

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

**TRATAMENTO REPETIDO COM CANABIDIOL REVERTE ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS OBSERVADAS EM UM MODELO DE
ESQUIZOFRENIA BASEADO NO ANTAGONISMO DOS RECEPTORES
NMDA: POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES 5-HT_{1A} E CB1**

NAIELLY RODRIGUES DA SILVA

RIBEIRÃO PRETO

2017

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

NAIELLY RODRIGUES DA SILVA

Tratamento repetido com canabidiol reverte alterações comportamentais observadas em um modelo de esquizofrenia baseado no antagonismo dos receptores NMDA: possível envolvimento dos receptores 5-HT_{1A} e CB1

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

RIBEIRÃO PRETO

2017

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

Silva, Naielly Rodrigues

Tratamento repetido com canabidiol reverte alterações comportamentais observadas em um modelo de esquizofrenia baseado no antagonismo dos receptores NMDA: possível envolvimento dos receptores 5-HT_{1A} e CB1/ Naielly Rodrigues da Silva; orientador: Francisco Silveira Guimarães. – Ribeirão Preto, 2017.

89 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 2017.

1. Esquizofrenia 2. Canabidiol 3. MK-801 4. Antipsicótico 5. Canabinóide

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: RODRIGUES, Naielly da Silva

Título: Tratamento repetido com canabidiol reverte alterações comportamentais observadas em um modelo de esquizofrenia baseado no antagonismo dos receptores NMDA: possível envolvimento dos receptores 5-HT_{1A} e CB1

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

Aprovada em: ___ / ___ / 2017

Banca examinadora

Prof. Dr.: Francisco Silveira Guimarães:

FMRP – USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Antônio Waldo Zuardi:

FMRP – USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Fabrício de Araújo Moreira:

UFMG

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Leandro José Bertoglio:

UFSC

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*“Dedico este trabalho aos meus pais, Itamar e Rosemeire e ao meu irmão
Vinícius que me inspiram e me apoiam incondicionalmente.”*

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Deus por proteger a mim e as pessoas que eu amo e por guiar em todas as escolhas e decisões.

A minha mãe pelo incansável esforço e dedicação a mim e aos meus problemas. Esse trabalho só foi possível graças ao seu apoio diante de tantas dificuldades que passamos. Só nós sabemos o peso desse título.

Ao meu irmão, por ser meu companheiro de grandes discussões científicas e polêmicas e que consegue redescobrir diariamente sua força na fraqueza e por isso te admiro de forma inexplicável.

Ao meu pai Itamar e pelo apoio e o esforço que fez pela minha formação e meu conforto.

A minha família, e principalmente meus avós pelo carinho, orações, incentivo e acima de tudo entender a minha ausência. Amo vocês.

A minha companheira Ludmila, pelo incansável apoio em todos os momentos e certamente um dos maiores presentes que a vida poderia ter me dado. Te vivo.

Aos meus amados amigos de Astorga, Maringá e Ribeirão, Rafael, Duda, Pneumo, Vitor, Luisa, Monique, Gago, Herick, Jeimison, Ju, Gabriel, Ana Bárbara, Pedro, entre tantos outros que tornam a minha vida mais leve e mais feliz.

Ao orientador Francisco Silveira Guimarães, por me aceitar prontamente no laboratório e pelos inúmeros ensinamentos. Um exemplo e uma inspiração como professor e como pessoa.

As minhas amigas de laboratório Alice, Manoela, Carla e Sabrina pelas dicas, orientações e ensinamentos compartilhados com tanto carinho e dedicação e em especial à Andreza e Nicole pela ajuda essencial durante a execução deste projeto e pelo tempo que dedicaram a me ensinar, ajudar nos experimentos, tratamentos entre tantos outros trabalhos que desenvolvemos em paralelo. É sempre um prazer trabalhar com vocês. Muito obrigada!

A Prof.^a Dr.^a Alline Campos, por sempre esclarecer minhas dúvidas e estar sempre disposta a ensinar e compartilhar seu conhecimento e aos demais membros do seu laboratório Edu, Rafa, Paula, Vinícius, Dri, Mariana, Davi pela companhia sempre muito agradável e por serem pessoas incríveis que me ajudaram muito e em especial para Fran que me auxiliou com as estatísticas e com um importante suporte intelectual e emocional. Tenho uma gratidão e uma admiração imensa por todos vocês.

Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel, pela amizade e por sempre me acalmar e transformar os momentos de tensão em leves e muitas vezes descontraídos. Sua alegria se reflete nos membros do seu laboratório, Téo, Leandro, Gabi, Mayara, Laura, Dani, Davi, Lu, Jéssica, Cassiano, Anna Bárbara e Ana Terzian dos quais eu também agradeço pela amizade e companheirismo.

Ao Felipe, por ter cedido a ideia deste trabalho e por acompanhar cada passo desenvolvido com muita paciência e dedicação mesmo que de longe. Muito obrigada pelos ensinamentos e pela confiança depositada em mim.

A Prof.^a Dr.^a Rúbia por ter me apresentado ao Chico e me incentivado a trilhar este caminho. Obrigada pela confiança e pela amizade.

Ao apoio técnico do José Carlos, Eleni, Inês e Marcos por manterem a organização do laboratório e por fazerem um trabalho de base essencial para que nós possamos desenvolver os nossos projetos.

A os funcionários do Depto. de Farmacologia Ramon, Soninha e Fátima, pelo trabalho burocrático tão eficiente desenvolvido por vocês.

Aos membros da banca, Dr. Alexandre Zuardi, Dr. Fabrício de Araújo Moreira e Dr. Leandro José Bertoglio pelo tempo dedicado e pelas contribuições para a melhoria deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) e Fundação de Amparo à Pesquisa da Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.” Marie Curie

RESUMO

RESUMO

RODRIGUES, N. S. **Tratamento repetido com canabidiol reverte alterações comportamentais observadas em um modelo de esquizofrenia baseado no antagonismo dos receptores NMDA: possível envolvimento dos receptores 5-HT_{1A} e CB1.** 2017. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2017.

Dados pré-clínicos e clínicos indicam que o canabidiol (CBD), um composto não-psicotomimético presente na planta *Cannabis sativa*, induz efeitos tipo-antipsicóticos sem produzir efeitos extrapiramidais. Estudos realizados pelo nosso grupo mostram que o tratamento repetido com CBD atenuou as alterações comportamentais induzidas pelo tratamento repetido com MK-801, uma antagonista dos receptores NMDA, nos testes de reconhecimento de objeto (RO), utilizado no estudo de funções cognitivas, e teste de interação social (IS), utilizado para o estudo dos sintomas negativos da esquizofrenia quando ambas as drogas foram administradas concomitantemente. Estudos mostram que as alterações induzidas por antagonistas NMDA foram observadas até 6 semanas após o tratamento, sendo essas alterações revertidas por antipsicóticos atípicos como clozapina e aripripazol, mas não pelo haloperidol, um antipsicótico típico. Apesar das evidências indicarem o possível efeito tipo-antipsicótico do CBD o mecanismo de ação pelo qual ele exerce este efeito ainda não está elucidado, acredita-se que o sistema endocanabinoide e/ou o sistema serotoninérgico possam estar envolvidos. Assim, no presente estudo, nós avaliamos se o tratamento repetido por 7 dias com CBD seria capaz de reverter as alterações nos testes de IS e RO após o fim do tratamento com MK-801 por 14 dias. Além disso, foi avaliado se o efeito do canabidiol em reverter os prejuízos nos testes de IS e RO seria bloqueado pelo tratamento com AM251, um antagonista dos receptores CB1, e/ou WAY100635, um antagonista dos receptores 5-HT_{1A}. Foi observado que o CBD (15 e 30 mg/kg) atenuou os prejuízos nos testes de IS e RO induzidos por MK-801 e este efeito foi bloqueado pelo WAY100635 mas não pelo AM251. Estes dados reforçam a proposta de que o CBD tem propriedades antipsicóticas e indicam que o CBD poderia ser uma interessante alternativa para o tratamento de sintomas negativos e cognitivos de pacientes com esquizofrenia.

ABSTRACT

ABSTRACT

RODRIGUES, N. S. **Repeated cannabidiol treatment reverses behavioral changes in a model of schizophrenia based on antagonism of NMDA receptors: possible involvement of 5-HT_{1A} and CB1 receptors.** 2017. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2017.

