005). Thus, animal models based on administration of these drugs have been widely used. However, even if most studies have employed acute administration of NMDA receptor antagonists, the effects induced by chronic treatment with these drugs are proposed to better represent the behavioral, neurochemical and neuroanatomical changes observed in schizophrenia patients (Jentsch and Roth, 1999).

An increasing number of clinical, epidemiological, and experimental data have linked schizophrenia with inflammatory conditions. In this context, glial cells, such as microglia and astrocytes, have been related to the pathogenesis of schizophrenia (Schnieder and Dwork, 2011; Monji et al., 2013). Microglia and astrocytes are the major immune cells in the central nervous system (CNS), regulating the induction as well as the limitation of inflammatory processes (Sofroniew and Vinters, 2010; Graeber et al., 2011).

Cannabidiol (CBD), a major non-psychotomimetic compound from *Cannabis sativa*, presents potential therapeutic effects in schizophrenia with several pre-clinical studies indicating that this drug induces antipsychotic-like effects (for review see Campos et al., 2012). These effects have also been described in open-label clinical studies (Zuardi et al., 1995, 2006) and in a recent controlled, randomized, double-blind clinical trial (Leweke et al., 2012). The mechanism of these effects is still unknown (Campos et al., 2012). However, besides its antipsychotic properties, CBD also induces anti-inflammatory and neuroprotective effects, which could contribute for its beneficial effects in schizophrenia. Indeed, a considerable number of preclinical studies have indicated that CBD attenuated increased glial reactivity associated to pathological conditions (Mecha et al., 2013; Perez et al., 2013; Schiavon et al., 2014). Yet, the involvement of these mechanisms in CBD antipsychotic effects has not been evaluated in animal models of schizophrenia.

Based on these pieces of evidence, we investigated whether repeated CBD treatment would attenuate the impairment in social interaction and novel object recognition (NOR) tests induced by chronic administration of the NMDA receptor antagonist MK-801. These tests have been widely used to study the negative symptoms and cognitive deficits, respectively, in animal models of schizophrenia (Ellenbroek and Cools, 2000; Rajagopal et al., 2014). Additionally, given that neuroinflammatory processes in schizophrenia may involve abnormal astrocyte and microglia functions (Rothermundt et al., 2009; Schnieder and Dwork, 2011; Monji et al., 2013; Catts et al., 2014) and that NMDA receptor antagonists induce neuronal damage and alter the expression of astrocyte and microglial markers (Nakki et al., 1995, 1996), we also measured changes in the expression of neuronal (NeuN) and glial markers (GFAP, astrocytes; Iba-1, microglia) in brain structures related to the neurobiology of schizophrenia, such as the medial prefrontal cortex (mPFC), dorsal striatum (dSTR), nucleus accumbens (NAc) core and shell and dorsal hippocampus (dentate gyrus — DG, CA1 and CA3). CBD effects were compared to those induced by the atypical antipsychotic clozapine.

2. Material and methods

2.1. Animals

The experiments were performed using male C57BL/6J mice with 6 weeks of age at the beginning of treatment. Animals were housed in groups of four per cage (41 × 33 × 17 cm) in a temperature-controlled room (24 ± 1 °C) under standard laboratory conditions with free access to food and water and a 12 h light/dark cycle (lights on at 06:00 a.m.). Procedures were conducted in conformity with the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior guidelines for the care and use of laboratory animals, which are in compliance with international laws and politics. The Institution's Animal Ethics Committee approved housing conditions and experimental procedures (process number: 165/2010).

2.2. Drugs

The following drugs were used: cannabidiol (CBD; THC Pharm, Germany), clozapine (Tocris, USA) and MK-801 (Sigma-Aldrich, USA). CBD was diluted in 2% Tween 80 in saline, while clozapine was diluted in saline supplemented with 30 µL of 0.1 M hydrochloric acid (pH was adjusted to a value close to neutrality when necessary). MK-801 was diluted in saline. Drugs were injected intraperitoneally (ip) in a 10 mL/kg volume. Body weight was measured daily.

2.3. Experimental design

We investigated whether repeated treatment with CBD (30 and 60 mg/kg) or clozapine (1 mg/kg) would attenuate social withdrawal and deficits in the novel object recognition (NOR) test induced by chronic treatment with MK-801 1 mg/kg for 28 days (n = 7–9/group). CBD or clozapine treatment began on the 6th day after the start of MK-801 administration and continued until the end of the treatment. The doses and treatment schedule were based on a previous study from our group (Gomes et al., 2015) and were those able to prevent the prepulse inhibition impairment induced by repeated MK-801 treatment. CBD, clozapine or vehicle were administered 30 min before MK-801 or saline, resulting in the following groups: vehicle + saline, CBD 60 mg/kg + saline, clozapine + saline, vehicle + MK-801, CBD 30 mg/kg + MK-801, CBD 60 mg/kg + MK-801, and clozapine + MK-801. One day after the end of the treatment, animals were submitted to the social interaction test. Four hours later they were submitted to the habituation session of the NOR test. The acquisition and test trials of the NOR test were performed 24 h later. On the day following the NOR test, all animals were euthanized and their brains were processed to assess changes in the expression of neuronal (NeuN) and glial markers (astrocytes — GFAP, and microglia — Iba-1) by immunohistochemistry. For this, only the dose of 60 mg/kg of CBD was evaluated, since it was more effective in mitigating MK-801-induced behavioral changes. A diagrammatic representation of the experimental design is presented in Fig. 1.

To evaluate a possible interference of anxiety-related behaviors and locomotor activity changes, independent groups of mice were submitted to a similar treatment schedule and evaluated in the elevated plus-maze (EPM) and open field tests 24 and 48 h, respectively, after the end of the treatments.

2.4. Procedure

2.4.1. Social interaction test

The social interaction test was carried out in a rectangular arena (28 × 17 × 13 cm). The animals (an experimental mouse and an unfamiliar conspecific mouse) were placed on opposite sides of the arena to freely explore it for 10 min. The time of active social behavior of the experimental mouse such as sniffing, following, grooming and climbing on or under the other mouse was recorded. The experimental animals had not been previously exposed to the arena and to the unfamiliar animal.

2.4.2. Novel object recognition (NOR) test

The NOR test was carried out in a Plexiglas circular arena (40 cm diameter and 40 cm height). One day before the test session each animal was habituated in the arena for 15 min. On the test day, animals were submitted to two trials separated by a 1 h-intertrial interval. During the first trial (acquisition trial, T1), mice were placed in the arena containing two identical objects for 10 min. For the second trial (test trial, T2), one of the objects presented in T1 was replaced by an unknown object (novel object). Animals were then placed back in the arena for 5 min. The behavior was recorded on video for blind scoring of object exploration, which was defined as situations where the animal is directing its face to the object in a distance of approximately 2 cm

Fig. 1. Experimental design. The animals received daily ip injections of saline (SAL) or MK-801 (1 mg/kg) for 28 days. CBD (30 and 60 mg/kg) or vehicle (VEH) treatment began on the 6th day after the start of MK-801 administration and continued until the end of the treatment. One day later, animals were submitted to the social interaction (SI) test. The acquisition and test trials of the NOR test were performed 24 h later. One day later, animals were euthanized and their brains were removed and processed to assess changes in the expression of NeuN, GFAP, and Iba-1 by immunohistochemistry (IHC). CBD effects were compared to those induced by the atypical antipsychotic clozapine (CLZ; 1 mg/kg).

while watching, licking, sniffing, or touching it with the forepaws while sniffing. Exploration time (s) of each object in each trial was recorded manually by the use of two stopwatches. The arena and the objects were cleaned between each trial using alcohol 70% to avoid odor trails. The familiar and novel objects were 15 cm high, being too heavy to be displaced by the animals and having different shape, color and texture. Recognition memory was assessed using the discrimination index (discrimination index = (novel – familiar / novel + familiar)), corresponding to the difference between the time exploring the novel and the familiar object, corrected for total time exploring both objects (Bertaina-Anglade et al., 2006).

2.4.3. Elevated plus-maze (EPM)

Anxiety-like behavior was investigated using the EPM apparatus (Carobrez and Bertoglio, 2005). The EPM consisted of two opposite wooden open arms (34 × 6.5 cm), crossed at right angle by two arms of the same dimensions enclosed by 15 cm high walls with no roof. The maze was located 50 cm above the floor and a 1-cm high edge made of Plexiglas surrounded the open arms to prevent falls. The EPM was located in a sound-attenuated room. The Any-Maze software (Stoelting, USA) was employed for behavioral analysis in the EPM. It detects the position of the animal in the maze and calculates the number of entries and time spent in open and enclosed arms. Each session lasted for 5 min and after each trial the maze was cleaned using alcohol 70% v/v.

2.4.4. Open field test

The open field consisted of a Plexiglas circular arena (40 cm diameter and 40 cm height). Animals were placed in the center of the arena and the total distance traveled was determined during 5 min using the Any-Maze software.

2.4.5. Immunohistochemical detection of NeuN, GFAP and Iba-1

2.4.5.1. Tissue collection. One day after the exposure to the NOR test, animals were deeply anesthetized with a lethal dose of urethane (25%, 5 mL/kg; ip) and transcardially perfused with phosphate buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde (PFA 4%) in 0.1 M phosphate buffer (PB). The brains were removed and post-fixed in the same fixative solution (PFA 4%) for 2 h. Then, they were washed three times, 30 min each, in PB 0.1 M, pH 7.2, and cryoprotected in 11% sucrose in PBS at 4 °C during 24 h. The samples were then transferred to PB 0.1 M, pH 7.2 containing 33% sucrose and conserved at 4 °C during 24 h. Finally, the brains were embedded in Tissue Freezing Medium (Tissue-Tek® O.C.T., Sakura Finetek, USA), and kept at –30 °C until used. For immunostaining techniques, brains were frozen sectioned using a cryostat microtome at –22 °C (CM-3050, Leica, Germany) in 25 µm-thick serial coronal sections. Tissue sections were collected into five alternate series of gelatin-coated slides (6 slices per slide), air dried, and stored at –30 °C.

2.4.5.2. Immunostaining. The slides with tissue sections were allowed to dry at room temperature for 10 min then air dried for at least 15 min on a slide warmer at 36 °C, and then again 10 min at room temperature, in order to increase the adhesion of the slices to the slides. All washes and incubations were done in 0.1 M PB pH 7.4, containing 0.5% bovine serum albumin and 0.3% Triton X-100, which constituted the immunohistochemistry buffer (IB). Endogenous peroxidase was blocked for 15 min at room temperature in a solution of 2% hydrogen peroxide in IB. After three washes in IB, sections were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody and then rinsed three times in IB and incubated for 2 h at room temperature with the secondary antibody.

In order to evaluate NeuN expression, a monoclonal antibody for NeuN was used as primary antibody, 1:50 dilution [mouse monoclonal IgG anti-NeuN (anti-neuronal nuclei; Millipore, USA, Ref: clone A60)] and a biotinylated rabbit anti-mouse IgG was employed as secondary antibody, 1:300 dilution (Millipore, USA). We also evaluated astroglial reaction by studying changes in GFAP, the main intermediate filament of astrocytes. It defines the astrocytic morphology, being possible to evaluate the astroglial reaction by studying changes in GFAP expression (Tagliaferro et al., 1997). We used a polyclonal antibody for GFAP as primary antibody, 1:2000 dilution [rabbit polyclonal IgG anti-GFAP (anti-glial fibrillary acidic protein; Dako, Denmark, Ref: Z0334)] and a biotinylated goat anti-rabbit IgG as secondary antibody, 1:300 dilution (Thermo Fisher Scientific, USA). For microglia, a polyclonal antibody for Iba-1 was used as primary antibody, 1:1000 dilution [rabbit polyclonal IgG anti-Iba-1 (anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1; Wako, Japan, Ref: 019-19741)] and a biotinylated goat anti-rabbit IgG as secondary antibody, 1:300 dilution (Thermo Fisher Scientific, USA).

After incubations with the specific antibodies, sections were washed several times in IB and then incubated for 90 min at room temperature with avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, UK, 1:300 dilution). The reaction product was revealed by incubating the sections with 0.5 mg/mL of 3,3-diaminobenzidine (0.5 mg/mL; Sigma-Aldrich, Spain) and 0.2% hydrogen peroxide in PBS. Then, sections were dehydrated and coverslipped with DePeX® mounting medium (Serva, Germany). For immunohistochemical evaluation of Iba-1 and GFAP in the hippocampus, slides were counterstained with cresyl violet (0.005%) before being dehydrated in order to highlight the molecular layer of dentate gyrus (DG), and the pyramidal cell layer of CA1 and CA3 areas as anatomical reference. Sections for evaluating the medial prefrontal cortex (mPFC), dorsal striatum (dSTR), and nucleus accumbens (NAc) the slides were not counterstained. These regions were identified by using the motor cortex and corpus callosum (mPFC and dSTR), and the anterior commissure (NAc) as anatomical references.

To check the specificity of the immunoreaction, we included control preparations (omitting the primary antibody) in each immunostaining batch to rule out unspecific binding. Immunostaining batches containing all experimental groups as well as the internal control were run together.

Slides immunostaining NeuN, GFAP or Iba-1 were observed under light microscopy (Zeiss Axioplan Microscope, Germany). The microscope

had a camera attached (Zeiss Axioplan, Germany), through which the images were captured to be processed using Axiovision 40V 4.1 (Carl Zeiss vision, Germany). All lighting conditions and magnifications were kept constant during the capture process.