Preclinical and clinical data indicate that cannabidiol (CBD), a non-psychotomimetic compound in the *Cannabis sativa* plant, induces antipsychotic-like effects without producing extrapyramidal effects. Studies conducted by our group show that repeated treatment with CBD attenuated the behavioral changes induced by repeated treatment with MK-801, an NMDA receptor antagonist, in the object recognition (RO) test, used in the study of cognitive functions, and social interaction test (IS), used to study the negative symptoms of schizophrenia when both drugs were administered concomitantly. Studies show that changes induced by NMDA antagonists have been observed up to 6 weeks after treatment, and these changes are reversed by atypical antipsychotics such as clozapine and aripiprazole, but not by haloperidol, a typical antipsychotic. Although the evidence indicates the possible antipsychotic-like effect of CBD, the mechanism of action by which it exerts this effect has not yet been elucidated, it is believed that the endocannabinoid system and / or the serotonergic system may be involved. Thus, in the present study, we evaluated whether repeated 7-day treatment with CBD would be able to reverse changes in IS and RO tests after the end of MK-801 treatment for 14 days. In addition, it was assessed whether the effect of cannabidiol on reversing impairments in the IS and RO tests would be blocked by treatment with AM251, a CB1 receptor antagonist, and / or WAY100635, a 5-HT_{1A} receptor antagonist. CBD (15 and 30 mg / kg) was observed to attenuate the impairments in the IS and RO tests induced by MK-801 and this effect was blocked by WAY100635 but not by AM251. These data reinforce the proposal that CBD has antipsychotic properties and indicate that CBD could be an interesting alternative for the treatment of negative and cognitive symptoms of patients with schizophrenia.

SUMÁRIO

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Esquizofrenia	20
1.2 Modelo baseado no antagonismo NMDA	22
1.3. Canabidiol	24
1.4 Sistema endocanabinóide	27
1.5. Sistema serotoninérgico	28
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Animais	35
3.2 Drogas	35
3.3 Procedimentos experimentais	36
3.3.1. Desenho experimental	36
3.3.2. Teste de reconhecimento de objeto (RO).....	39
3.3.3. Teste de interação social (IS).....	40
3.4. Análise estatística	40
4. RESULTADOS	43
4.1. Experimento 1: Efeito do tratamento repetido com MK-801 nos testes de IS e RO	42
4.2. Experimento 2: Efeito do CBD e da clozapina sobre o prejuízo nos testes de IS e RO induzido pelo tratamento com MK-801 por 14 dias	46
4.3. Experimento 3: Efeito do tratamento com AM251 sobre a ação do CBD nos testes de IS e RO após o pré-tratamento com MK-801	50
4.4. Experimento 4: Efeito do tratamento com WAY100635 sobre a ação do CBD nos testes de IS e RO após o pré-tratamento com MK-801.....	57
5. DISCUSSÃO.....	64
6. CONCLUSÃO	74
7. REFERÊNCIAS	76

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico crônico, de natureza complexa, que afeta cerca de 1% da população mundial (Mcgrath *et al.*, 2008). Os custos anuais da população com esquizofrenia em vários países variam de 94 a 102 bilhões de dólares. Os custos indiretos contribuem em 50 a 85% dos totais associados com a esquizofrenia (Chong, 2016). Estima-se que nos Estados Unidos o gasto do governo com pacientes com esquizofrenia é de mais que 60 bilhões de dólares por ano e estes pacientes constituem cerca de 10% da população permanentemente incapacitada, e compreendem mais de 14% da população de rua em algumas grandes áreas urbanas (Rupp e Keith, 1993; Marcus, 2008), mostrando um enorme impacto desse transtorno para pacientes, suas famílias e a sociedade como um todo.

De acordo com Lewis e Lieberman, a esquizofrenia parece ser uma doença poligênica e associada a fatores de vulnerabilidade ambientais e de desenvolvimento (Lewis e Lieberman, 2000). Os sintomas são divididos em três categorias: positivos, negativos e déficits cognitivos (Wong e Van Tol, 2003). Os sintomas positivos estão relacionados principalmente a alucinações, delírios e transtornos do pensamento, os negativos consistem em distúrbios na interação social, motivação, expressão de afeto e capacidade de sentir prazer (Wong e Van Tol, 2003), enquanto os sintomas cognitivos envolvem déficits de atenção, memória e função executiva (Weickert *et al.*, 2000).

Apesar do avanço nas pesquisas, a neurobiologia deste transtorno ainda não foi completamente elucidada. Uma das hipóteses mais aceitas para explicar a neurobiologia desta doença, a hipótese dopaminérgica, é baseada

em duas principais observações: drogas que antagonizam o receptor dopaminérgico do subtipo D₂ são eficazes no tratamento dos sintomas positivos da esquizofrenia e drogas que aumentam ou facilitam a transmissão dopaminérgica podem desencadear surtos psicóticos (Seeman e Kapur, 2000). Além disso, há um desequilíbrio na neurotransmissão dopaminérgica em pacientes com esquizofrenia onde ocorre uma reduzida atividade dopaminérgica no córtex pré-frontal, relacionada com os sintomas negativos e cognitivos, e uma excessiva atividade dopaminérgica na via mesolímbica, relacionada com os sintomas positivos do transtorno (Davis *et al.*, 1991).

Apesar de a hipótese dopaminérgica apresentar importantes observações que contribuem para a compreensão da neurobiologia da esquizofrenia, a hipótese glutamatérgica foi proposta sugerindo que a hipofunção da neurotransmissão glutamatérgica poderia estar relacionada com alguns aspectos da doença (Jentsch e Roth, 1999). O glutamato exerce seus efeitos interagindo com receptores ionotrópicos e metabotrópicos, sendo os receptores ionotrópicos de 3 tipos: NMDA, AMPA e cainato (Dingledine *et al.*, 1999; Kew e Kemp, 2005). Drogas como quetamina e fenciclidina (PCP) são antagonistas de receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA e são capazes de induzir alterações comportamentais e emocionais que se assemelham aos sintomas da esquizofrenia em humanos e animais (Tsai e Coyle, 2002). Diferente de drogas que aumentam a transmissão dopaminérgica, antagonistas dos receptores NMDA induzem alterações relacionadas aos sintomas negativos e cognitivos (Krystal *et al.*, 2005).

Além disso, animais com reduzida expressão do receptor NMDA exibiram comportamentos relacionados à esquizofrenia que foram atenuados

por antipsicóticos (Mohn *et al.*, 1999). Estudos em estruturas cerebrais *postmortem* em pacientes com esquizofrenia revelam que as subunidades dos receptores NMDA estão anormalmente expressas nestes pacientes (Dracheva *et al.*, 2001). Esses dados sugerem que o sistema glutamatérgico possa ter um importante papel na esquizofrenia. Apesar da hipótese glutamatérgica abordar aspectos amplos do transtorno, parece haver uma interação entre a neurotransmissão dopaminérgica e glutamatérgica em algumas regiões cerebrais (Duncan *et al.*, 1999; Javitt, 2007; Lang *et al.*, 2007; Stone *et al.*, 2007). Uma das ações dos antagonistas NMDA pode ser a redução da atividade de interneurônios GABAérgicos resultando na desinibição de células glutamatérgicas piramidais. Estas células piramidais no hipocampo, por sua vez, podem levar a um estado hiperdopaminérgico na via mesolímbica e, portanto, produzir psicose. Além disso, essa desinibição pode diminuir a atividade sincronizada de grupos de neurônios piramidais, ou também chamada de oscilação gama, e assim, produzir os sintomas negativos e cognitivos (Lisman *et al.*, 2008).

1.2 Modelo baseado no antagonismo NMDA

Modelos animais baseados na administração aguda e crônica de antagonistas de receptores NMDA parecem adequados para a busca de novas substâncias com propriedades antipsicóticas (Bubenikova-Valesova *et al.*, 2008). Após o tratamento com essas drogas, prejuízos no filtro sensorial motor e em funções cognitivas são observados em modelos animais por meio de testes comportamentais como teste de inibição pelo pré-pulso (PPI), reconhecimento de objeto (RO), labirinto aquático de Morris, entre outros (Jentsch *et al.*, 1997; Mandillo *et al.*, 2003; Stefani e Moghaddam, 2005; Vales

et al., 2006; Fegjin *et al.*, 2007), assim como prejuízo no teste de interação social (IS) em roedores (Rung *et al.*, 2005) que reflete os sintomas negativos da esquizofrenia em humanos (Ellenbroek e Cools, 2000). Entretanto, tem sido proposto que os efeitos da administração crônica, ao contrario da aguda, representam melhor as alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroanatômicas observadas em pacientes com esquizofrenia e estas alterações parecem serem duradouras. Alguns estudos indicam que os prejuízos induzidos pelo tratamento com antagonistas do receptor NMDA nos testes de RO e IS foram observados até 6 semanas após o fim do tratamento com essas drogas (Jentsch e Roth, 1999, Hashimoto *et al.*, 2005; Grayson *et al.*, 2007; Snigdha and Neill, 2008a; Snigdha and Neill, 2008b; Nagai *et al.*, 2009). Além disso, essas alterações foram revertidas pelo tratamento com antipsicóticos atípicos como clozapina e aripiprazol, mas não pelo haloperidol, um antipsicótico típico (Hashimoto *et al.*, 2005; Bruins *et al.*, 2005; Fegjin *et al.*, 2007; Nagai *et al.*, 2009).