2.4.5.3. Quantitative evaluation. All immunostaining data related to NeuN, GFAP and Iba-1-positive cells were counted at 20× magnification by three observers unaware of the experimental groups. The following brain structures were evaluated: prelimbic and infralimbic portions of the mPFC, dSTR, NAc core and shell and dorsal hippocampus (DG, CA1 and CA3). Neuroanatomical sites were identified with the help of the Paxinos and Franklin mouse brain atlas (Paxinos and Franklin, 2008). The anterior–posterior (AP) localization from bregma of the analyzed regions was as follow: mPFC (AP: 1.98–1.70 mm); dSTR and NAc core and shell (AP: 1.54–0.98 mm); dorsal hippocampus (AP: –1.82 to –2.30 mm). For each brain structure, 3–4 tissue sections from each animal were analyzed. Since the structures evaluated are bilateral, both hemispheres were studied in each brain and the mean value between them was calculated. Immunoreactive cells were counted using ImageJ software (Research Services Branch – NIH, USA). Specific information about the quantification of NeuN, GFAP and Iba-1-positive cells is described below:

NeuN: All stained cells in a whole area were recorded. The sizes of the counting areas were 0.290 mm² for the mPFC (0.145 mm² for the prelimbic and 0.145 mm² for the infralimbic portion of the mPFC), 0.145 mm² for the dSTR and NAc core and shell. Results were expressed as the number of positive cells/0.1 mm². However, due to the high density and the proximity of the cells in the cellular layers of hippocampus, we performed the analysis by optical densitometry using specific ROIs for each portion (DG – upper, outer and inner blade; CA1 and CA3). Values were expressed as the percentage of optical density compared to control group.

GFAP: All immunoreactive cells in a whole area were recorded. The sizes of the counting areas were 0.290 mm² for the mPFC (0.145 mm² for the prelimbic and 0.145 mm² for the infralimbic portion of the mPFC), 0.145 mm² for the dSTR and NAc core and shell, 0.072 mm² for the DG (hilus); 0.055 mm² for the CA1 (stratum radiatum) and 0.071 mm² for the CA3 (stratum radiatum). Results were expressed as the number of positive cells/0.1 mm².

Iba-1: All immunoreactive cells in a selected area were recorded. The sizes of the counting areas were 0.092 mm² for the mPFC (0.046 mm² for the prelimbic and 0.046 mm² for the infralimbic portion of the mPFC), 0.046 mm² for the dSTR and NAc core and shell, 0.072 mm² for the DG (hilus); 0.055 mm² for the CA1 (stratum radiatum) and 0.071 mm² for the CA3 (stratum radiatum). Results were expressed as the number of Iba-1-positive cells/0.1 mm². Considering Iba-1 labels both activated and resting microglia, a quantitative assessment of microglia morphology was also conducted. Cells were classified in resting or reactive microglia according to established morphological criteria (Diz-Chaves et al., 2012; Lopez-Rodriguez et al., 2015): cells with few cellular processes (2 or less) or cells showing 3–5 short branches were considered as resting microglia; cells with numerous (>5) and longer cell processes, large soma and retracted and thicker processes, and cells with amoeboid cell body, numerous short processes, and intense Iba-1 immunostaining were considered as reactive microglia. Fig. 2 shows some examples of resting and reactive microglia.

2.5. Statistical analysis

In the NOR test, acquisition and retention trial data were analyzed by repeated measures ANOVA with treatment as the main independent factor and the object (acquisition trial: familiar object placed in the left vs. right side of the arena; retention trial: novel vs. similar object) as the repeated factor. When a significant object effect was observed specific Student t-tests were performed for each group. The discrimination index and the time of social interaction were analyzed by one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls (S-N-K) *post-hoc* test. The number of NeuN, GFAP, Iba-1-positive cells, and the percentage of Iba-1-positive cells with a reactive phenotype were analyzed by two-way ANOVA, using the first (vehicle, CBD or clozapine) and the second (MK-801 or saline) treatments as main factors, followed by the S-N-K *post-hoc* test. Both the prelimbic and infralimbic mPFC portions were quantified. However, as the results were similar, a mean value between these two regions was used to represent changes in the mPFC. Moreover, because there was no difference in both behavioral and immunohistochemical data between animals that received 2% Tween 80 in saline (used to dissolve CBD) + saline and saline supplemented with 30 µL of 0.1 M hydrochloric acid (used to dissolve clozapine) + saline, they were joined together in a control group (vehicle + saline). All data were represented as mean ± SEM. Results of statistical tests with $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. CBD and clozapine effects on behavioral changes induced by repeated MK-801

Repeated MK-801 treatment impaired social interaction ($F_{6,49} = 5.21$, $P < 0.0001$, one-way ANOVA followed by S-N-K *post-hoc* test; $P < 0.05$ vs. vehicle + saline group, Fig. 3). CBD, at the dose of 60 mg/kg, and clozapine reversed the impaired social interaction induced by MK-801 treatment (S-N-K *post-hoc* test; $P < 0.05$ vs. vehicle + MK-801 group, Fig. 3). This change was also attenuated by CBD 30 mg/kg + MK-801 (S-N-K *post-hoc* test; $P > 0.05$ vs. vehicle + saline group).

In the NOR test, no significant differences in time spent exploring the two identical objects were observed among groups in the acquisition trial ($F_{1,49} = 1.66$, $P > 0.05$, repeated measures ANOVA; Fig. 4A). On the other hand, the time spent exploring novel vs. familiar object was significantly different among groups in the retention trial ($F_{1,49} = 117.05$, $P < 0.0001$, repeated measures ANOVA; Fig. 4B). All groups, except vehicle + MK-801-treated animals, explored the novel object significantly longer than the familiar object ($P < 0.05$, Student t-test; Fig. 4B), indicating that the ability to discriminate novel and familiar objects was abolished by repeated MK-801 treatment. The MK-801-induced deficit was also indicated by a decreased discrimination index to the novel object ($F_{6,49} = 4.46$, $P < 0.001$, one-way ANOVA followed by S-N-K *post-hoc* test; $P < 0.05$ vs. vehicle + saline group, Fig. 4C). CBD at the dose of 60 mg/kg and clozapine prevented the MK-801-induced deficit (S-N-K *post-hoc* test; $P < 0.05$ vs. vehicle + MK-801 group, Fig. 4C). This change was also attenuated in mice treated with

Fig. 2. Microglia cells immunostained with Iba-1 and classified according to morphological aspects in resting or reactive microglia. Images at 40× objective, bar = 25 µm.

Fig. 3. CBD (30 and 60 mg/kg) prevented the decrease in social interaction time induced by repeated treatment with MK-801 (1 mg/kg) for 28 days. Similar to CBD, clozapine (CLZ; 1 mg/kg) also prevented MK-801-induced social withdraw ($n = 7$ –9/group). Data are presented as the mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs. VEH + SAL group, # $P < 0.05$ vs. VEH + MK-801 group; one-way ANOVA followed by S-N-K *post-hoc* test.

CBD 30 mg/kg + MK-801 (S-N-K *post-hoc* test; $P > 0.05$ vs. vehicle + saline group). Neither CBD nor clozapine induced any effect *per se*.

These treatments did not induce any change in the EPM and open field test (Supplementary Table 1), indicating that the observed effects in the social interaction and NOR tests were not due to anxiety-related behaviors or changes in locomotor activity. Additionally, no difference in body weight was found among the groups along the experiments (data not shown).

3.2. Changes in NeuN, GFAP and Iba-1 expression in specific brain regions induced by the repeated MK-801, CBD or clozapine treatment

NeuN: No change in the number of NeuN-positive cells was observed in any brain structure evaluated (Supplementary Table 2).

GFAP: Quantification of GFAP-positive cells in the mPFC revealed no significant effect of the first treatment (vehicle, clozapine or CBD; $F_{2,33} = 1.39$, $P > 0.05$). However, there were a significant effect of the second treatment (saline or MK-801; $F_{1,33} = 17.83$, $P = 0.0001$) and an interaction between the treatments ($F_{2,33} = 4.78$, $P = 0.015$). The number of GFAP-positive cells increased in the mPFC of vehicle + MK-801-treated mice compared to controls (S-N-K *post-hoc* test, $P < 0.05$ vs. vehicle + saline group, Fig. 5). This change was not observed in mice treated with CBD 60 mg/kg + MK-801 (S-N-K *post-hoc* test; $P > 0.05$ vs. vehicle + saline group). Moreover, clozapine was more effective in attenuating the MK-801-induced changes (S-N-K *post-hoc* test; $P < 0.05$ vs. vehicle + MK-801 group, Fig. 5). Neither CBD (60 mg/kg) nor clozapine affected GFAP expression in the mPFC *per se* (S-N-K *post-hoc* test, $P > 0.05$ vs. vehicle + saline group).

No change in GFAP expression was observed in dSTR, NAc core and shell, DG, CA1, and CA3 (Supplementary Table 3).

Iba-1: No change in the number of Iba-1-positive cells was observed in any brain structure evaluated (Supplementary Table 4). However, the evaluation of the morphology of Iba-1 immunoreactive microglia indicated a significant interaction between the first (vehicle, CBD or clozapine) vs. second treatment (MK-801 or saline) in the mPFC, DG and CA1 (mPFC: $F_{2,28} = 12.83$, $P < 0.0001$; dSTR: $F_{2,27} = 0.43$, $P > 0.05$; NAc core: $F_{2,26} = 0.82$, $P > 0.05$; NAc shell: $F_{2,27} = 1.50$, $P > 0.05$; DG: $F_{2,26} = 6.12$, $P < 0.01$; CA1: $F_{2,25} = 10.22$, $P < 0.001$; CA3: $F_{2,26} = 1.28$, $P > 0.05$). It was observed a decrease in the percentage of resting microglia and, consequently, an increase of reactive microglia in the mPFC, DG and CA1 after repeated MK-801 treatment (Fig. 6 and Supplementary Table 4). These changes were attenuated by CBD and clozapine. Neither CBD nor clozapine induced any effect *per se*.

No change in the percentage of reactive microglia was observed in the dSTR, NAc core and shell, and CA3 regions (Supplementary Table 4).

4. Discussion

The present study shows that repeated administration of the NMDA receptor antagonist MK-801 for 28 days impaired social interaction and NOR tests performed 1 and 2 days after the end of the treatment, respectively. These results are consistent with those showing a PPI disruption induced by a similar treatment schedule with MK-801 (Gomes et al., 2015). Additionally, no change was observed in the EPM and open field tests. Lacks of changes in open field activity following repeated treatment with NMDA receptor antagonists have already been reported (Rujescu et al., 2006). Together, these findings indicate that MK-801-induced behavioral disruptions observed in social interaction and NOR tests were not due to anxiety-related behaviors or changes in locomotor activity.

Besides behavioral disruption, repeated MK-801 treatment also increased the number of GFAP-positive astrocytes in the mPFC and the percentage of Iba-1-positive microglia cells with a reactive phenotype in the mPFC, DG and CA1 without changing the number of Iba-1-positive cells. No change in the number of NeuN-positive cells was observed. MK-801-induced behavioral changes were not observed in mice treated with CBD or clozapine.

The dose of 60 mg/kg of CBD was more effective in attenuating the impairment social interaction and NOR impairment induced by MK-801 treatment. Consequently, only the effects of this dose on the MK-801-induced glial changes were investigated. Similar to the behavioral changes, CBD and clozapine attenuated the changes in the expression of astrocyte and microglia markers induced by MK-801 treatment. However, clozapine was more effective in mitigating the increase in the number of GFAP-positive cells in the mPFC induced by MK-801.

Although repeated treatment with NMDA receptor antagonists can also induce behavioral responses associated with positive-like symptoms

Fig. 4. Effects of chronic MK-801 (1 mg/kg), clozapine (CLZ; 1 mg/kg) and CBD (60 mg/kg) treatment in the NOR test ($n = 7$ –9/group). Data are presented as the mean $\pm$ SEM. (A) Exploration time of two identical objects in the acquisition trial. (B) Exploration time of a novel and a familiar object in the retention trial. * $P < 0.05$, significant difference in time exploring the novel compared to the familiar object; repeated measures ANOVA followed by Student t-test. (C) Effects in the discrimination index. * $P < 0.05$ vs. VEH + SAL group, # $P < 0.05$ vs. VEH + MK-801 group; one-way ANOVA followed by S-N-K *post-hoc* test.

Fig. 5. Effects of chronic MK-801 (1 mg/kg), clozapine (CLZ; 1 mg/kg) and CBD (60 mg/kg) treatment on GFAP protein expression in the mice mPFC ($n = 6-7$ /group). (A) MK-801 induced an increase in the number of GFAP-positive cells in the mPFC. CBD and clozapine attenuated GFAP increase in the mPFC. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs. VEH + SAL group, # $P < 0.05$ vs. VEH + MK-801 group; two-way ANOVA followed by S-N-K *post-hoc* test. (B) Photomicrographs of GFAP-like immunoreactivity in the mPFC (20X; bar = 50 μ m).

Fig. 6. Effects of chronic MK-801 (1 mg/kg), clozapine (CLZ; 1 mg/kg) and CBD (60 mg/kg) treatment on microglia reactivity in the mPFC (A–B), DG (C–D) and CA1 ($n = 4-7$ /group) (E–F). MK-801 increased the percentage of reactive microglia in these structures. These changes were attenuated by clozapine and CBD. (A, C and E) Histograms represent the mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs. VEH + SAL group, # $P < 0.05$ vs. VEH + MK-801 group; two-way ANOVA followed by S-N-K *post-hoc* test. (B, D and F) Photomicrographs of Iba-1-immunoreactive microglia cells in the mPFC, DG and CA1, respectively (20X; bar = 50 μ m).

of schizophrenia (Jentsch et al., 1998), the focus of the present study was on behavioral changes related to cognitive impairment and negative symptoms of schizophrenia. These changes, evaluated here by the NOR and social interaction tests, respectively, are also described after chronic administration of NMDA receptor antagonists in rodents (Rujescu et al., 2006; Mouri et al., 2007; Vigano et al., 2009; Guidali et al., 2011). Our results corroborated these findings and showed that these changes can be attenuated by repeated CBD and clozapine treatment.