Apesar dos avanços no conhecimento da neurobiologia da esquizofrenia e de modelos que vem sendo desenvolvidos para a pesquisa de novos medicamentos, os antipsicóticos desenvolvidos nos últimos 20 anos parecem não apresentar eficácia ou tolerabilidade superior aos medicamentos mais antigos (Lewis e Lieberman, 2008). A baixa tolerabilidade e os efeitos adversos induzidos por essas drogas resultam em uma alta taxa de abandono ao tratamento (Lieberman *et al.*, 2005). Além disso, a eficácia dos medicamentos disponíveis em relação aos sintomas negativos e cognitivos ainda é limitada (Elvevag e Goldberg, 2000; Hanson *et al.*, 2010) indicando uma necessidade de novas opções farmacológicas para o tratamento da esquizofrenia.

1.3 Canabidiol

O canabidiol (CBD) é um componente importante e abundante presente na planta *Cannabis sativa* e que, ao contrário do Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC), é desprovido dos efeitos psicotomiméticos típicos da planta (Zuardi, 2008). Este fitocanabinoide tem atraído grande interesse recentemente devido ao seu potencial terapêutico (Mechoulam *et al.*, 2002). Efeitos anticonvulsivante (Cunha *et al.*, 1980; Carlini e Cunha, 1981; Devinsky *et al.*, 2014; Mathern *et al.*, 2014) neuroprotetor (Hampson *et al.*, 1998; Iuvone *et al.*, 2009; Pazos *et al.*, 2013), ansiolítico (Crippa *et al.*, 2004, Soares *et al.*, 2016), antipsicótico (Zuardi *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2015), antinociceptivo (Neelakantan *et al.*, 2015), entre outros foram observados após a administração aguda de CBD.

Os primeiros estudos explorando a possível atividade antipsicótica do CBD demonstram a habilidade desta substância em bloquear os efeitos psicoativos induzidos pelo Δ^9 -THC (Karniol e Carlini, 1973; Dalton *et al.*, 1976; Zuardi *et al.*, 1982). De fato, foi observado na África do Sul que indivíduos que fizeram uso de uma variação de *Cannabis* com alta quantidade de Δ^9 -THC e, em contrapartida, baixa quantidade de CBD, apresentaram alta taxa de episódios psicóticos em relação a dados de outros países, sugerindo que o CBD possa ter uma ação protetora em relação aos estes efeitos psicotomiméticos induzidos pelo Δ^9 -THC (Rottanburg *et al.*, 1982). Considerando que existem evidências de que o antagonismo do CBD em relação aos efeitos do Δ^9 -THC não é devido à interação farmacocinética (Hunt *et al.*, 1981), surgiu então a hipótese de que o CBD teria propriedades antipsicóticas.

Em modelos animais utilizados no estudo da esquizofrenia foi observado que o CBD exibiu um perfil semelhante a drogas antipsicóticas, como o haloperidol, inibindo a estereotipia induzida por apomorfina, um agonista dos receptores dopaminérgicos, em ratos (Zuardi *et al.*, 1991). Ainda no mesmo estudo, constatou-se que o CBD, mesmo em altas doses, não induz catalepsia, um efeito motor extrapiramidal comumente induzido por antipsicóticos típicos, sugerindo então que o CBD exibe o perfil de drogas antipsicóticas atípicas. Apesar de o CBD não ter apresentado efeito agudo em reverter o prejuízo no teste de reconhecimento social, um teste relacionado com sintomas cognitivos e negativos do transtorno, induzido por MK-801 (Deiana *et al.*, 2015), a administração aguda do CBD inibiu, assim como a clozapina, a hiperlocomoção induzida por quetamina e anfetamina, (Moreira e Guimaraes, 2005), reverteu o prejuízo induzido por anfetamina e MK-801, um antagonista de receptores NMDA, no teste de PPI em camundongos (Long *et al.*, 2006; Pedrazzi *et al.*, 2015) assim como a redução da IS em ratos induzida por MK-801 (Gururajan *et al.*, 2011). Assim, esses estudos indicam que o CBD apresenta propriedades tipo-antipsicóticas em modelos de esquizofrenia baseados nas hipóteses dopaminérgica e glutamatérgica.

As propriedades antipsicóticas do CBD também foram observadas em pacientes com esquizofrenia (Zuardi *et al.* 1995; Zuardi *et al.*, 2006b e Hallak *et al.*, 2010). Em um ensaio clínico controlado, duplo-cego, de 4 semanas e com 42 pacientes com esquizofrenia onde os efeitos do CBD foram comparados aos da amisulprida, um antipsicótico atípico, observou-se que ambos os tratamentos foram igualmente eficazes na redução dos sintomas psicóticos após 2 e 4 semanas de tratamento, sendo que o CBD apresentou menor

propensão a indução de efeitos adversos (Leweke *et al.*, 2012). Além disso, em todos os estudos supracitados o tratamento com CBD foi seguro e bem tolerado.

Poucos estudos pré-clínicos empregando o tratamento repetido com CBD foram realizados para investigação do seu efeito antipsicótico. Long *et al.* observaram que o tratamento repetido com CBD por 21 dias atenuou a hiperlocomoção induzida por dexamfetamina. Por outro lado, em um modelo de esquizofrenia baseado em susceptibilidade genética o tratamento repetido com CBD não atenuou as alterações comportamentais, como hiperlocomoção e prejuízo no teste de PPI (Long *et al.* 2012). Em um estudo conduzido pelo nosso grupo, o tratamento repetido com CBD atenuou as alterações comportamentais avaliadas nos testes de PPI, reconhecimento de objeto e interação social induzidas pelo tratamento repetido com MK-801, um antagonista dos receptores NMDA (Gomes *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2015). Nestes estudos, o tratamento com CBD começou 6 dias após o início do tratamento com MK-801 e continuou até o fim do tratamento com MK-801, que durou 28 dias. Dessa forma, não foi avaliado se o tratamento com CBD realizado após o término da administração repetida de MK-801 seria capaz de reverter as alterações induzidas por esta droga.

Apesar das evidências indicarem que o CBD tem uma atividade tipo-antipsicótica, o mecanismo de ação pelo qual este fitocanabinoide exerce este efeito ainda não foi elucidada. Um estudo utilizando o ensaio de *binding* indica que o CBD pode ser um agonista parcial do receptor de dopamina do subtipo D2, da mesma forma que o antipsicótico atípico aripiprazol (Seeman, 2016). Entretanto outras evidências indicam que a ligação aos receptores TRPV1, 5-

HT1a, PPAR γ e a inibição da enzima amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) podem estar envolvidas no efeito antipsicótico observado em modelos animais e humanos com esquizofrenia (Campos *et al.*, 2012). Neste trabalho exploraremos o mecanismo de ação do CBD com foco no sistema endocanabonoide e sistema serotoninérgico.

1.4 Sistema endocanabinoide

O sistema endocanabinoide é formado pelos receptores CB1 e CB2, os agonistas endógenos (endocanabinoides) como a anandamida (AEA) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG), e as proteínas responsáveis pela síntese e degradação destas substâncias como a FAAH e a lipase monoacilglicerol (MGL) responsáveis pela hidrólise e inativação da AEA e da 2-AG, respectivamente (Piomelli, 2005). O receptor do tipo CB1 encontra-se em neurônios pré-sinápticos em áreas do cérebro envolvidas na neurobiologia da esquizofrenia e mecanismo de ação dos antipsicóticos como o estriado, córtex, substância nigra e hipocampo. (Herkenham *et al.*, 1990; Tsou *et al.*, 1998). Os receptores CB2, que inicialmente foram considerados expressos apenas em células do sistema imune periférico e hematopoiético, também são expressos no sistema nervoso central (SNC) em células gliais e neuronais (Luongo *et al.*, 2014). Os receptores CB1 e CB2 são acoplados à proteína G $_{i/o}$ que, quando ativada, inibe a enzima adenilato ciclase, aumentando a abertura de canais de potássio e, ainda, inibindo canais de cálcio, modulando assim, a liberação de outros neurotransmissores (Piomelli *et al.*, 2003).

O CBD parece ter pouca afinidade pelos receptores CB1 e CB2 (Petitet *et al.*, 1998). No entanto, há evidências de que sua ação pode ser mediada pelo sistema endocanabinoide por um mecanismo indireto de aumento da AEA

através da inibição da enzima FAAH (Bisogno *et al.*, 2001). Assim, indiretamente, devido a ativação de receptores CB1 e/ou CB2 através do aumento dos níveis de AEA, o CBD poderia modular sistemas neurotransmissores relacionados a estes receptores (Zuardi *et al.*, 2012). Curiosamente, os níveis de AEA em pacientes não medicados é negativamente correlacionado com os sintomas psicóticos e o tratamento com CBD aumentou os níveis de AEA, efeito correlacionado com a melhora clínica (Giuffrida *et al.*, 2004; Leweke *et al.*, 2012). Além disso, o bloqueio da degradação de AEA atenua alterações em alguns comportamentos relacionados à esquizofrenia induzidos por antagonistas NMDA em roedores (Seillier *et al.*, 2010). Portanto, as evidências indicam que o efeito tipo-antipsicótico do canabidiol pode ter envolvimento do sistema endocanabinoide. Considerando que a sinalização via CB1 no hipocampo modula a atividade dopaminérgica na via mesolímbica assim como participa de outros processos como o aumento a neurogênese hipocampal, (Wolf *et al.*, 2010; Silveira *et al.*, 2016), e este efeito plástico parece estar relacionado com a neurobiologia da esquizofrenia assim como em alterações promovidas por antipsicóticos (Liu *et al.*, 2006; Cardon *et al.*, 2010; Chou *et al.*, 2015), estes mecanismos podem estar relacionados com uma possível ação benéfica do CBD sobre a atenuação dos déficits negativos e cognitivos observados em pacientes com esquizofrenia (Schreiber e Newman-Tancredi, 2014).