In addition to behavioral changes, NMDA receptor antagonists induce neuronal damage and alter the activity of glial cells, mainly astrocytes and microglia, as well as the expression of their markers (Nakki et al., 1995, 1996). Although NMDA receptor antagonists can modulate neuronal birth and death, increasing neuronal proliferation and neurogenesis in the hippocampus (Genius et al., 2012), we did not observe any significant change in the expression of the neuronal marker NeuN, suggesting that MK-801 effects were not due to neuronal death or proliferation. Moreover, no change in the expression of Ki67, a nuclear protein that is associated with cellular proliferation, was observed (data not shown).

Astrocytes and microglia mediate inflammatory responses in the brain. Considering that alterations of these cells have been observed in schizophrenia patients, it has been postulated an involvement of neuroinflammatory processes in the pathogenesis of schizophrenia (Schnieder and Dwork, 2011; Monji et al., 2013). Indeed, recently Fillman et al. (2013) observed changes in inflammatory markers in the dorsolateral PFC of patients diagnosed with schizophrenia. GFAP, the major intermediate filament of astrocytes, has been the most used astrocytic marker in immunohistochemical studies to define their morphology and assess astroglial reaction (Tagliaferro et al., 1997). In the present study astrocytes were identified as cells with GFAP-positive cell bodies and processes that displayed classic astrocytic morphology. Astrocytes play an important role to keep normal neuronal function, participating in processes responsible for the uptake of neurotransmitters, the maintenance of ion homeostasis, neuronal migration during development, and synthesis, clearance and release of neuroactive amino acids (Bezzi et al., 1999; Sidoryk-Wegrzynowicz et al., 2011). In relation to microglia, we evaluated changes in the expression of Iba-1 protein, a calcium-binding protein specifically expressed in this cell type. These cells are the intrinsic immune cells of the CNS sensitive to insults (Aguzzi et al., 2013). In the healthy CNS, microglia has a distinctive ramified morphology with a small, round soma, and numerous branching processes. Upon activation, these cells may adopt different phenotypes characterized by alterations of their shape with reduction of processes length towards an amoeboid structure in response to various stimuli (Wake et al., 2011). Depending on their stage of activation, microglial cells can produce several proinflammatory cytokines and cytotoxic molecules, which may lead to neuronal apoptosis (Graeber et al., 2011). While microglia activation is a necessary and beneficial immune response to protect the brain tissue from damage, its excessive activation has been linked to the development of numerous diseases (Graeber et al., 2011; Aguzzi et al., 2013). Therefore, inhibition of these processes may result in neuroprotective effects.

Evidence suggests that neuroinflammatory changes observed in schizophrenia involve abnormal astrocyte functions (Rothermundt et al., 2009; Catts et al., 2014). However, as observed to several other alterations in the brain of schizophrenia patients, available data on the expression of astrocytic markers are conflicting, ranging from absence of alteration (Hoistad et al., 2013) to decreased (Rajkowska et al., 2002) or increased expression (Feresten et al., 2013). We observed that MK-801 treatment increased GFAP expression in the mPFC. The differences in the number of GFAP-positive cells induced by MK-801 may reflect developmental effects on the differentiation and proliferation of astrocytes or the activation of formerly quiescent astrocytes rather than from proliferation. An increased expression of GFAP and the number of GFAP-immunoreactive astrocytes are markers of astrogliosis. However, one of the possible molecular changes in reactive astrocytes

is an upregulation of GFAP expression (Sofroniew and Vinters, 2010). This could make possible to detect astrocytes that would otherwise remain under the level of detection by immunohistochemistry in control mice. Therefore, part of the differences in the number of GFAP-positive cells found in the present study might reflect modifications in astrocytes reactivity, rather than their absolute number, in response to MK-801 treatment.

Another important finding of the present study was the increased percentage of Iba-1-positive microglia cells with a reactive phenotype in the mPFC, DG and CA1 regions of MK-801 treated mice. This effect was also attenuated by CBD and clozapine. These results are consistent with previous studies showing increased microglial activation after antagonism of NMDA receptors (Nakki et al., 1995, 1996; Arif et al., 2007). Similar to our results, Ribeiro et al. (2013) showed that repeated clozapine administration reversed cognitive deficits and progressive microglial activation in the hippocampus and PFC in a rodent model of schizophrenia based on neurodevelopmental disruption. Interestingly, it has recently emerged that microglia may be important to mediate or modulate inflammatory processes in the brain of schizophrenia patients. Although some studies have yielded conflicting evidence, activation and increased cellular density of microglia are shown in *postmortem* brains of schizophrenia patients (Radewicz et al., 2000). Additionally, positron emission tomography studies using [¹¹C](R)-PK11195 as an *in vivo* marker of activated microglia have indicated increased microglial activation in the brain of a subgroup of schizophrenia patients (van Berckel et al., 2008; Doorduyn et al., 2009). Although it is unclear how changes in microglia activity induce abnormalities that eventually lead to schizophrenia, there seems to be an association between microglial activation and negative symptoms and/or cognitive deficits (Levkovitz et al., 2010; Ribeiro-Santos et al., 2014). Thus, the protective effects of CBD and clozapine on social interaction and NOR impairments induced by MK-801 could be related to decreased microglial activation.

In agreement with this proposition, minocycline, a potent inhibitor of microglial activation, improved negative symptoms and cognitive function as an add-on treatment in schizophrenia patients (Levkovitz et al., 2010; Chaudhry et al., 2012). Moreover, anti-inflammatory drugs, such as celecoxib and aspirin, given as an adjunct therapy to antipsychotic treatment, resulted in better outcomes regarding negative symptoms than antipsychotic treatment alone (Laan et al., 2010; Muller et al., 2010). Additionally, *in vitro* studies have indicated anti-inflammatory effects of atypical antipsychotics via the inhibition of microglial activation (Bian et al., 2008; Hu et al., 2012). In this context, CBD can also induce anti-inflammatory and neuroprotective effects. Indeed, in a mouse model of Alzheimer's disease-related neuroinflammation, CBD attenuated the expression of several glial pro-inflammatory proteins, including GFAP, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and interleukin 1 β (Esposito et al., 2007), which are major contributors of the neuroinflammatory process. Moreover, the memory restoring properties of CBD in an animal model of Alzheimer's disease were linked to a reduction in microglial activation and pro-inflammatory cytokines (Martim-Moreno et al., 2011). Additionally, similar to our results, CBD ameliorates symptomatology of multiple sclerosis, brain ischemia and peripheral nerve axotomy in animal models by attenuating microglial activation and astrogliosis (Mecha et al., 2013; Perez et al., 2013; Schiavon et al., 2014).

Other possible explanation of the enhanced number of GFAP-positive cells in the mPFC induced by MK-801 is that the antagonism of NMDA receptors by this drug decreases the expression of parvalbumin (PV), a calcium binding protein expressed in a subclass of GABAergic interneurons in the mPFC (Gomes et al., 2015). This could lead to GABAergic interneuron dysfunction and, consequently, to high levels of glutamate via a disinhibition of glutamate release from pyramidal neurons targeted by those interneurons (Nakazawa et al., 2012). This change has been suggested to be directly involved in cognitive disruption (Gonzalez-Burgos and Lewis, 2012) and has been prevented by repeated treatment with

CBD or clozapine (Gomes et al., 2015). Since astrocytes have a key role in glutamate homeostasis (Bezzi et al., 1999), an increase in the number of these cells in the mPFC may be a compensatory mechanism in an attempt to normalize the levels of glutamate in this structure. Therefore, CBD and clozapine effects on mitigating the increased GFAP expression induced by MK-801 could be indirect, due to an attenuation of GABAergic interneurons dysfunction in the mPFC induced by MK-801. This possibility needs to be further investigated.

The glial changes observed in the present study could also be related to the neurotoxicity induced by MK-801 (Olney et al., 1989; Wozniak et al., 1996). If it is true, we may assume that CBD and clozapine effects are also associated to protective effects against MK-801-induced neurotoxicity. However, in the NeuN immunostaining of vehicle + MK-801-treated mice no marked neurotoxicity-like signs, such as decreased number of NeuN-positive cells, vacuolization and nuclear fragmentation, were seen.

While a microglial activation induced by repeated MK-801 treatment was observed in the mPFC, dentate gyrus, and CA1, an astroglial reaction, indicated by the increased number of GFAP-positive cells, was only seen in the mPFC. The meaning of these differences is not clear. It could be related to our previous data showing a decrease in PV expression induced by MK-801 in the mPFC, but not in the hippocampus (Gomes et al., 2015). As aforementioned, a decrease in PV expression has been associated to disturbances of the glutamatergic and GABAergic neurotransmission. Additionally, early microglial activation has been observed to precede the phenotypic changes in astrocytes (Tilleux and Hermans, 2007). However, given the heterogeneity of astrocytes in the brain, circuitry- and astrocyte type-specific manipulations are needed to get a better understanding of the role of these cells in neuropsychiatric disorders (Xia et al., in press). For example, Oberheim et al. (2012) observed that increases in Ca^{2+} were induced in cortical astrocytes by glutamate and norepinephrine, while hippocampal astrocytes show Ca^{2+} responses to ATP, GABA, acetylcholine, and endocannabinoids, suggesting that various neurotransmitters differentially affected astrocytes in the cortex and hippocampus. Additionally, differences between brain regions were also observed after the exposure to other psychotomimetic drugs such as cocaine. For example, while astrogliosis (increased number of GFAP-positive cells) was observed in the striatum and hippocampus after acute cocaine exposure, microgliosis (increased number of Iba-1-positive cells) was observed only in the hippocampus (Blanco-Calvo et al., 2014). Furthermore, there are no direct projections from the mPFC to the hippocampus in rodents (Verwer et al., 1997; Hoover and Vertes, 2007) making it unlikely that either similarities or differences in changes induced by MK-801 treatment are due to direct interactions between the regions. They may involve, instead, functional or structural differences between neurons present in these two regions.

In conclusion, the present results indicate that repeated treatment with CBD or the atypical antipsychotic clozapine attenuates or reverses the schizophrenia-like behavioral disruption and changes in the expression of astrocytic and microglial markers observed after chronic administration of the NMDA receptor antagonist MK-801. These data reinforce the proposal that CBD may induce antipsychotic-like effects. Although the possible mechanism of action of these effects is still unknown, it may involve CBD anti-inflammatory and neuroprotective properties. Furthermore, our data support the view that inhibition of microglial activation may improve schizophrenia symptoms. The mechanisms responsible for these effects need to be further investigated.

Role of funding source

This research was supported by grants from FAPESP (FSG and EDB: 2012/17626-7; FVG: 2010/17343-0; 2012/14144-1), CNPq (470311/2012-6; Brazil), and Instituto de Salud Carlos III, Redes temáticas de Investigación Cooperativa en salud, RD2012/0028/0021 GRUPO UCM 951579 (Spain). The funding sources had no involvement in the study design, in the acquisition, analysis, or interpretation of the data, in the writing of the report, and in the decision to submit the paper for publication.

Contributors

FVG designed the study, performed the experiments, and wrote the first draft of the manuscript. RL and MLG also performed the immunohistochemistry experiments and analyzed the data. EDB, MPV and FSG were involved in conception and design of the study. Statistical analyses were conducted by FVG and FSG. All authors were involved in manuscript development, critically reviewed the manuscript for important intellectual content, and approved the final version.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors thank José Carlos de Aguiar, Celia A. da Silva, Ângela A. Arrojo, and Lara Arnaldo for technical assistance. FVG has a FAPESP fellowship (2010/17343-0; 2012/14144-1). This research was supported by grants from FAPESP (FSG and EDB: 2012/17626-7), CNPq (470311/2012-6; Brazil), and Instituto de Salud Carlos III, Redes temáticas de Investigación Cooperativa en salud, RD2012/0028/0021 GRUPO UCM 951579 (Spain).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2015.01.015>.