1.4 Sistema serotoninérgico

Serotonina (5-HT) e seus receptores são encontrados no sistema nervoso central e periférico. Sete tipos diferentes de receptores de 5-HT foram identificados e eles podem estar presentes em membranas pré sinápticas,

como receptores autossômicos, ou pós sinápticas em diversas regiões cerebrais. A classe de receptores 5-HT1 é acoplada a uma proteína Gi/o e inclui 5 subtipos: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} e 5-HT_{1F} (Cooper *et al.* 2003). Evidências genéticas indicam que polimorfismos nos receptores 5-HT de serotonina do subtipo 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} estão relacionados com sintomas psicóticos, distúrbios cognitivos e resposta a drogas em esquizofrenia (Masellis *et al.*, 1998; Drago *et al.*, 2008). Além disso, dados pré-clínicos sugerem um papel da 5-HT em cognição através de sua influencia em outros sistemas neurotransmissores como o dopaminérgico, colinérgico, glutamatérgico e GABAérgico (Meltzer *et al.*, 2003).

Muitos antipsicóticos atípicos como aripiprazol, clozapina, ziprazidona, entre outros, tem uma ação agonista parcial nos receptores 5-HT_{1A} e a estimulação destes receptores parece estar relacionada com a melhora nos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia (Meltzer *et al.*, 2003). Em estudos pré-clínicos, baixas doses de 8-OH-DPAT, um agonista 5-HT_{1A}, reduziu a hiperlocomoção e prejuízo na IS induzidos por MK-801 (Bubenikova-Valesova *et al.*, 2007). Além disso, lurasidona, um potente agonista parcial 5-HT_{1A}, tandospirona, antagonista 5-HT_{2A} e D₂, e F15599, seletivo agonista de receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos, revertem o prejuízo no teste de RO induzido por PCP, assim como a combinação de doses sub-efetivas de tandospirona e lurasidona. O WAY100635, um antagonista 5HT_{1A}, bloqueou os efeitos da tandospirona e lurasidona (Horiguchi e Meltzer, 2012). O tratamento repetido com lurasidona e tandospirona também atenuou os prejuízos no teste de RO induzidos por PCP e os efeitos permaneceram 14 e 7 dias, respectivamente, após a última injeção com os antipsicóticos e o efeito da

lurasidona foi bloqueado pelo tratamento com WAY100635 (Horiguchi *et al.*, 2016). O efeito da clozapina também parece depender dos receptores 5-HT_{1A}, visto que foi capaz de reverter o efeito da PCP em diminuir as oscilações lentas corticais em animais selvagens (*wild-type*) e *knockout* para 5-HT_{2A}, mas não para 5-HT_{1A} ou selvagens pré-tratados com WAY100635 (Kargieman *et al.*, 2012).

Em um estudo clínico, a adição de buspirona, um agonista parcial 5HT_{1A}, em um tratamento em andamento com antipsicóticos atípicos melhorou o desempenho em um teste que avalia a memória, atenção e coordenação motora em relação aos pacientes que receberam placebo (Sumiyoshi *et al.*, 2007). Considerando que há evidências de que a ativação de receptores 5-HT_{1A} no córtex aumenta a atividade dos neurônios dopaminérgicos da área tegumental ventral e liberação de dopamina na via mesocortical, este mecanismo pode estar envolvido no efeito de antipsicóticos atípicos e pode ser importante para a atenuação de sintomas cognitivos e/ou negativos (Diaz-Mataix *et al.*, 2005).

O CBD parece facilitar a neurotransmissão via 5-HT_{1A} agindo como agonista ou modulador alostérico positivo deste receptor *in vitro* (Russo *et al.*, 2005). Apesar de faltarem estudos em modelos animais de esquizofrenia explorando as propriedades antipsicóticas do CBD e a dependência da ativação do receptor 5-HT_{1A}, em modelos de outros transtornos psiquiátricos, a ativação do receptor 5-HT_{1A} parece ser importante para o efeito do CBD (Campos *et al.*, 2016). Em relação aos efeitos do CBD sobre prejuízos cognitivos, Magen e colaboradores mostraram que o CBD melhorou a cognição e locomoção em um modelo de encefalopatia hepática induzida pela ligação do

ducto biliar e este efeito foi bloqueado pelo tratamento com WAY100635 (Magen *et al.*, 2010). Em um modelo de catalepsia, um teste relacionado aos efeitos extra piramidais causados pelos antipsicóticos típicos, o CBD foi capaz de prevenir e reverter a o aumento no tempo de catalepsia e na expressão de c-Fos no estriado induzidos pelo tratamento com haloperidol e este efeito foi dependente da ativação 5-HT_{1A}, sendo bloqueado pelo pré tratamento com WAY100635, mostrando que o perfil do CBD como um possível antipsicótico atípico pode ter o mecanismo de ação envolvendo a neurotransmissão serotoninérgica via 5-HT_{1A} (Sonogo *et al.*, 2016).

Dessa forma, a hipótese deste trabalho é que o CBD é capaz de reverter os efeitos do MK-801 nos testes de IS e RO, após o fim do tratamento com MK-801 e que este efeito é dependente dos receptores CB1 e/ou 5-HT_{1A}.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar se o tratamento repetido com CBD é capaz de atenuar as alterações comportamentais observadas em um modelo animal de esquizofrenia baseado no tratamento repetido com MK-801 e se este efeito é bloqueado pelo antagonista de receptores CB1, AM251 e/ou pelo antagonista de receptores 5-HT_{1A}, WAY100635.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a duração do tratamento com MK-801 (2 injeções diárias por 7 ou 14 dias) e a dose (0,25, 0,5 e 1 mg/kg) que induz alterações comportamentais nos testes de RO e IS 8 dias após do fim do tratamento.
- Avaliar se a administração repetida de CBD (7 dias, uma vez ao dia) é capaz de reverter o prejuízo induzido pelo tratamento com MK-801 nos testes de RO e IS.
- Avaliar se o tratamento com o antagonista/agonista inverso de receptores CB1 AM251 por 7 dias bloqueia os efeitos do CBD em atenuar os prejuízos induzidos por MK-801.
- Avaliar se o tratamento com o antagonista de receptores 5HT_{1A} WAY100635 por 7 dias bloqueia os efeitos do CBD em atenuar os prejuízos induzidos por MK-801.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos procedimentos experimentais foram utilizados camundongos C57BL/6J machos, com 6 semanas de idade no início do tratamento, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Os animais permaneceram no biotério do departamento, 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 (Protocolo de aprovação pelo comitê de ética em pesquisa animal: 145/2015).

3.2 Drogas

- Canabidiol (THC Pharm, Alemanha) Veículo: 2% Tween 80 e salina. Doses de 15, 30 e 60 mg/kg (baseadas em Gomes *et al.*, 2015).
- Clozapina (Sigma, EUA) Veículo: salina suplementada com 30 µL de ácido clorídrico 0,1 M. Dose de 1mg/kg (baseada em Gomes *et al.*, 2015).
- MK-801 (Sigma, EUA) Veículo: salina. Doses de 0,25, 0,5 e 1 mg/kg (baseadas em Gomes *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2015).
- AM251 (Sigma, EUA) Veículo: 2% Tween 80 e salina. Doses de 0,1 e 0,3 mg/kg (baseadas em Fogaça, 2016)
- WAY100635 (Tocris, EUA) Veículo: salina. Doses de 0,3 e 0,1 mg/kg (baseadas em Hartmann, 2016 e Sonogo *et al.*, 2016)

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1. Desenho experimental

Para avaliar os prejuízos induzidos pelo tratamento com MK-801 os animais receberam 2 injeções intraperitoneais (i.p.) por dia deste composto, sendo elas as 11:00 e 17:00 horas. Os animais foram tratados durante 7 dias. Oito dias após o fim do tratamento, os animais foram habituados à arena do teste de RO e submetidos ao teste de IS. 24h após, foram submetidos ao teste de RO (Fig. 1).