References

- Aguzzi, A., Barres, B.A., Bennett, M.L., 2013. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science* 339 (6116), 156–161.
- Arif, M., Chikuma, T., Ahmed, M.M., Yoshida, S., Kato, T., 2007. Suppressive effect of clozapine but not haloperidol on the increases of neuropeptide-degrading enzymes and glial cells in MK-801-treated rat brain regions. *Neurosci. Res.* 57 (2), 248–258.
- Bertaina-Anglade, V., Enjuanes, E., Morillon, D., Drieu la Rochelle, C., 2006. The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 54 (2), 99–105.
- Bezzi, P., Vesce, S., Panzarasa, P., Volterra, A., 1999. Astrocytes as active participants of glutamatergic function and regulators of its homeostasis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 468, 69–80.
- Bian, Q., Kato, T., Monji, A., Hashioka, S., Mizoguchi, Y., Horikawa, H., Kanba, S., 2008. The effect of atypical antipsychotics, perospirone, ziprasidone and quetiapine on microglial activation induced by interferon-gamma. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32 (1), 42–48.
- Blanco-Calvo, E., Rivera, P., Arrabal, S., Vargas, A., Pavon, F.J., Serrano, A., Castilla-Ortega, E., Galeano, P., Rubio, L., Suarez, J., Fonseca, F.R., 2014. Pharmacological blockade of either cannabinoid CB₁ or CB₂ receptors prevents both cocaine-induced conditioned locomotion and cocaine-induced reduction of cell proliferation in the hippocampus of adult male rat. *Front. Integr. Neurosci.* 7, 106.
- Campos, A.C., Moreira, F.A., Gomes, F.V., Del Bel, E.A., Guimarães, F.S., 2012. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 367 (1607), 3364–3378.
- Carobrez, A.P., Bertoglio, L.J., 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29 (8), 1193–1205.
- Catts, V.S., Wong, J., Fillman, S.G., Fung, S.J., Shannon Weickert, C., 2014. Increased expression of astrocyte markers in schizophrenia: association with neuroinflammation. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 48 (8), 722–734.
- Chaudhry, I.B., Hallak, J., Husain, N., Minhas, F., Stirling, J., Richardson, P., Dursun, S., Dunn, G., Deakin, J.W., 2012. Minocycline benefits negative symptoms in early schizophrenia: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial in patients on standard treatment. *J. Psychopharmacol.* 26 (9), 1185–1193.
- Diz-Chaves, Y., Pernia, O., Carrero, P., Garcia-Segura, L.M., 2012. Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *J. Neuroinflammation* 9, 71.
- Doorduyn, J., de Vries, E.F., Willemsen, A.T., de Groot, J.C., Dierckx, R.A., Klein, H.C., 2009. Neuroinflammation in schizophrenia-related psychosis: a PET study. *J. Nucl. Med.* 50 (11), 1801–1807.
- Ellenbroek, B.A., Cools, A.R., 2000. Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. *Behav. Pharmacol.* 11 (3–4), 223–233.
- Elvevag, B., Goldberg, T.E., 2000. Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Crit. Rev. Neurobiol.* 14 (1), 1–21.
- Esposito, G., Scuderi, C., Savani, C., Steardo Jr., L., De Filippis, D., Cottone, P., Iuvone, T., Cuomo, V., Steardo, L., 2007. Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1 β and iNOS expression. *Br. J. Pharmacol.* 151, 1272–1279.
- Feresten, A.H., Barakauskas, V., Ypsilanti, A., Barr, A.M., Beasley, C.L., 2013. Increased expression of glial fibrillary acidic protein in prefrontal cortex in psychotic illness. *Schizophr. Res.* 150 (1), 252–257.
- Fillman, S.G., Cloonan, N., Catts, V.S., Miller, L.C., Wong, J., McCrossin, T., Cairns, M., Weickert, C.S., 2013. Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 18 (2), 206–214.
- Genius, J., Benninghoff, J., Reuter, N., Braun, I., Giegling, I., Hartmann, A., Moller, H.J., Rujescu, D., 2012. Dysequilibrium of neuronal proliferation and apoptosis in a pharmacological animal model of psychosis. *Methods* 56 (4), 519–527.

- Gomes, F.V., Issy, A.C., Ferreira, F.R., Viveros, M.P., Del Bel, E.A., Guimarães, F.S., 2015. Cannabidiol attenuates sensorimotor gating disruption and molecular changes induced by chronic antagonism of NMDA receptors in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18 (3), 1–10.
- Gonzalez-Burgos, G., Lewis, D.A., 2012. NMDA receptor hypofunction, parvalbumin-positive neurons, and cortical gamma oscillations in schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 38 (5), 950–957.
- Graeber, M.B., Li, W., Rodriguez, M.L., 2011. Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett.* 585 (23), 3798–3805.
- Guidali, C., Viganò, D., Petrosino, S., Zamberletti, E., Realini, N., Binelli, G., Rubino, T., Di Marzo, V., Parolaro, D., 2011. Cannabinoid CB1 receptor antagonism prevents neurochemical and behavioural deficits induced by chronic phencyclidine. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 14 (1), 17–28.
- Hanson, E., Healey, K., Wolf, D., Kohler, C., 2010. Assessment of pharmacotherapy for negative symptoms of schizophrenia. *Curr. Psychiatry Rep.* 12 (6), 563–571.
- Hoistad, M., Heinsen, H., Wicinski, B., Schmitz, C., Hof, P.R., 2013. Stereological assessment of the dorsal anterior cingulate cortex in schizophrenia: absence of changes in neuronal and glial densities. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 39 (4), 348–361.
- Hoover, W.B., Vertes, R.P., 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct. Funct.* 212, 149–179.
- Hu, X., Zhou, H., Zhang, D., Yang, S., Qian, L., Wu, H.M., Chen, P.S., Wilson, B., Gao, H.M., Lu, R.B., Hong, J.S., 2012. Clozapine protects dopaminergic neurons from inflammation-induced damage by inhibiting microglial overactivation. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 7 (4), 187–201.
- Jentsch, J.D., Roth, R.H., 1999. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20 (3), 201–225.
- Jentsch, J.D., Taylor, J.R., Roth, R.H., 1998. Subchronic phencyclidine administration increases mesolimbic dopaminergic system responsivity and augments stress- and psychostimulant-induced hyperlocomotion. *Neuropsychopharmacology* 19, 105–113.
- Krystal, J.H., Karper, L.P., Seibyl, J.P., Freeman, G.K., Delaney, R., Bremner, J.D., Heninger, G.R., Bowers Jr., M.B., Charney, D.S., 1994. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch. Gen. Psychiatry* 51 (3), 199–214.
- Krystal, J.H., Perry Jr., E.B., Gueorguieva, R., Belger, A., Madonick, S.H., Abi-Dargham, A., Cooper, T.B., MacDougall, L., Abi-Saab, W., D'Souza, D.C., 2005. Comparative and interactive human psychopharmacologic effects of ketamine and amphetamine: implications for glutamatergic and dopaminergic model psychoses and cognitive function. *Arch. Gen. Psychiatry* 62 (9), 985–994.
- Laan, W., Grobbee, D.E., Seltén, P., Heijnen, C.J., Kahn, R.S., Burger, H., 2010. Adjuvant aspirin therapy reduces symptoms of schizophrenia spectrum disorders: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Clin. Psychiatry* 71 (5), 520–527.
- Lesh, T.A., Niendam, T.A., Minzenberg, M.J., Carter, C.S., 2011. Cognitive control deficits in schizophrenia: mechanisms and meaning. *Neuropsychopharmacology* 36 (1), 316–338.
- Levkovitch, Y., Mendlovich, S., Riwek, S., Braw, Y., Levkovitch-Verbin, H., Gal, G., Fennig, S., Treves, I., Kron, S., 2010. A double-blind, randomized study of minocycline for the treatment of negative and cognitive symptoms in early-phase schizophrenia. *J. Clin. Psychiatry* 71 (2), 138–149.
- Leweke, F.M., Piomelli, D., Pahlisch, F., Muhl, D., Gerth, C.W., Hoyer, C., Klosterkotter, J., Hellmich, M., Koethe, D., 2012. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl. Psychiatry* 2, e94.
- Lopez-Rodriguez, A.B., Siopi, E., Finn, D.P., Marchand-Leroux, C., Garcia-Segura, L.M., Jafarian-Tehrani, M., Viveros, M.P., 2015. CB1 and CB2 cannabinoid receptor antagonists prevent minocycline-induced neuroprotection following traumatic brain injury in mice. *Cereb. Cortex* 25 (1), 35–45.
- Martim-Moreno, A.M., Reigada, D., Ramirez, B.G., Mechoulam, R., Innamorato, N., Cuadrado, A., Ceballos, M.L., 2011. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol. Pharmacol.* 79, 964–973.
- Mecha, M., Feliu, A., Inigo, P.M., Mestre, L., Carrillo-Salinas, F.J., Guaza, C., 2013. Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: a role for A2A receptors. *Neurobiol. Dis.* 59, 141–150.
- Monji, A., Kato, T.A., Mizoguchi, Y., Horikawa, H., Seki, Y., Kasai, M., Yamauchi, Y., Yamada, S., Kanba, S., 2013. Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 42, 115–121.
- Mouri, A., Noda, Y., Enomoto, T., Nabeshima, T., 2007. Phencyclidine animal models of schizophrenia: approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. *Neurochem. Int.* 51 (2–4), 173–184.
- Muller, N., Krause, D., Dehning, S., Musil, R., Schennach-Wolff, R., Obermeier, M., Moller, H.J., Klaus, V., Schwarz, M.J., Riedel, M., 2010. Celecoxib treatment in an early stage of schizophrenia: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of celecoxib augmentation of amisulpride treatment. *Schizophr. Res.* 121 (1–3), 118–124.
- Nakazawa, K., Zsiris, V., Jiang, Z., Nakao, K., Kolata, S., Zhang, S., Belforte, J.E., 2012. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology* 62 (3), 1574–1583.
- Nakki, R., Koistinaho, J., Sharp, F.R., Sagar, S.M., 1995. Cerebellar toxicity of phencyclidine. *J. Neurosci.* 15 (3 Pt 2), 2097–2108.
- Nakki, R., Nickolenko, J., Chang, J., Sagar, S.M., Sharp, F.R., 1996. Haloperidol prevents ketamine- and phencyclidine-induced HSP70 protein expression but not microglial activation. *Exp. Neurol.* 137 (2), 234–241.
- Oberheim, N.A., Goldman, S.A., Nedergaard, M., 2012. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol. Biol.* 814, 23–45.
- Olney, J.W., Labruyere, J., Price, M.T., 1989. Changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science* 244, 1360–1362.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2008. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3rd ed. Academic Press, New York.
- Perez, M., Benítez, S.U., Cartarozzi, L.P., Del Bel, E., Guimaraes, F.S., Oliveira, A.L., 2013. Neuroprotection and reduction of glial reaction by cannabidiol treatment after sciatic nerve transection in neonatal rats. *Eur. J. Neurosci.* 38 (10), 3424–3434.
- Radewicz, K., Garey, L.J., Gentleman, S.M., Reynolds, R., 2000. Increase in HLA-DR immunoreactive microglia in frontal and temporal cortex of chronic schizophrenics. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59 (2), 137–150.
- Rajagopal, L., Massey, B.W., Huang, M., Oyama, Y., Meltzer, H.Y., 2014. The novel object recognition test in rodents in relation to cognitive impairment in schizophrenia. *Curr. Pharm. Des.* 20 (31), 5104–5114.
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J.J., Makkos, Z., Meltzer, H., Overholser, J., Stockmeier, C., 2002. Layer-specific reductions in GFAP-reactive astroglia in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 57 (2–3), 127–138.
- Ribeiro, B.M., do Carmo, M.R., Freire, R.S., Rocha, N.F., Borella, V.C., de Menezes, A.T., Monte, A.S., Gomes, P.X., de Sousa, F.C., Vale, M.L., de Lucena, D.F., Gama, C.S., Macedo, D., 2013. Evidences for a progressive microglial activation and increase in iNOS expression in rats submitted to a neurodevelopmental model of schizophrenia: reversal by clozapine. *Schizophr. Res.* 151 (1–3), 12–19.
- Ribeiro-Santos, R., Teixeira, A.L., Salgado, J.V., 2014. Evidence for an immune role on cognition in schizophrenia: a systematic review. *Curr. Neuropharmacol.* 12 (3), 273–280.
- Rothermundt, M., Ahn, J.N., Jorgens, S., 2009. S100B in schizophrenia: an update. *Gen. Physiol. Biophys.* 28, F76–F81.
- Rujescu, D., Bender, A., Keck, M., Hartmann, A.M., Ohl, F., Raeder, H., Giegling, I., Genius, J., McCarley, R.W., Moller, H.J., Grunze, H., 2006. A pharmacological model for psychosis based on N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction: molecular, cellular, functional and behavioral abnormalities. *Biol. Psychiatry* 59 (8), 721–729.
- Schiavon, A.P., Soares, L.M., Bonato, J.M., Milani, H., Guimaraes, F.S., Weyffort de Oliveira, R.M., 2014. Protective effects of cannabidiol against hippocampal cell death and cognitive impairment induced by bilateral common carotid artery occlusion in mice. *Neurotox. Res.* 26 (4), 307–316.
- Schneider, T.P., Dwork, A.J., 2011. Searching for neuropathology: gliosis in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 69 (2), 134–139.
- Sidoryk-Węgrzynowicz, M., Węgrzynowicz, M., Lee, E., Bowman, A.B., Aschner, M., 2011. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol. Pathol.* 39 (1), 115–123.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119 (1), 7–35.
- Tagliaferro, P., Ramos, A.J., Lopez, E.M., Pecci Saavedra, J., Brusco, A., 1997. Neural and astroglial effects of a chronic parachlorophenylalanine-induced serotonin synthesis inhibition. *Mol. Chem. Neuropharmacol.* 32 (1–3), 195–211.
- Tilleux, S., Hermans, E., 2007. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. *J. Neurosci. Res.* 85, 2059–2070.
- van Berckel, B.N., Bossong, M.G., Boellaard, R., Kloet, R., Schuitmaker, A., Caspers, E., Luurtsema, G., Windhorst, A.D., Cahn, W., Lammertsma, A.A., Kahn, R.S., 2008. Microglia activation in recent-onset schizophrenia: a quantitative (R)-[¹¹C]PK11195 positron emission tomography study. *Biol. Psychiatry* 64 (9), 820–822.
- Verwer, R.W., Meijer, R.J., Van Uum, H.F., Witter, M.P., 1997. Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. *Hippocampus* 7, 397–402.
- Vigano, D., Guidali, C., Petrosino, S., Realini, N., Rubino, T., Di Marzo, V., Parolaro, D., 2009. Involvement of the endocannabinoid system in phencyclidine-induced cognitive deficits modelling schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 12 (5), 599–614.
- Wake, H., Moorhouse, A.J., Nabekura, J., 2011. Functions of microglia in the central nervous system—beyond the immune response. *Neuron Glia Biol.* 7 (1), 47–53.
- Wozniak, D.F., Brosnan-Watters, G., Nardi, A., McEwen, M., Corso, T.D., Olney, J.W., Fix, A.S., 1996. MK-801 neurotoxicity in male mice: histologic effects and chronic impairment in spatial learning. *Brain Res.* 707, 165–179.
- Xia, M., Abazyan, S., Jouroukhin, Y., Pletnikov, M., 2015. Behavioral sequelae of astrocyte dysfunction: focus on animal models of schizophrenia. *Schizophr. Res.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2014.10.044> (in press).
- Zuardi, A.W., Morais, S.L., Guimaraes, F.S., Mechoulam, R., 1995. Antipsychotic effect of cannabidiol. *J. Clin. Psychiatry* 56 (10), 485–486.
- Zuardi, A.W., Hallak, J.E., Dursun, S.M., Morais, S.L., Sanches, R.F., Musty, R.E., Crippa, J.A., 2006. Cannabidiol monotherapy for treatment-resistant schizophrenia. *J. Psychopharmacol.* 20 (5), 683–686.

Os experimentos do próximo manuscrito foram realizados durante estágio no laboratório do Prof. Dr. Anthony A. Grace, University of Pittsburgh, no período de 01 de dezembro de 2014 a 31 de março de 2015, com o auxílio financeiro do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESEARCH ARTICLE

Effects of Pubertal Cannabinoid Administration on Attentional Set-Shifting and Dopaminergic Hyper-Responsivity in a Developmental Disruption Model of Schizophrenia

Felipe V. Gomes, PhD; Francisco S. Guimarães, PhD; Anthony A. Grace, PhD

Department of Pharmacology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (Drs Gomes and Guimarães); Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences, University of São Paulo, Brazil (Drs Gomes and Guimarães); Departments of Neuroscience, Psychiatry and Psychology, University of Pittsburgh, A210 Langley Hall, Pittsburgh, PA 15260 (Dr Grace).

Correspondence: Felipe V. Gomes, MD, Department of Pharmacology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 3900 Bandeirantes Ave, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil (gomesfv@usp.br).

Abstract

Background: Adolescent exposure to cannabinoids in vulnerable individuals is proposed to be a risk factor for psychiatric conditions later in life, particularly schizophrenia. Evidence from studies in animals has indicated that a combination of repeated pubertal cannabinoid administration with either neonatal prefrontocortical lesion, isolation rearing, or chronic NMDA receptor antagonism administration induces enhanced schizophrenia-like behavioral disruptions. The effects of adolescent exposure to CB₁ receptor agonists, however, have not been tested in a developmental disruption model of schizophrenia.

Methods: This was tested in the methylazoxymethanol (MAM) model, in which repeated treatment with the synthetic cannabinoid agonist WIN 55,212-2 (WIN; 1.2 mg/kg) was extended over 25 days throughout puberty (postnatal days 40–65) in control and MAM rats. The rats received 20 injections, which were delivered irregularly to mimic the human condition. Adult rats were tested for attentional set-shifting task and locomotor response to amphetamine, which was compared with *in vivo* recording from ventral tegmental area (VTA) dopamine (DA) neurons.

Results: MAM-treated rats showed impairment in the attentional set-shifting task, augmented locomotor response to amphetamine administration, and an increased number of spontaneously active DA neurons in the VTA. Interestingly, pubertal WIN treatment in normal animals induced similar changes at adulthood as those observed in MAM-treated rats, supporting the notion that adolescence exposure to cannabinoids may represent a risk factor for developing schizophrenia-like signs at adulthood. However, contrary to expectations, pubertal WIN administration did not exacerbate the behavioral and electrophysiological changes in MAM-treated rats beyond that observed in WIN-treated saline rats (Sal). Indeed, WIN treatment actually attenuated the locomotor response to amphetamine in MAM rats without impacting DA neuron activity states.

Conclusions: Taken together, the present results indicate that the impact of cannabinoids during puberty/adolescence on schizophrenia models is more complex than may be predicted.

Keywords: adolescence, cannabinoid, dopamine, MAM treatment, schizophrenia

Received: May 23, 2014; Revised: June 20, 2014; Accepted: July 08, 2014

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of CINP.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

Introduction

Early insults during brain development have been associated with increased risk of schizophrenia (Harrison and Weinberger, 2005; Rapoport et al., 2005). Evidence for a neurodevelopmental disruption is largely based on follow-back, cohort, and population studies in which the pre-morbid history is associated with the presence of subtle prenatal perturbations that may interact with genetic predisposition to result in the schizophrenia phenotype (van Os et al., 2010). This finding is central to the development of animal models which utilize perinatal insults to produce a behavioral phenotype as adult.

One model that has substantial face validity utilizes the administration of the DNA methylating agent methylazoxymethanol acetate (MAM) to pregnant dams on gestational day (GD) 17 (Moore et al., 2006). This model utilizes a non-selective developmental disruption with no selective genetic manipulation or loss of a specific brain structure, and has findings consistent with those seen in schizophrenia patients. Furthermore, the deficits observed in this model parallel those observed in schizophrenia patients, including anatomical changes (Moore et al., 2006), behavioral deficits (Talamini et al., 2000; Flagstad et al., 2004; Moore et al., 2006), and disruption of rhythmic activity in the frontal cortex (Goto and Grace, 2006). In addition, the MAM model also shows pharmacological validity, with typical and atypical antipsychotics being able to reverse MAM-induced behavioral and electrophysiological changes (Pen et al., 2010; Valenti et al., 2011; Belujon et al., 2013) at a time course consistent with schizophrenia in humans (Agid et al., 2003; Valenti et al., 2011).

In addition to the perinatal phase, adolescence is also a period extremely vulnerable to disruption by environmental influence. This period is characterized by cognitive, emotional, and social maturation. Moreover, other important changes observed in adolescence are risk taking and novelty seeking (Kelley et al., 2004). Besides their adaptive benefits, these behaviors also render adolescents more vulnerable to pathology. For example, epidemiological studies showed an increased risk for drug abuse during adolescence (Fried et al., 2001; Martin et al., 2002). Among these drugs, epidemiological data indicate a causal association between early cannabis abuse and development of psychiatric conditions later in life, including schizophrenia (Arseneault et al., 2004; Degenhardt and Hall, 2006; Fergusson et al., 2006; van Laar et al., 2007). Adolescents initiate cannabis use before consuming other illicit drugs (Cleveland and Wiebe, 2008) and, although the majority of people who experience this drug during adolescence do not develop a psychiatric condition later in life (Gregg et al., 2007; Dekker et al., 2009; Kolliakou et al., 2011), genetic and environmental factors, such as childhood trauma or psychosocial stress, may predispose them to be particularly vulnerable to the effects of cannabis (Caspi et al., 2005; Arseneault et al., 2011; Kuepper et al., 2011). Therefore, adolescent exposure to cannabinoids (that is, CB₁ receptor agonists) in vulnerable individuals is proposed to act as a risk factor for inducing behavioral disturbances (Casadio et al., 2011). This conclusion seems to be more credible when the two-hit hypothesis of schizophrenia is taken into account. In this hypothesis, genetic or environmental factors disrupt early central nervous system development, producing vulnerability to a “second hit” that then may lead to the onset of schizophrenia symptoms. In fact, a combination of a neonatal prefrontocortical lesion with repeated pubertal cannabinoid (CB_{1/2} receptor agonist WIN55,212-2) administration leads to greater impairments in social behavior (Schneider

and Koch, 2005) and object recognition memory (Schneider and Koch, 2007), suggesting that pubertal cannabinoid administration in vulnerable individuals might induce enhanced behavioral disturbances. Furthermore, pubertal exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), the major psychotomimetic compound present in cannabis, worsened disruption of prepulse inhibition induced by isolation rearing (Malone and Taylor, 2006) and impairment in the object recognition test, induced by chronic administration of phencyclidine (Vigano et al., 2009), an NMDA receptor antagonist. The effects of pubertal exposure to CB₁ receptor agonists, however, have not been tested in neurodevelopmental disruption models of schizophrenia which, due to their delayed onset, would be expected to have greater interaction with adolescent cannabis use.

MAM-treated animals show increased dopamine (DA) neuron population activity in the ventral tegmental area (VTA) that correlates with the enhanced locomotor response to amphetamine (Lodge and Grace, 2007), indicating an enhanced activity in the mesolimbic DA system. Cannabis, like most drugs of abuse, causes an increase in extracellular DA levels (Gardner, 2005). In addition, repeated use of cannabis in adolescence could lead to sensitization of the mesolimbic DA system, a fact that would help to explain why cannabis use during adolescence may facilitate the development of schizophrenia (Stefanis et al., 2004). Moreover, altered DA function is proposed to make schizophrenia patients more vulnerable to the effects of CB₁ receptor agonists (Abi-Dargham, 2004).

Based on this evidence, the effects of pubertal exposure to the CB_{1/2} receptor agonist WIN55,212-2 (WIN) were tested on the behavioral changes and VTA DA neuronal activity observed in MAM-treated rats.

Material and Methods

Animals and MAM Treatment

All experiments were conducted according to the guidelines established by the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Pittsburgh. Pregnant female Sprague-Dawley rats were obtained from Hilltop Lab Animals on GD 15 and individually housed in ventilated plastic breeding tubs. MAM (20 mg/kg, i.p.; Midwest Research Institute) was administered on GD 17. Control dams received injections of saline (1 mL/kg, i.p.). Male pups were weaned on postnatal day (PD) 21 and housed in groups of two to three with littermates approximately 3–4 months of age, at which time they were used for behavioral and electrophysiological experiments. All experiments were performed on multiple litters of MAM- and saline-treated rats.

Experimental Design

Pregnant rats were administered MAM or saline on GD 17. Male offspring of both groups were then administered either the CB_{1/2} receptor agonist WIN55,212-2 (Sigma-Aldrich) or vehicle (Veh). WIN was emulsified in 0.5% Tween 80 and then diluted in saline (0.9%). The drug was administered intraperitoneally at a dose of 1.2 mg/kg in a volume of 1 mL/kg. The treatment with either the synthetic cannabinoid WIN or Veh lasted 25 days, from PD40 to PD65. This period corresponds to the pubertal phase in male rats. It should be noted that puberty and adolescence are

overlapping time periods with puberty being a part of adolescence (Schneider, 2013).

During the treatment period the rats received either one or two injections daily or no injection at all (10 times one injection, 5 times two injections, and 10 times no injection per day, for a total of 20 injections). This protocol was chosen in order to mimic the irregular consumption practice in humans.

As adults, the animals were submitted to the behavioral (PD85–PD100) and electrophysiological tests (PD100–PD125; Figure 1). The WIN dose and the experimental design were based on previous studies (Schneider and Koch, 2002, 2003 2005, 2007; Schneider et al., 2005; Schneider et al., 2008; Du and Grace, 2013; Zimmerman et al., 2013). All experiments were performed with investigators blinded to treatment.

The rats showed a normal increase in body weight (measured every other day from PD40 to PD80) that was independent of prenatal treatment (MAM or saline) or pubertal drug administration (WIN or Veh; data not shown).

Attentional Set-Shifting Task

Both five days before the attentional set-shifting task and during testing, rats were food restricted to approximately 85% of their body weight. The attentional set-shifting task, designed to evaluate extra-dimensional shift as a rodent analog of the Wisconsin Card Sort Test (Tait et al., 2014), was conducted in a white test box (L70 x W40 x H30cm³) in which a wood panel was used to divide one-third of the box length into two equal sections, forming the choice chambers to which access could be blocked via removable doors. During behavioral testing, one ceramic bowl (diameter of 8 cm and depth of 4 cm) was placed in each choice chamber. Food rewards were one-third pieces of Honey Nut Cheerios (General Mills), which were placed in one bowl per trial and covered with digging media. The media varied by odor and/or texture to provide two different stimulus dimensions to guide choice behavior. Testing was performed according to a modified version of the protocol previously described (Birrell and Brown,

2000; Gastambide et al., 2012). Rats were habituated to the testing box and then initially trained to dig in bowls filled with cage bedding to retrieve food rewards. Once habituated, rats were trained on two simple discriminations (SDs): one based on odor (mustard vs. celery) and one based on texture (shredded paper vs. styrofoam). SD order and reinforced stimuli were pseudo-randomly chosen per rat, but counterbalanced across the rat groups. These odor and texture stimuli were not used again in later phases of the experiment. The purpose of this preliminary phase was to acquaint rats with the basic discrimination learning process, as well as to encourage attention to the two different dimensions of the digging media that could be relevant for subsequent stages of discrimination learning. The following day, rats were given a series of seven discriminations (Table 1): a simple discrimination (SD); a compound discrimination (CD) in which digging media differed according to both odor and texture, but with correct and incorrect exemplars remaining similar to the preceding SD; a reversal (Rev1) in which the reward contingency of the CD exemplars is reversed; an intra-dimensional shift (IDS) in which a novel discrimination is learned with new stimuli, the new correct exemplar being of the same dimension as before; a second reversal (Rev2); and an extra-dimensional shift (EDS), in which another discrimination with new stimuli is learned, but in this case the correct exemplar is now from the other previously irrelevant dimension; and finally a third reversal. For each discrimination stage, testing continued until rats reached a criterion level of six correct consecutive trials. The procedure was the same for each stage: a trial was initiated by raising the removable doors to give rats access to the two digging bowls, only one of which was baited. The first four trials of each discrimination stage were deemed discovery trials, where rats were permitted to dig in both bowls if they chose the incorrect bowl first. An error was recorded if rats dug first in the unbaited bowl. On subsequent trials, if rats started to dig in the unbaited bowl, an error was recorded and the trial was terminated. If rats did not dig at all in either bowl within 3 min, the trial was aborted, recorded as an omission, and reinitiated. The number of errors made to reach criterion was recorded per rat for each stage of the test.