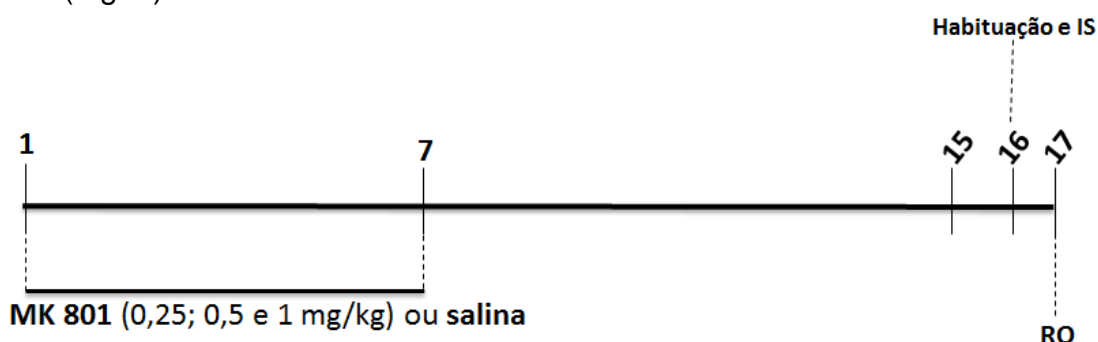


Figura 1. Representação esquemática do procedimento experimental mostrando os dias de tratamento e os testes que foram realizados. RO, reconhecimento de objeto; IS, interação social.

Diante dos resultados não satisfatórios do tratamento com MK-801 por 7 dias, este foi estendido por 14 dias. Oito dias após o término do tratamento com MK-801, os animais foram habituados à arena e submetidos ao teste de IS, e 24 horas após foi realizado o teste de RO (Fig. 2).

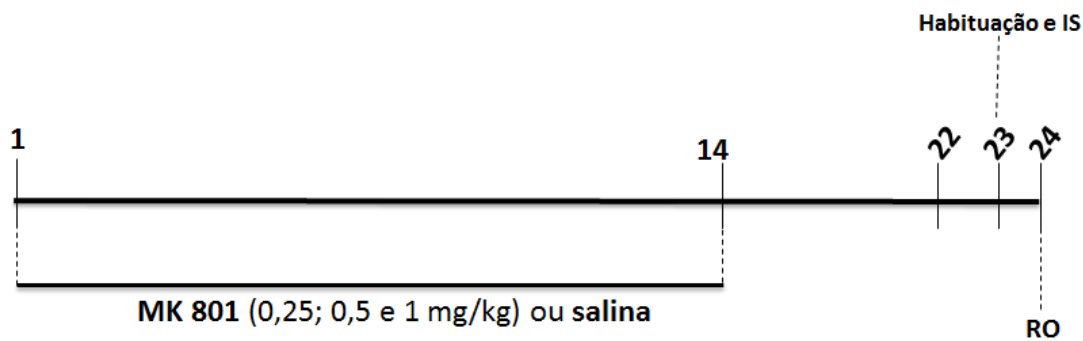


Figura 2. Representação esquemática do procedimento experimental mostrando os dias de tratamento e os testes que foram realizados. RO, reconhecimento de objeto; IS, interação social.

Para avaliar o efeito do CBD ou clozapina, o tratamento repetido com essas drogas foram iniciados um dia após o fim do tratamento com MK-801 (15° dia de tratamento) e as injeções (i.p.) foram administradas por 7 dias (1 vez ao dia). Um dia após o fim do tratamento com CBD ou clozapina foram realizados a habituação a arena do RO e o teste de IS e 24 horas após o teste de RO (Fig.3).

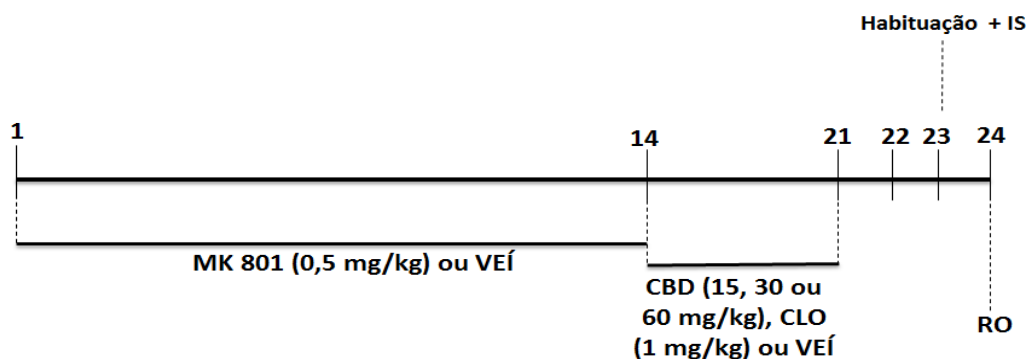


Figura 3. Representação esquemática do procedimento experimental com tratamento repetido de CBD mostrando os dias de tratamento e dos testes que foram realizados. CBD, canabidiol; CLO, clozapina; VEÍ, veículo; RO, reconhecimento de objeto; IS, interação social.

Para avaliar o envolvimento dos receptores CB1 no efeito do CBD, os animais foram tratados por 14 dias com MK-801 e nos 7 dias subsequentes foram tratados por via intraperitoneal com AM251, um antagonista do receptor CB1. Dez minutos após a injeção de AM251 os animais receberam uma injeção

de CBD. Após 48 horas os animais foram submetidos à habituação na arena do RO e teste de IS, no dia seguinte o teste de RO foi realizado (Fig. 4).

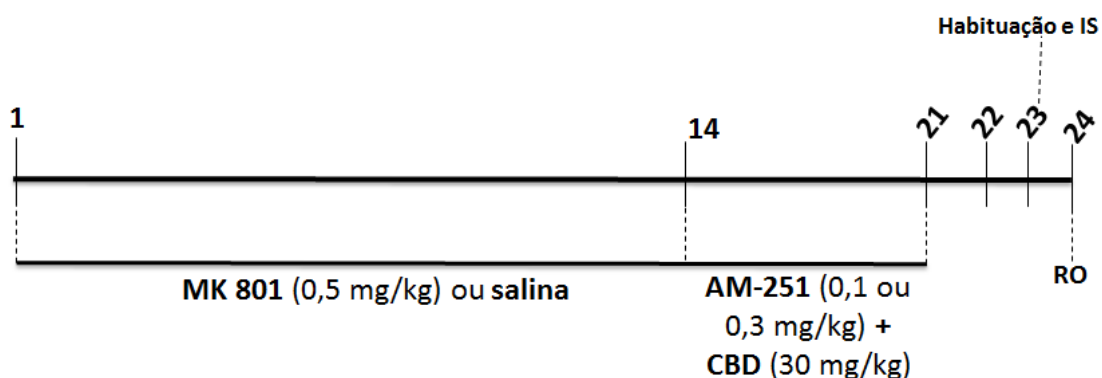


Figura 4. Representação esquemática do procedimento experimental com tratamento repetido de AM251 e CBD seguido pelo pré-tratamento com MK-801 mostrando os dias de tratamento e dos testes que foram realizados. CBD, canabidiol; VEH, veículo; RO, reconhecimento de objeto; IS, interação social.

Da mesma forma, para avaliar o envolvimento dos receptores 5-HT_{1A} no efeito do CBD, os animais foram tratados por 14 dias com MK-801 e nos 7 dias subsequentes foram tratados por via intraperitoneal com WAY100635, um antagonista do receptor 5-HT_{1A}. Dez minutos após a injeção de WAY100635 os animais receberam uma injeção de CBD. Após 48 horas, os animais foram submetidos à habituação na arena do RO e teste de IS, no dia seguinte o teste de RO foi realizado (Fig. 5).

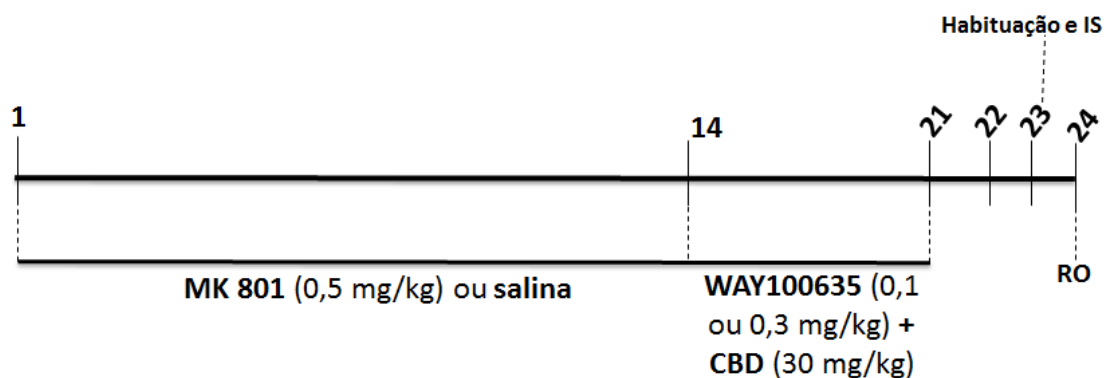


Figura 5. Representação esquemática do procedimento experimental com tratamento repetido de WAY100635 e CBD seguido pelo pré-tratamento com MK-801 mostrando os dias de tratamento e dos testes que foram realizados. CBD, canabidiol; VEH, veículo; RO, reconhecimento de objeto; IS, interação social.