Figure 1. Experimental design. Pregnant rats were administered MAM or saline on GD 17. Rats from each group received either i.p. administration of the CB_{1/2} receptor agonist WIN55,212-2 (1.2 mg/kg) or Veh during PD40 to PD65. These rats were used for behavioral (attentional set-shifting task and amphetamine-induced hyperlocomotion) and electrophysiology tests as adults (PD > 85).

Locomotor Response to Amphetamine

Adult rats were tested in an open-field chamber (Coulbourn Instruments) in which locomotor activity was determined by beam breaks and recorded with TruScan software (Coulbourn Instruments). All experiments were conducted at the same time each day. Spontaneous activity was recorded for 30 min. After that, rats were injected with D-amphetamine sulfate (0.5 mg/kg,

Table 1. Example of Order of Exemplar Exposure in the Attentional Set-Shifting Task.

Discrimination	Odor Pair	Medium Pair
Simple discrimination	<u>cumin</u> /cinnamon	bedding
Compound discrimination	<u>cumin</u> /cinnamon	cedar shavings/boxo
Reversal 1	cumin/ <u>cinnamon</u>	cedar shavings/boxo
Intra-dimensional shift	<u>thyme</u> /cloves	fine shavings/paperchips
Reversal 2	thyme/ <u>cloves</u>	fine shavings/paperchips
Extra-dimensional shift	oregano/paprika	<u>Cat litter</u> /ground cat litter
Reversal 3	oregano/paprika	Cat litter/ <u>ground cat litter</u>

The table shows a possible order of exposure to the exemplar, where the rat must shift its attention from odor to digging medium at the extra-dimensional shift acquisition. The rewarded exemplar is indicated by the underlined words. Presented with either of the two exemplars from the irrelevant dimension, so that during each trial within a discrimination, all four exemplars are present. Rats were counterbalanced so that 50% underwent odor to medium shift.

i.p.; Sigma-Aldrich) and their locomotor activity was recorded for another 90 min.

In Vivo Recording from VTA DA Neurons

Rats were anesthetized with chloral hydrate and mounted on a stereotaxic frame (Kopf). The body temperature was maintained at 37°C using a thermostatically-controlled feedback heating pad (Fintronics). A burr hole was drilled in the skull overlying the right VTA. Extracellular recording microelectrodes were pulled from Omegadot 2.0mm glass tubing on a Narishige P-5 vertical electrode puller, the tip broken back under microscopic control, and filled with 2M NaCl containing 2% Pontamine Sky Blue dye. The impedance of the electrodes tested in situ ranged from 6 to 15 MΩ. The stereotaxic coordinates for the VTA were 5.3 mm posterior from bregma, 0.6 mm lateral to the midline, and 6.5–9.0 mm ventral from the brain surface. Single-unit activity was filtered using a highpass filter at 30 Hz and lowpass at 10 kHz. All data analysis was performed using custom software (Neuroscope). Only neuronal activity with a signal-to-noise ratio greater than 3:1 and at least 1–3 min of stable spontaneous activity was used. Six to nine vertical tracks, separated by 200 μm, were sampled in a predetermined pattern within the VTA of each rat. DA neurons were identified according to well-established electrophysiological features (Grace and Bunney, 1983; Ungless and Grace, 2012), which included the following criteria: (1) location; (2) an action potential duration > 2.2 ms with variable waveform within a train; (3) slow firing rate (1–10 Hz); and (4) irregular and burst firing patterns, with the start of burst characterized by interspike interval < 80 ms, and the end of burst characterized by interspike interval > 160 ms. The activity of each identified DA neuron was recorded for 1–3 min. Three parameters of the DA neuron activity were analyzed: (1) the number of spontaneously active DA neurons per electrode track; (2) average firing rate; and (3) the percentage of spikes that occurred in bursts. At the end of recordings, the recording sites were marked via electrophoretic ejection of Pontamine Sky Blue dye from the tip of the electrode (20 μA constant negative current, 30 min). Rats were euthanized by an overdose of anesthetic; the brains were removed, fixed for at least 48 h in 8% paraformaldehyde, cryoprotected in 25% sucrose, and sectioned for histological confirmation of the electrode sites.

Statistical Analysis

The attentional set-shifting task was analyzed using repeated-measures 3-way ANOVA with condition (prenatal treatment, MAM, or Sal) and pubertal treatment (Veh or WIN) as the main independent factors, and discrimination type as a repeated measurement followed by Bonferroni post hoc tests. Locomotor activity was analyzed by TruScan software and compared using repeated-measures 3-way ANOVA with condition and treatment as the main independent factors, and time as a repeated measurement. As the 3-way ANOVA indicated a significant effect of condition to treatment interaction but not to condition or treatment, we performed a 2-way ANOVA with group (Sal or MAM + Veh or WIN) as the main independent factor and time as a repeated measurement followed by Bonferroni post hoc tests. Electrophysiological analysis of DA neuron activity was analyzed using 2-way ANOVA with condition and treatment as the two factors followed by Bonferroni post hoc tests. All data are represented as the mean ± SEM. Results of statistical tests with $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Effects of Pubertal WIN Exposure on the Behavioral Flexibility in the Attentional Set-Shifting Task in Normal and MAM-Treated Rats Tested as Adults

During the habituation and training sessions, all rats learned to dig in bowls to retrieve the food reward and perform the SDs. During the test session, Sal:WIN, MAM:Veh, and MAM:WIN rats required significantly more trials to reach criterion than the Sal:Veh group. The repeated-measures 3-way ANOVA indicated significant effects of condition ($F_{1,29} = 18.3$, $p < 0.0001$), treatment ($F_{1,29} = 8.9$, $p < 0.01$), and discrimination type ($F_{6,174} = 68.7$, $p < 0.0001$). There were also significant condition versus treatment ($F_{1,29} = 5.4$, $p < 0.05$), condition versus discrimination type ($F_{6,174} = 3.1$, $p < 0.05$), and treatment versus discrimination type interactions ($F_{6,174} = 2.5$, $p < 0.05$), but no effects for interaction among condition versus treatment versus discrimination type ($F_{6,174} = 1.7$, $p > 0.05$).

All rats required more trials to learn the reversals than they required for either initial acquisition (SD and CD stages) or the IDS (discrimination type: $F_{6,174} = 68.7$, $p < 0.0001$). Moreover, Sal:Veh animals made significantly more errors to reach the criterion of six consecutive correct trials in the EDS than in the IDS ($p < 0.05$), demonstrating that they had formed an attentional set towards the relevant dimension before the EDS stage (Birrell and Brown, 2000; Gastambide et al., 2012). Concerning the omitted trials, although no significant difference was observed, the animals were most likely to stop digging at Rev1 (Sal:Veh, -2.9 ± 0.7 ; Sal:WIN, -3.6 ± 0.6 ; MAM:Veh, -2.7 ± 0.4 ; MAM:WIN, -3.2 ± 0.5), while fewer stopped digging at the IDS or Rev2, and very few stopped digging after that.

Planned comparison analyses were conducted which compared groups during each stage of discrimination. MAM:Veh rats ($n = 8$) required a significantly greater number of trials to reach criterion during the three reversal discriminations and the IDS discrimination compared to Sal:Veh rats ($n = 8$; $p < 0.05$, Bonferroni post hoc test; Figure 2). A similar pattern was observed during two of the three reversal discriminations (Rev1 and Rev2) and IDS discrimination, with MAM:WIN animals ($n = 9$) requiring more trials to reach criterion compared to Sal:Veh rats ($p < 0.05$, Bonferroni post hoc test; Figure 2). Moreover, pubertal WIN treatment in normal rats (Sal:WIN rats, $n = 8$) required a significantly

Figure 2. Sal:WIN, MAM:Veh, and MAM:WIN-treated rats exhibited deficits in the attentional set shifting task ($n = 8$ –9/group). Graph bars represent the mean ± SEM of the number of errors made to reach the criterion of six correct consecutive trials in each test discrimination. * $p < 0.05$ vs. Sal:Veh rats; repeated measures of 3-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. SD: simple discrimination; CD: compound discrimination; IDS: intra-dimensional shift; EDS: extra-dimensional shift; Rev: discriminations requiring a reversal learning.

greater number of trials to reach criterion during the Rev1 and Rev2 ($p < 0.05$, Bonferroni post hoc test; [Figure 2](#)). No differences were observed among Sal:WIN, MAM:Veh, and MAM:WIN during any discriminations.

Effects of Pubertal WIN Exposure on Amphetamine-Induced Hyperlocomotion in Normal and MAM-Treated Rats Tested as Adults

Both Sal:WIN and MAM:Veh rats exhibited greater locomotor response to amphetamine compared to Sal:Veh rats. However, the MAM:WIN rats showed significantly less amphetamine-induced locomotor activity than either Sal:Win or MAM:Sal rats and were not significantly different from controls. The repeated-measures 3-way ANOVA indicated no significant effects of condition ($F_{1,29} = 1.3$, $p > 0.05$) or treatment ($F_{1,29} = 0.22$, $p > 0.05$); however, there was a significant effect of time ($F_{23,667} = 52.4$, $p < 0.001$) and an interaction between condition and treatment ($F_{1,29} = 6.5$, $p < 0.05$). There were also significant condition versus time ($F_{23,667} = 2.1$, $p < 0.05$), treatment versus time ($F_{23,667} = 1.9$, $p < 0.05$), and condition versus treatment versus time interactions ($F_{23,667} = 2.4$, $p < 0.01$). Although the 3-way ANOVA did not indicate any effect of condition and treatment, the 2-way ANOVA showed significant effects of group (Sal or MAM + Veh or WIN; $F_{3,667} = 3.5$, $p < 0.05$), time ($F_{23,667} = 53.12$, $p < 0.001$), and interaction between group and time ($F_{69,667} = 2.2$, $p < 0.001$).

Consistent with previous studies showing that rats treated with MAM on GD17 exhibited an enhanced locomotor response to amphetamine ([Flagstad et al., 2004](#); [Moore et al., 2006](#)), MAM:Veh rats ($n = 8$) showed significantly higher levels of locomotor activity in response to amphetamine administration (0.5 mg/kg, i.p.) compared to controls (Sal:Veh, $n = 8$; $p < 0.05$ at 5, 10, and 15 min after amphetamine, Bonferroni post hoc test; [Figure 3](#)). Likewise, pubertal WIN treatment in normal rats (Sal:WIN, $n = 8$) produced a significant enhancement in amphetamine-stimulated locomotion compared to Sal:Veh rats ($p < 0.05$ at 5, 10, 20, and 40 min after amphetamine, Bonferroni post hoc test; [Figure 3](#)).

Figure 3. Pubertal WIN exposure produces opposite effects on MAM and normal rats. MAM:Veh rats ($n = 8$) showed significantly higher amphetamine-induced locomotion compared to Sal:Veh rats ($n = 8$). Normal rats treated with WIN (1.2 mg/kg, i.p., PD40–PD65; Sal:WIN, $n = 8$) also showed a significantly higher amphetamine-induced locomotion compared to Sal:Veh rats. In contrast, MAM:WIN ($n = 9$) showed an attenuation of the aberrant enhancement of the locomotor response to amphetamine that was observed in MAM-treated rats. Sal:Veh and MAM:WIN rats were not significantly different. Locomotor activity was calculated within each bin (bin width = 5 min). D-amphetamine (0.5 mg/kg, i.p.) injection is indicated by the dashed line. Spontaneous activity before amphetamine injection was not significantly different among all four groups. * $p < 0.05$ vs. Sal:Veh rats; # $p < 0.05$ vs. MAM:Veh; repeated measures of 2-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test (see Statistical analysis).

Surprisingly, WIN treatment in MAM rats (MAM:WIN, $n = 9$) induced a significantly lower level of amphetamine-stimulated locomotion compared to MAM:Veh rats ($p < 0.05$ at 10 and 15 min after amphetamine, Bonferroni post hoc test; [Figure 3](#)), and was not significantly different from Sal:Veh rats ($p > 0.05$, Bonferroni post hoc test). The locomotor activity before amphetamine administration did not differ significantly among all four groups ($p > 0.05$, Bonferroni post hoc test; [Figure 3](#)).

Based on the opposite effects induced by the chronic pubertal treatment with WIN in normal and MAM-treated rats, we tested the effects of a WIN administration given once on PD65 to test whether repeated administration would be required to induce altered locomotor responses ([Supplementary Figure 1](#)). Indeed, no effect in the amphetamine-stimulated locomotion induced by the single WIN injection was observed in saline- or MAM-treated rats tested on PD85–PD90 ([Supplementary Figure 2](#)).

Effects of Pubertal WIN Exposure on VTA DA Neuron Activity in Normal and MAM-Treated Rats Tested as Adults

Both MAM groups as well as the Sal:WIN group demonstrated significant increases in the number of DA neurons firing spontaneously compared to Sal:Veh rats. The number of spontaneously active DA neurons was significantly affected by prenatal MAM (condition: $F_{1,23} = 4.4$, $p < 0.05$) and pubertal WIN administration (treatment: $F_{1,23} = 12.9$, $p < 0.001$), but no interaction was observed ($F_{1,23} = 2.0$, $p > 0.05$; 2-way ANOVA). Consistent with what has been reported previously ([Lodge and Grace, 2007, 2009](#)), recordings from MAM:Veh rats ($n = 7$ rats, 78 neurons) showed a significantly greater number of spontaneously active DA neurons per electrode track (1.6 ± 0.1 cells/track, $p < 0.05$, Bonferroni post hoc test) compared to Sal:Veh rats ($n = 6$ rats, 46 neurons, 0.99 ± 0.2 cells/track; [Figure 4A](#)).