3.3.2. Teste de reconhecimento de objeto

Quando exposto a um objeto familiar e a um objeto novo, camundongos jovens e adultos frequentemente aproximam-se e exploram por mais tempo o objeto novo comparado ao objeto familiar (Ennaceur, 2009). 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). O teste de RO foi realizado para avaliar estes prejuízos.

O teste de RO 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 minutos. No dia do experimento os animais foram colocados na arena contendo dois objetos idênticos por um período de 10 min (sessão de aquisição). Após 60 minutos um dos objetos presentes na sessão de aquisição foi trocado por objeto novo com tamanho, textura e cor diferentes dos objetos da primeira sessão. Os animais foram colocados na arena contendo o objeto novo e familiar por 5 minutos e o tempo de interação com cada objeto foi registrado (sessão de retenção). Os objetos possuem em média 16 cm de altura e tem peso suficiente para não serem deslocados pelos animais durante o experimento. 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.

O índice de discriminação foi utilizado para analisar o tempo de exploração entre o objeto novo e o familiar. Este índice é calculado pela diferença entre a exploração do objeto familiar (TF) e o novo (TN) dividido pelo tempo de exploração total do objeto novo e familiar [DI= (TN – TF) / (TN + TF)]. Esse resultado pode variar entre valores negativos e positivos onde, valores positivos indicam mais tempo de exploração no objeto novo, valores negativos indicam mais tempo de exploração no objeto familiar enquanto o valor zero indica a ausência de preferência.

3.3.3. Teste de interação social

O teste de IS é um modelo utilizado para o estudo dos sintomas negativos da esquizofrenia (Ellenbroek e Cools, 2000). O teste consiste em colocar dois animais, um que é o animal teste e outro que não recebeu nenhum tratamento e que nunca teve contato com o animal teste, em uma caixa por um determinado período de tempo onde eles podem interagir livremente. Para este procedimento foi utilizado 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 auto-limpeza (“*grooming*”) e subir sobre o camundongo não familiar foram registrados.

3.4. Análise estatística

Os resultados comportamentais foram representados como média ± EPM e analisados por teste t de *student* ou análise de variância (ANOVA) de

uma, duas ou três vias. As análises pós-teste foram realizadas pelo teste de *Dunnett's*. O nível de significância estatístico utilizado foi de 95% ($p < 0,05$) e a análise foi realizada com o auxílio do software SPSS (versão 20.0).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1: Efeito do tratamento repetido com MK-801 nos testes de IS e RO

4.1.1 Efeito do tratamento repetido com MK-801 por 7 dias nos testes de IS e RO

Interação social: Tratamento repetido com MK-801 por 7 dias não induziu alteração no teste de IS realizado uma semana após o fim do tratamento ($F_{3,46}=1,68$, $p>0,05$; ANOVA de uma via; Figura 6).

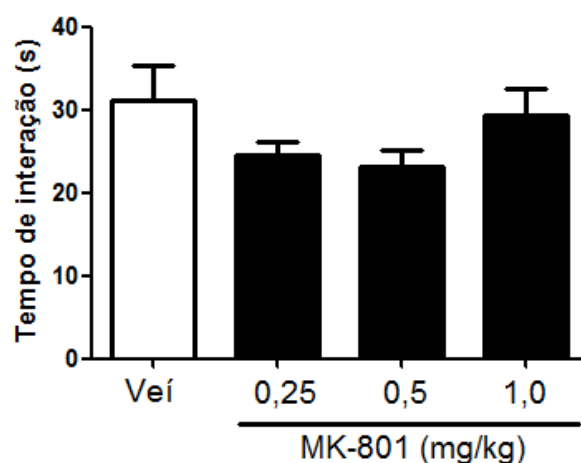


Figura 6. Tratamento repetido com MK-801 (0,25; 0,5 e 1 mg/kg) por 7 dias não causa prejuízo no teste de IS (n=12-13/grupo). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. $P>0,05$; ANOVA de uma via.

Reconhecimento de objeto: A preferência entre cada objeto na sessão de aquisição foi similar em todos os grupos de tratamento ($p>0,05$, teste t de *student*; figura 7a) indicando que não houve nenhuma preferência para a exploração do objeto colocado no lado esquerdo ou direito da arena. Entretanto, na sessão de retenção, o tempo gasto explorando o objeto novo em relação ao objeto familiar foi significativamente maior entre os grupos salina e MK-801 na dose de 0,25 mg/kg ($p>0,05$, teste t de *student*; Figura 7b). Em relação ao índice de discriminação, a ANOVA de uma via não revelou diferença

estatística com o tratamento com MK-801 em relação ao grupo salina ($F_{3,46}=2,30$, $p>0,05$; Figura 7c), indicando que, assim como no teste de IS, o tratamento repetido com MK-801 por 7 dias não foi capaz de produzir prejuízos no teste de RO.

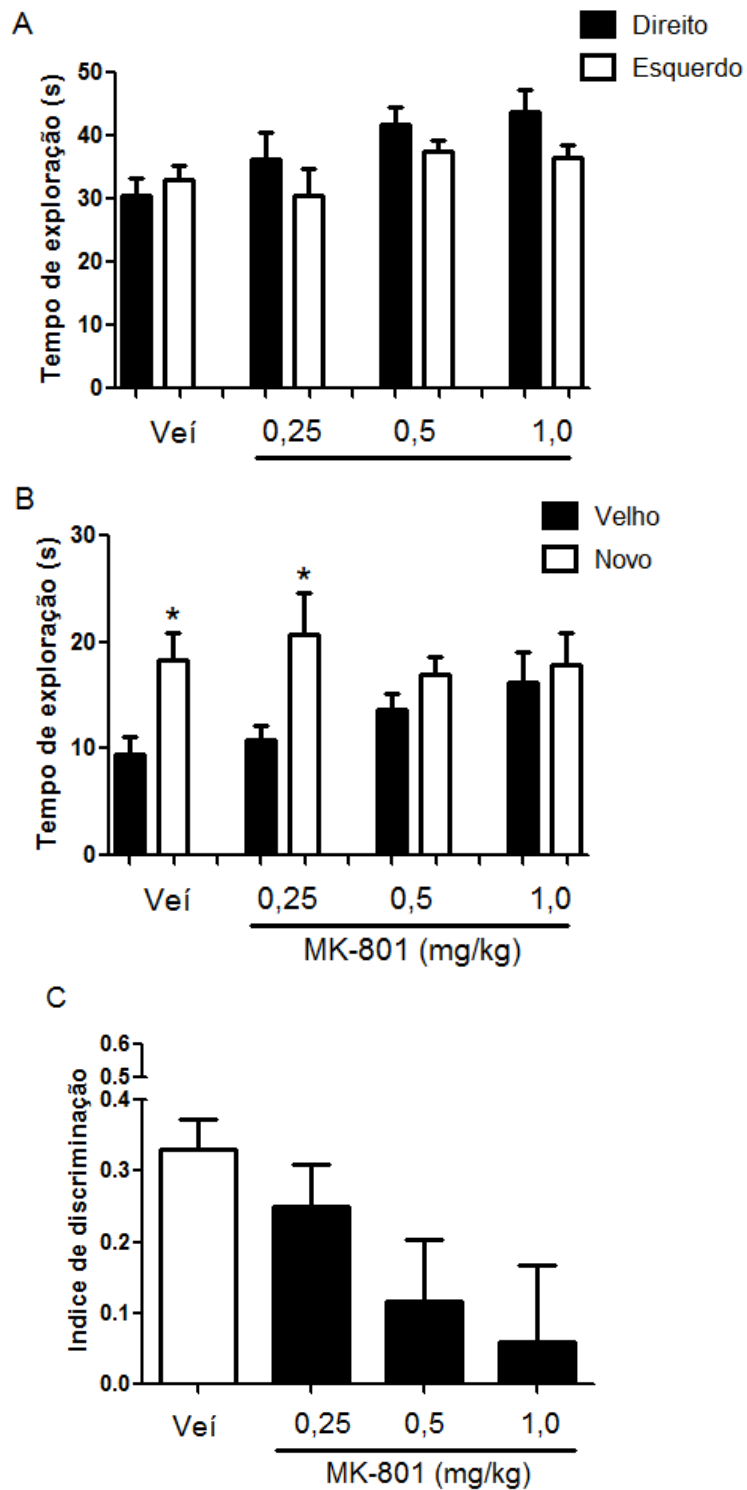


Figura 7. O tratamento repetido com MK-801 (0,25; 0,5 e 1 mg/kg) por 7 dias não causa prejuízo no teste de RO. (A) Não houve diferença na preferência entre cada objeto na sessão de aquisição. (B) Efeito dos tratamentos sobre a exploração de um objeto novo e um objeto familiar na sessão de retenção. Os 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=12-13/grupo). Os dados estão apresentados como a média e o EPM.

4.1.2 Efeito do tratamento repetido com MK-801 por 14 dias nos testes de IS e RO

Interação social: Tratamento repetido com MK-801 (0,5 mg/kg) por 14 dias diminui o tempo de IS avaliado uma semana após o fim do tratamento ($F_{2,25}=3,88$, $p < 0,05$; ANOVA de uma via seguida pelo teste de *Dunnett's*; Figura 8)

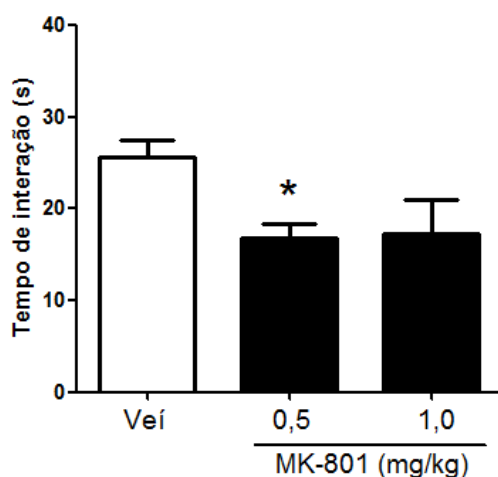
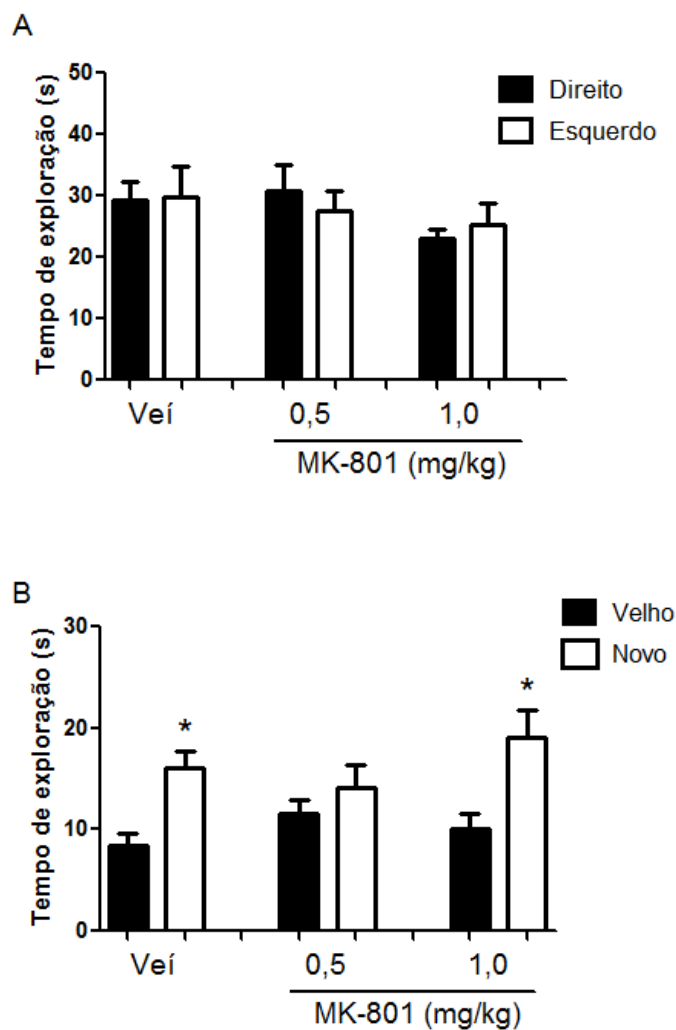


Figura 8. Tratamento repetido com MK-801 na dose de 0,5 mg/kg por 14 dias causa prejuízo no teste de IS (n=9-10/grupo). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Veí, ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Dunnett's*.

Reconhecimento de objeto: Na sessão de aquisição não houve preferência de nenhum dos grupos por algum dos objetos idênticos ($p > 0,05$,

teste t de *student*, Figura 9a). Entretanto, na sessão de retenção, o tempo gasto explorando o objeto novo em relação ao objeto familiar foi significativamente maior entre os grupos salina e MK-801 na dose de 1 mg/kg ($p < 0,05$, teste t de *student*, Figura 9b). Em relação ao índice de discriminação, a ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Dunnett's* revelou diferença estatística com o tratamento com MK-801 somente na dose de 0,5 mg/kg em relação ao grupo salina ($F_{2,25} = 3,71$, $p < 0,05$; Figura 9c), indicando que tratamento repetido com MK-801 na dose de 0,5 mg/kg por 14 dias foi capaz de produzir prejuízos nos testes de IS e RO 8 dias após o fim do tratamento.



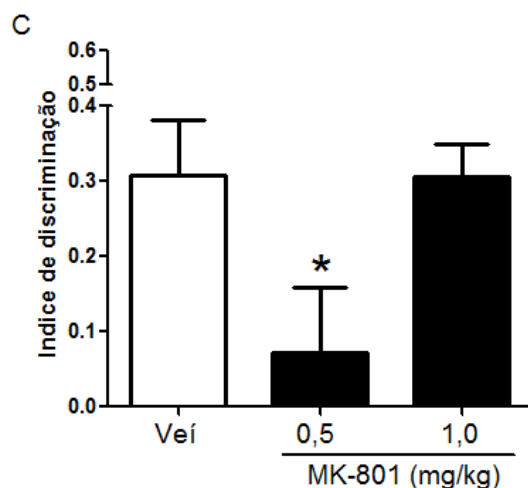


Figura 9. O tratamento repetido com MK-801 na dose de 0,5 mg/kg por 14 dias causa prejuízo no teste de RO. (A) Efeito dos tratamentos sobre a exploração de dois objetos idênticos na sessão de aquisição. (B) Efeito dos tratamentos sobre a exploração de um objeto novo e um objeto familiar na sessão de retenção. 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 ($n=9-10$ /grupo). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí, ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Dunnnett's*.

4.2. Experimento 2: Efeito do CBD e da clozapina sobre o prejuízo nos testes de IS e RO induzido pelo tratamento com MK-801 por 14 dias

Interação Social: Tratamento repetido com CBD e clozapina atenuam o prejuízo no teste de IS induzido pelo tratamento com MK-801. A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do primeiro tratamento (administração de salina ou MK-801) ($F_{1,64}=10,61$, $p=0,002$), um efeito significativo do segundo tratamento (administração de veículo, CBD ou clozapina) ($F_{4,64}= 3,88$, $p=0,007$) e uma interação entre eles ($F_{2,64}=9,44$, $p < 0,001$). O tratamento com MK-801 (0,5 mg/kg) resultou em uma diminuição do tempo de interação social em relação ao veículo, enquanto o CBD e a clozapina atenuaram o prejuízo

induzido pelo MK-801 ($p < 0.05$; ANOVA de duas vias, seguida pelo post-hoc de *Dunnett's*; Figura 10).