Compared to Sal:Veh rats, Sal:WIN rats ($n = 7$, 92 neurons) showed a significantly greater number of spontaneously active DA neurons (1.9 ± 0.2 cells/track, $p < 0.05$, Bonferroni post hoc test). These changes required repeated WIN exposure, given that no effect was observed after a single WIN injection on PD65 ([Supplementary Figure 3](#)).

Similar to the MAM:Veh rats, the numbers of DA neurons firing in the MAM:WIN ($n = 7$, 90 neurons; 1.9 ± 0.3 cells/track) was greater than the Sal:Veh rats ($p < 0.05$, Bonferroni post hoc test). Importantly, despite differences in amphetamine-induced locomotion, no difference was observed between MAM:Veh and MAM:WIN rats with respect to DA neuron activity ($p > 0.05$, Bonferroni post hoc test; [Figure 4A](#)). The firing rate and percentage of spikes in bursts did not differ significantly across all four groups ($p > 0.05$ by two-way ANOVA; [Figure 4B](#) and [4C](#)).

Discussion

Consistent with previous studies ([Featherstone et al., 2007](#); [Lodge and Grace, 2007](#); [Gastambide et al., 2012](#)), MAM-treated rats showed an impairment in the attentional set-shifting task, augmented locomotor response to amphetamine administration, and an increased number of spontaneously active DA neurons in the VTA. Interestingly, pubertal treatment with the $CB_{1/2}$ receptor agonist WIN from PD40 through PD65 in normal animals induced similar changes at adulthood as those observed in MAM-treated rats. Moreover, WIN treatment did not exacerbate the changes in MAM-treated rats. Instead, WIN treatment actually prevented the increase in amphetamine-induced

Figure 4. MAM rats and WIN-treated normal rats showed increases in the number of DA neurons firing spontaneously. (A) Pubertal WIN treatment (1.2 mg/kg, i.p.; PD40–PD65; Sal:WIN, $n = 7$, 92 neurons) increased the number of spontaneously active DA neurons (presented as cells/track) compared to control group (Sal:Veh, $n = 6$ rats, 46 neurons). MAM:Veh ($n = 7$, 78 neurons) and MAM:WIN rats ($n = 7$, 90 neurons) also had a significantly higher number of DA neurons firing per electrode track compared to Sal:Veh, but WIN treatment did not significantly alter the number of DA neurons firing in MAM-treated rats compared to MAM:Veh. (B) Average firing rate and (C) percentage of spikes fired in bursts were not significantly different. * $p < 0.05$ vs. Sal:Veh rats, 2-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.

locomotion in the MAM rats without altering the increase in DA neuron activity.

The results of the present study are consistent with recent findings showing that repeated pubertal cannabinoid treatment induces lasting behavioral changes in adulthood, including sensorimotor gating impairment, abnormal social behavior, and anhedonia (Schneider and Koch, 2003, 2005, 2007; Schneider et al., 2008). Moreover, rodents chronically treated during different periods of adolescence with other CB₁ receptor agonists (CP55,940 and THC) and tested as adults also exhibited deficits in sensorimotor gating, object recognition, and spatial working memory (O'Shea et al., 2004; Quinn et al., 2008; Rubino, Realini, Braidà, Alberio, et al., 2009; Rubino, Realini, Braidà, Guidi, et al., 2009; Gleason et al., 2012). The current study is the first time that the long-term effects of cannabinoid exposure during adolescence have been evaluated in the attentional set-shifting task.

In the set-shifting task, rats are required to solve a series of discriminations by attending to a particular perceptual

dimension of a multidimensional stimulus. A critical discrimination occurs when rats are required to shift to an alternate perceptual dimension after having acquired an attentional set to the previous dimension (Tait et al., 2013). The neural substrates of set shifting and reversal learning are reasonably well-defined. Lesions of the monkey lateral prefrontal cortex (Dias et al., 1997) and the equivalent prelimbic and infralimbic regions of the rat medial prefrontal cortex (Birrell and Brown, 2000) disrupt attentional set-shifting ability, whereas lesions of the orbitofrontal cortex selectively impair reversal learning in both species (Dias et al., 1997; McAlonan and Brown, 2003). Impaired reversal learning has recently been highlighted to occur reliably in schizophrenia patients. Indeed, Leeson et al. (2009) found in a large group of first-episode schizophrenia patients that although they were impaired on set shifting, they also exhibited small but consistent deficits in reversal learning. Moreover, chronic cannabis use in adolescence appears to be associated with overall less efficient executive function and attention (Abdullaev et al., 2010).

Consistent with previous studies (Featherstone et al., 2007; Gastambide et al., 2012), MAM rats exhibited a variety of cognitive impairments, including reversal learning and attentional set shifting, as defined by requiring a greater number of trials than controls to successfully learn to shift cognitive set between stimuli belonging to the same perceptual dimension (IDS), and having difficulties in learning to reverse a previously acquired discrimination. Interestingly, the pubertal WIN treatment in normal rats also resulted in a significantly greater number of trials to reach criterion during two of the three reversal learning discrimination trials. Thus, the deficits observed in reversal learning, together with the preservation of ability to shift strategy, indicated that MAM-treated rats and the pubertal WIN exposure in normal animals induced an increased rigidity in the processes required to update responses based on affective associations between stimuli and reward presentation, but did not affect ability for higher order attentional flexibility (EDS). This suggests that the deficits in the reversal learning and IDS were not due to a generalized performance or cognitive impairment. Although it has been suggested that adolescent cannabinoid exposure in vulnerable individuals might induce even more pronounced behavioral disturbances, and studies with animals have shown an enhanced cognitive impairment observed after the combination of pubertal exposure to cannabinoids with neonatal prefrontocortical lesions, social isolation, or chronic administration of phencyclidine (Schneider and Koch, 2005, 2007; Malone and Taylor, 2006; Vigano et al., 2009), no significant difference was observed between Veh- and WIN-treated MAM rats in the attentional set-shifting task.

Similar to MAM-treated rats, WIN administration during puberty induced an augmented locomotor response to amphetamine and an increased number of spontaneously active DA neurons in the VTA in normal animals as adults. Previous studies have shown that acute CB₁ receptor activation increases mesolimbic DA activity (French, 1997; Tanda et al., 1997; Wu and French, 2000). However, this is the first study showing persistent long-term changes in mesolimbic DA activity induced by pubertal cannabinoid exposure.

Prenatal MAM administration and pubertal cannabinoid exposure have been shown to induce similar changes in GABA neurons of adult rats. Zamberletti et al. (2014) observed that adolescent THC exposure in mice reduced GAD67 expression in interneurons containing the calcium binding protein parvalbumin (PV) within the adult prefrontal cortex. Moreover, repeated CB₁ receptor activation in adolescence elicited an enduring state of prefrontal cortex disinhibition due to a developmental

impairment of prefrontal GABAergic transmission (Cass et al., 2014). Decreased GABAergic signaling is among the most robust postmortem pathological changes observed in schizophrenia (Reynolds et al., 2002; Lewis et al., 2005). Specifically, a decrease in GAD67 protein is observed postmortem throughout the cortex of schizophrenia patients (Hashimoto et al., 2003) that are largely restricted to the GABAergic PV-positive interneurons (Lewis et al., 2005). Interestingly, a decrease in PV-containing interneurons is also a consistent observation in a diverse variety of animal models of schizophrenia, including the MAM model (Penschuck et al., 2006; Lodge et al., 2009; Gill and Grace, 2014).

It has been suggested that the augmented DA neuron activity and hyper-responsivity to psychomotor stimulants observed in MAM-treated rats results from an increased activity within ventral regions of the hippocampus due to a loss of PV interneurons (Lodge et al., 2009). In addition to the ventral hippocampus, adult MAM-treated rats also display specific reductions in the number of PV-positive interneurons throughout the medial prefrontal cortex (Penschuck et al., 2006; Lodge and Grace, 2009) and the orbitofrontal cortex (Gastambide et al., 2012), the main brain structures involved in set-shifting and reversal learning, respectively (Birrell and Brown, 2000; McAlonan and Brown, 2003). Thus, based on the evidence indicating that cannabinoid exposure during adolescence may reduce the number of PV-positive interneurons (Zamberletti et al., 2014), changes in the PV expression could be involved in the dopaminergic dysfunction and in the impairment observed during the attentional set-shifting task in WIN-treated normal, similar to that observed with MAM-treated rats.

No additive or synergic effect, however, was found in MAM-treated rats that received WIN. Although this could reflect a ceiling effect, it is not possible to rule out the involvement of at least partially distinct (and parallel) mechanisms for the attentional set-shifting task impairment induced by these two treatments.

The most intriguing finding of our study is that, although WIN-treated MAM rats showed an enhanced VTA DA neuronal spontaneous activity that was similar to Veh-treated MAM rats, pubertal WIN exposure in MAM rats decreased amphetamine-induced hyperlocomotion. The reason for this attenuation is unclear, particularly given that increases in DA neuronal activity in the VTA, such as those observed after either MAM (Lodge and Grace, 2007) or WIN administration, along with other models (e.g., amphetamine sensitization [Lodge and Grace, 2012], temporal lobe epilepsy [Cifelli and Grace, 2012]) have consistently shown parallel changes between the number of DA neurons firing spontaneously and amphetamine-induced locomotor activity. This suggests that the pubertal exposure to WIN may have induced compensatory changes in MAM rats that are downstream from DA neuron activity. Thus, it is known that exogenous cannabinoids affect the function of the endocannabinoid system. Indeed, pubertal cannabinoid exposure can change the expression of components of the endocannabinoid system in brain structures related to motivation and motor control (Marco et al., 2007; Ceci et al., 2014). Therefore, plastic changes in the endocannabinoid system induced by repeated CB₁ receptor agonist administration could lead to plastic changes in the CB₁ receptor modulation of GABA- or glutamate-mediated neurotransmission (Wilson and Nicoll, 2002; Fernandez-Ruiz et al., 2010) in key brain structures related to hyperlocomotion, such as the nucleus accumbens, thereby compensating for the modifications in other brain areas (for example, the ventral subiculum) induced by MAM. Interestingly, Spano et al. (2013) observed that both

WIN self-administration and passive WIN administration (i.v.) over 14 days attenuated hyperlocomotion in response to an acute phencyclidine (PCP) challenge in adult rats treated chronically with PCP, a model of schizophrenia based on the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction.

Alternately, a decrease in the DA transporter seen in the caudate nucleus of schizophrenia patients was not observed in patients who had used cannabis (Dean et al., 2003), leading the investigators to suggest that THC might reverse the decreases in DA transporter expression associated to schizophrenia.

In conclusion, these results are consistent with the notion that adolescent exposure to cannabinoids may represent a risk factor for developing schizophrenia-like signs at adulthood. However, contrary to our hypothesis that pubertal MAM-treated rats would be more susceptible to the cannabinoid exposure, WIN administration did not exacerbate the behavioral and electrophysiological changes in MAM-treated rats, and in fact prevented the augmentation of the locomotor response to amphetamine. While several epidemiological studies have clearly shown an association between cannabis use and susceptibility to schizophrenia (Arseneault et al., 2004; Casadio et al., 2011), it is not possible to evaluate if subgroups of patients that may develop schizophrenia later in life are protected by cannabis use. Therefore, it is clear that the relationship between cannabinoid exposure and susceptibility to disease states is more complex than may be predicted by correlative epidemiological studies.

Supplementary Material

For supplementary material accompanying this paper, visit <http://www.ijnp.oxfordjournals.org/>

Acknowledgments

We thank Niki MacMurdo for her technical assistance. This work was supported by the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education, CAPES/PDSE (10865/13-7, FVG) and USPHS MH57440 (AAG). Drs Gomes and Guimarães are, respectively, recipients of a FAPESP doctoral (2010/17343-0) and of a CNPq researcher fellowship.

Statement of Interest

Drs Gomes and Guimarães declare no conflict of interest. Dr Grace has received funds from Johnson & Johnson, Lundbeck, Pfizer, GSK, Merck, Takeda, Dainippon Sumitomo, Otsuka, Lilly, Roche, Asubio, and Abbott.

References

- Abdullaev Y, Posner MI, Nunnally R, Dishion TJ (2010) Functional MRI evidence for inefficient attentional control in adolescent chronic cannabis abuse. *Behav Brain Res* 215:45–57.
- Abi-Dargham A (2004) Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *Int J Neuropsychopharmacol* 7(Suppl 1):S1–5.
- Agid O, Kapur S, Arenovich T, Zipursky RB (2003) Delayed-onset hypothesis of antipsychotic action: a hypothesis tested and rejected. *Arch Gen Psychiatry*, 60:1228–1235.
- Arseneault L, Cannon M, Fisher HL, Polanczyk G, Moffitt TE, Caspi A (2011) Childhood trauma and children's emerging psychotic symptoms: A genetically sensitive longitudinal cohort study. *Am J Psychiatry* 168:65–72.

- Arseneault L, Cannon M, Witton J, Murray RM (2004) Causal association between cannabis and psychosis: examination of the evidence. *Br J Psychiatry* 184:110–117.
- Belujon P, Patton MH, Grace AA (2013) Disruption of prefrontal cortical-hippocampal balance in a developmental model of schizophrenia: reversal by sulpiride. *Int J Neuropsychopharmacol* 16:507–512.
- Birrell JM, Brown VJ (2000) Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *J Neurosci* 20:4320–4324.
- Casadio P, Fernandes C, Murray RM, Di Forti M (2011) Cannabis use in young people: the risk for schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1779–1787.
- Caspi A, Moffitt TE, Cannon M, McClay J, Murray R, Harrington H, Taylor A, Arseneault L, Williams B, Braithwaite A, Poulton R, Craig IW (2005) Moderation of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: longitudinal evidence of a gene X environment interaction. *Biol Psychiatry* 57:1117–1127.
- Cass DK, Flores-Barrera E, Thomases DR, Vital WF, Caballero A, Tseng KY (2014) CB1 cannabinoid receptor stimulation during adolescence impairs the maturation of GABA function in the adult rat prefrontal cortex. *Mol Psychiatry* 19:536–543.
- Ceci C, Mela V, Macri S, Marco EM, Viveros MP, Laviola G (2014) Prenatal corticosterone and adolescent URB597 administration modulate emotionality and CB1 receptor expression in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 231:2131–2144.
- Cifelli P, Grace AA (2012) Pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy in the rat is associated with increased dopamine neuron activity. *Int J Neuropsychopharmacol* 15:957–964.
- Cleveland HH, Wiebe RP (2008) Understanding the association between adolescent marijuana use and later serious drug use: gateway effect or developmental trajectory? *Dev Psychopathol* 20:615–632.
- Dean B, Bradbury R, Copolov DL (2003) Cannabis-sensitive dopaminergic markers in postmortem central nervous system: changes in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 53:585–592.
- Degenhardt L, Hall W (2006) Is cannabis use a contributory cause of psychosis? *Can J Psychiatry* 51:556–565.
- Dekker N, Linszen DH, De Haan L (2009) Reasons for cannabis use and effects of cannabis use as reported by patients with psychotic disorders. *Psychopathology* 42:350–360.
- Dias R, Robbins TW, Roberts AC (1997) Dissociable forms of inhibitory control within prefrontal cortex with an analog of the Wisconsin Card Sort Test: restriction to novel situations and independence from “on-line” processing. *J Neurosci* 17:9285–9297.
- Du Y, Grace AA (2013) Peripubertal Diazepam Administration Prevents the Emergence of Dopamine System Hyperresponsivity in the MAM Developmental Disruption Model of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 38:1881–1888.
- Featherstone RE, Razos Z, Nobrega JN, Kapur S, Fletcher PJ (2007) Gestational methylazoxymethanol acetate treatment impairs select cognitive functions: parallels to schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 32:483–492.
- Fergusson DM, Poulton R, Smith PF, Boden JM (2006) Cannabis and psychosis. *BMJ* 332:172–175.
- Fernandez-Ruiz J, Hernandez M, Ramos JA (2010) Cannabinoid-dopamine interaction in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther* 16:e72–91.
- Flagstad P, Mork A, Glenthøj BY, van Beek J, Michael-Titus AT, Didriksen M (2004) Disruption of neurogenesis on gestational day 17 in the rat causes behavioral changes relevant to positive and negative schizophrenia symptoms and alters amphetamine-induced dopamine release in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* 29:2052–2064.
- French ED (1997) delta9-Tetrahydrocannabinol excites rat VTA dopamine neurons through activation of cannabinoid CB1 but not opioid receptors. *Neurosci Lett* 226:159–162.
- Fried PA, James DS, Watkinson B (2001) Growth and pubertal milestones during adolescence in offspring prenatally exposed to cigarettes and marijuana. *Neurotoxicol Teratol* 23:431–436.
- Gardner EL (2005) Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacol Biochem Behav* 81:263–284.
- Gastambide F, Cotel MC, Gilmour G, O'Neill MJ, Robbins TW, Tricklebank MD (2012) Selective remediation of reversal learning deficits in the neurodevelopmental MAM model of schizophrenia by a novel mGlu5 positive allosteric modulator. *Neuropsychopharmacology* 37:1057–1066.
- Gill KM, Grace AA (2014) Corresponding decrease in neuronal markers signals progressive parvalbumin neuron loss in MAM schizophrenia model. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:1609–1619.
- Gleason KA, Birnbaum SG, Shukla A, Ghose S (2012) Susceptibility of the adolescent brain to cannabinoids: long-term hippocampal effects and relevance to schizophrenia. *Transl Psychiatry* 2:e199.
- Goto Y, Grace AA (2006) Alterations in medial prefrontal cortical activity and plasticity in rats with disruption of cortical development. *Biol Psychiatry* 60:1259–1267.
- Grace AA, Bunney BS (1983) Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization. *Neuroscience* 10:301–315.
- Gregg L, Barrowclough C, Haddock G (2007) Reasons for increased substance use in psychosis. *Clin Psychol Rev* 27:494–510.
- Harrison PJ, Weinberger DR (2005) Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10:40–68.
- Hashimoto T, Volk DW, Eggan SM, Mirnics K, Pierri JN, Sun Z, Sampson AR, Lewis DA (2003) Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J Neurosci* 23:6315–6326.
- Kelley AE, Schochet T, Landry CF (2004) Risk taking and novelty seeking in adolescence: introduction to part I. *Ann NY Acad Sci* 1021:27–32.
- Kolliakou A, Joseph C, Ismail K, Atakan Z, Murray RM (2011) Why do patients with psychosis use cannabis and are they ready to change their use? *Int J Dev Neurosci* 29:335–346.
- Kuepper R, van Os J, Lieb R, Wittchen HU, Henquet C (2011) Do cannabis and urbanicity co-participate in causing psychosis? Evidence from a 10-year follow-up cohort study. *Psychol Med* 41:2121–2129.
- Leeson VC, Robbins TW, Matheson E, Hutton SB, Ron MA, Barnes TR, Joyce EM (2009) Discrimination learning, reversal, and set-shifting in first-episode schizophrenia: stability over six years and specific associations with medication type and disorganization syndrome. *Biol Psychiatry* 66:586–593.
- Pen GL, Jay TM, Krebs MO (2011) Effect of antipsychotics on spontaneous hyperactivity and hypersensitivity to MK-801-induced hyperactivity in rats prenatally exposed to methylazoxymethanol. *J Psychopharmacol* 25:822–835.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW (2005) Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6:312–324.
- Lodge DJ, Behrens MM, Grace AA (2009) A loss of parvalbumin-containing interneurons is associated with diminished oscillations

- latory activity in an animal model of schizophrenia. *J Neurosci* 29:2344–2354.
- Lodge DJ, Grace AA (2007) Aberrant hippocampal activity underlies the dopamine dysregulation in an animal model of schizophrenia. *J Neurosci* 27:11424–11430.
- Lodge DJ, Grace AA (2009) Gestational methylazoxymethanol acetate administration: a developmental disruption model of schizophrenia. *Behav Brain Res* 204:306–312.
- Lodge DJ, Grace AA (2012) Divergent activation of ventromedial and ventrolateral dopamine systems in animal models of amphetamine sensitization and schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 15:69–76.
- Malone DT, Taylor DA (2006) The effect of Delta9-tetrahydrocannabinol on sensorimotor gating in socially isolated rats. *Behav Brain Res* 166:101–109.
- Marco EM, Granstrem O, Moreno E, Llorente R, Adriani W, Laviola G, Viveros MP (2007) Subchronic nicotine exposure in adolescence induces long-term effects on hippocampal and striatal cannabinoid-CB1 and mu-opioid receptors in rats. *Eur J Pharmacol* 557:37–43.
- Martin CA, Kelly TH, Rayens MK, Brogli BR, Brenzel A, Smith WJ, Omar HA (2002) Sensation seeking, puberty, and nicotine, alcohol, and marijuana use in adolescence. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41:1495–1502.
- McAlonan K, Brown VJ (2003) Orbital prefrontal cortex mediates reversal learning and not attentional set shifting in the rat. *Behav Brain Res* 146:97–103.
- Moore H, Jentsch JD, Ghajarnia M, Geyer MA, Grace AA (2006) A neurobehavioral systems analysis of adult rats exposed to methylazoxymethanol acetate on E17: implications for the neuropathology of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 60:253–264.
- O'Shea M, Singh ME, McGregor IS, Mallet PE (2004) Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *J Psychopharmacol* 18:502–508.
- Pen GL, Jay TM, Krebs MO (2011) Effect of antipsychotics on spontaneous hyperactivity and hypersensitivity to MK-801-induced hyperactivity in rats prenatally exposed to methylazoxymethanol. *J Psychopharmacol* 25:822–835.
- Penschuck S, Flagstad P, Didriksen M, Leist M, Michael-Titus AT (2006) Decrease in parvalbumin-expressing neurons in the hippocampus and increased phencyclidine-induced locomotor activity in the rat methylazoxymethanol (MAM) model of schizophrenia. *Eur J Neurosci* 23:279–284.
- Quinn HR, Matsumoto I, Callaghan PD, Long LE, Arnold JC, Gunasekaran N, Thompson MR, Dawson B, Mallet PE, Kashem MA, Matsuda-Matsumoto H, Iwazaki T, McGregor IS (2008) Adolescent rats find repeated Delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure. *Neuropsychopharmacology* 33:1113–1126.
- Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR (2005) The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Mol Psychiatry* 10:434–449.
- Reynolds GP, Beasley CL, Zhang ZJ (2002) Understanding the neurotransmitter pathology of schizophrenia: selective deficits of subtypes of cortical GABAergic neurons. *J Neural Transm* 109:881–889.
- Rubino T, Realini N, Braidà D, Alberio T, Capurro V, Vigano D, Guidali C, Sala M, Fasano M, Parolaro D (2009) The depressive phenotype induced in adult female rats by adolescent exposure to THC is associated with cognitive impairment and altered neuroplasticity in the prefrontal cortex. *Neurotox Res* 15:291–302.
- Rubino T, Realini N, Braidà D, Guidi S, Capurro V, Vigano D, Guidali C, Pinter M, Sala M, Bartesaghi R, Parolaro D (2009) Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus* 19:763–772.
- Schneider M (2013) Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell Tissue Res* 354:99–106.
- Schneider M, Drews E, Koch M (2005) Behavioral effects in adult rats of chronic prepubertal treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *Behav Pharmacol* 16:447–454.
- Schneider M, Koch M (2002) The cannabinoid agonist WIN 55,212-2 reduces sensorimotor gating and recognition memory in rats. *Behav Pharmacol* 13:29–37.
- Schneider M, Koch M (2003) Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 28:1760–1769.
- Schneider M, Koch M (2005) Deficient social and play behavior in juvenile and adult rats after neonatal cortical lesion: effects of chronic pubertal cannabinoid treatment. *Neuropsychopharmacology* 30:944–957.
- Schneider M, Koch M (2007) The effect of chronic peripubertal cannabinoid treatment on deficient object recognition memory in rats after neonatal mPFC lesion. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:180–186.
- Schneider M, Schomig E, Leweke FM (2008) Acute and chronic cannabinoid treatment differentially affects recognition memory and social behavior in pubertal and adult rats. *Addict Biol* 13:345–357.
- Spano MS, Fattore L, Cadeddu F, Fratta W, Fadda P (2013) Chronic cannabinoid exposure reduces phencyclidine-induced schizophrenia-like positive symptoms in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)* 225:531–542.
- Stefanis NC, Delespaul P, Henquet C, Bakoula C, Stefanis CN, Van Os J (2004) Early adolescent cannabis exposure and positive and negative dimensions of psychosis. *Addiction* 99:1333–1341.
- Tait DS, Chase EA, Brown VJ (2014) Attentional set-shifting in rodents: a review of behavioural methods and pharmacological results. *Curr Pharm Des* 20:5046–5059.
- Talamini LM, Ellenbroek B, Koch T, Korf J (2000) Impaired sensory gating and attention in rats with developmental abnormalities of the mesocortex. Implications for schizophrenia. *Ann NY Acad Sci* 911:486–494.
- Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G (1997) Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science* 276:2048–2050.
- Ungless MA, Grace AA (2012) Are you or aren't you? Challenges associated with physiologically identifying dopamine neurons. *Trends Neurosci* 35:422–430.
- van Laar M, van Dorsselaer S, Monshouwer K, de Graaf R (2007) Does cannabis use predict the first incidence of mood and anxiety disorders in the adult population? *Addiction* 102:1251–1260.
- van Os J, Kenis G, Rutten BP (2010) The environment and schizophrenia. *Nature* 468:203–212.
- Valenti O, Cifelli P, Gill KM, Grace AA (2011) Antipsychotic drugs rapidly induce dopamine neuron depolarization block in a developmental rat model of schizophrenia. *J Neurosci* 31:12330–12338.
- Vigano D, Guidali C, Petrosino S, Realini N, Rubino T, Di Marzo V, Parolaro D (2009) Involvement of the endocannabinoid system in phencyclidine-induced cognitive deficits modelling schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 12:599–614.

- Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296:678–682.
- Wu X, French ED (2000) Effects of chronic delta9-tetrahydrocannabinol on rat midbrain dopamine neurons: an electrophysiological assessment. *Neuropharmacology* 39:391–398.
- Zamberletti E, Beggiato S, Steardo L, Jr., Prini P, Antonelli T, Ferraro L, Rubino T, Parolaro D (2014) Alterations of prefrontal cortex GABAergic transmission in the complex psychotic-like phenotype induced by adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol exposure in rats. *Neurobiol Dis* 63:35–47.
- Zimmerman EC, Bellaire M, Ewing SG, Grace AA (2013) Abnormal stress responsivity in a rodent developmental disruption model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 38:2131–2139.