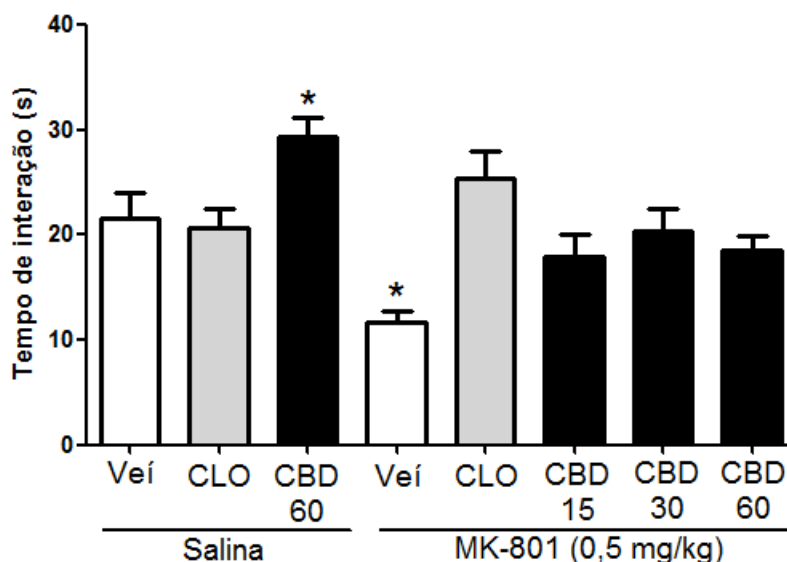
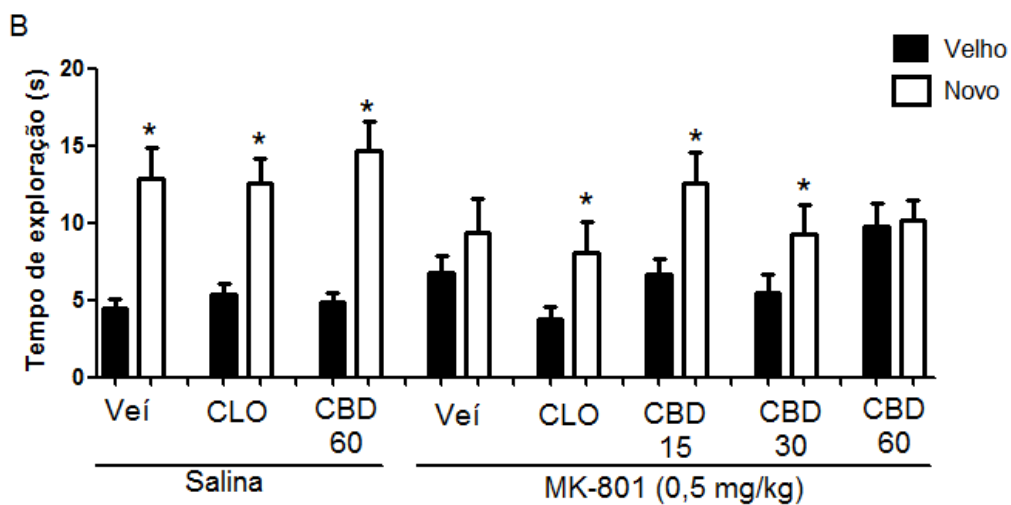
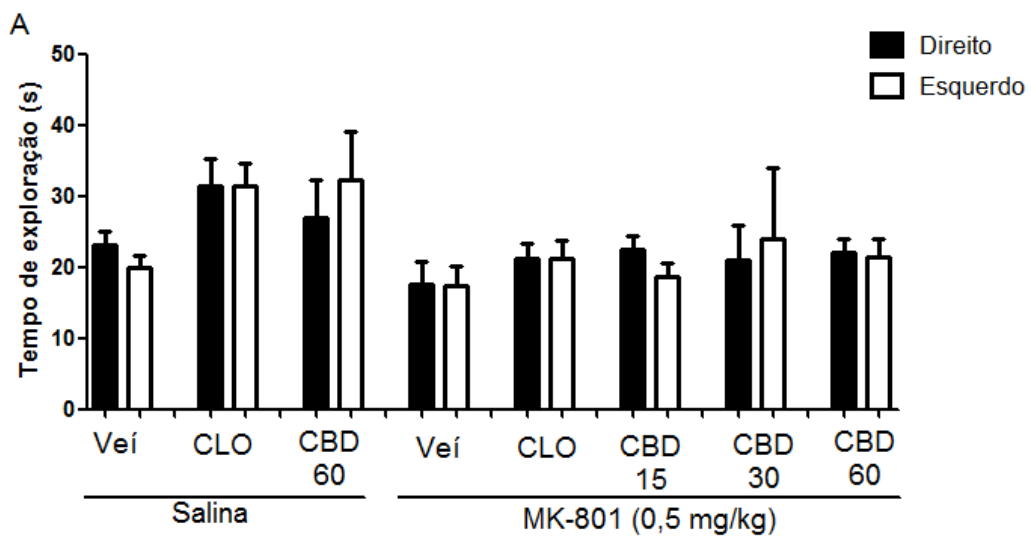


Figura 10. Tratamento repetido com CBD e clozapina atenuam o prejuízo no teste de IS induzido pelo tratamento com MK-801 (0,5 mg/kg) ($n=9-10$ /grupo). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. $*p < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de *Dunnett's*.

Reconhecimento de objeto: A preferência para a exploração entre cada objeto na sessão de aquisição foi similar em todos os grupos de tratamento ($p > 0,05$, teste t de *student*; Figura 11a). Por outro lado, na sessão de retenção, o tempo gasto explorando o objeto novo em relação ao objeto familiar foi significativamente maior entre os grupos salina+veículo, salina+clozapina, salina+CBD60, MK-801+clozapina, MK-801+CBD15 e MK-801+CBD30 ($p > 0,05$, teste t de *student*; Figura 11b). Em relação ao índice de discriminação, o CBD (15 e 30 mg/kg) e clozapina foram capazes de atenuar o prejuízo induzido pelo MK-801. A ANOVA de 2 vias indicou um efeito significativo do primeiro tratamento (administração de salina ou MK-801) ($F_{1,64} = 15,73$,

$p < 0,001$), porém não foi observado efeito do segundo tratamento (administração de veículo, CBD ou clozapina) ($F_{4,64}=1,34$, $p=0,264$), assim como, nenhuma interação entre eles ($F_{2,64}=2,18$, $p=0,121$). Entretanto, o prejuízo induzido pelo MK-801 foi observado pela diminuição do índice de discriminação através da análise por ANOVA de uma via e o post-hoc de *Dunnett's* ($F_{7,64}=3.02$, $p < 0.05$; Figura 11c). Adicionalmente, o CBD e a clozapina *per se* não induziram nenhum efeito.



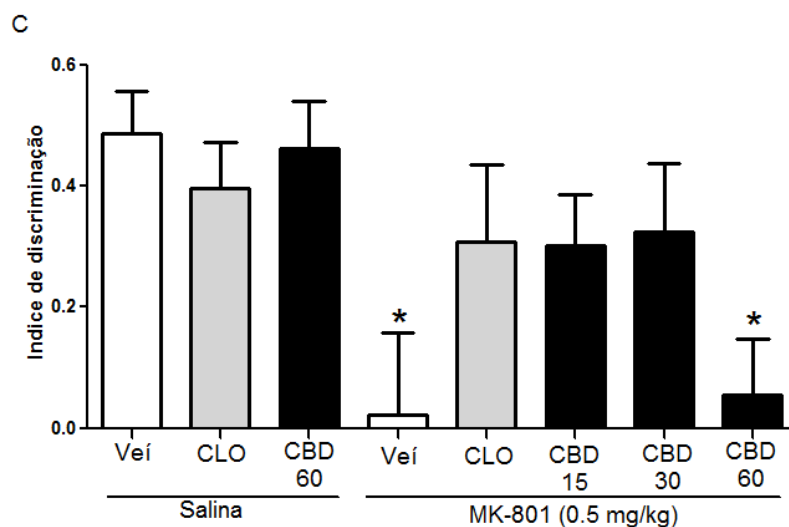


Figura 11. O tratamento repetido com CBD nas doses de 15 e 30 mg/kg, mas não 60 mg/kg, e clozapina atenuaram o prejuízo induzido por MK-801 no teste de RO. (A) Efeito dos tratamentos sobre a exploração de dois objetos idênticos na sessão de aquisição. (B) Efeito dos tratamentos sobre a exploração de um objeto novo e um objeto familiar na sessão de retenção. 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 ($n=9-10$ /grupo). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Dunnett's*.

4.3. Experimento 3: Efeito do tratamento com AM251 por 7 dias sobre a ação do CBD nos testes de IS e RO após o pré-tratamento com MK-801

4.3.1 Efeito do tratamento com AM251 na dose de 0,3 mg/kg sobre a ação do CBD nos testes de IS e RO após o pré-tratamento com MK-801

Interação social: O tratamento com AM251 (0,3 mg/kg) não foi capaz de bloquear os efeitos do CBD (30 mg/kg) em atenuar o prejuízo induzido por MK-801 no teste de IS. A ANOVA de três vias indicou que não houve efeito do primeiro tratamento (administração de salina ou MK-801) ($F_{1,75}=1,78$, $p=0,188$), assim como, para o segundo tratamento (administração de veículo ou AM251)

($F_{1,75}=1,58$, $p=0,212$), e terceiro tratamento (administração de veículo ou CBD) ($F_{1,75}=1,34$, $p=0,250$), entretanto, houve uma interação entre o primeiro e terceiro tratamento ($F_{1,75}=7,73$, $p=0,007$) e entre todos os tratamentos ($F_{1,75}=4,09$, $p=0,047$; Figura 12). O AM251, assim como o CBD, atenuou o efeito do MK-801 em produzir prejuízo no teste de IS ($p<0,05$, ANOVA de três vias seguida de teste de *Dunnett's*; Figura 12).

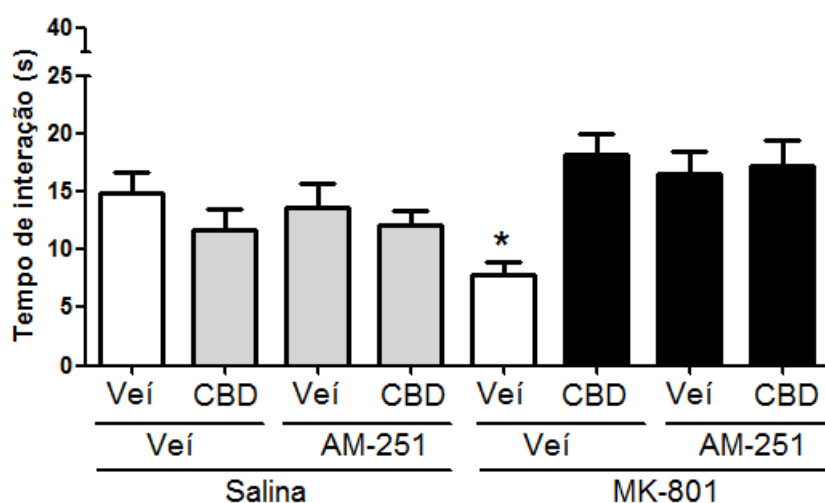
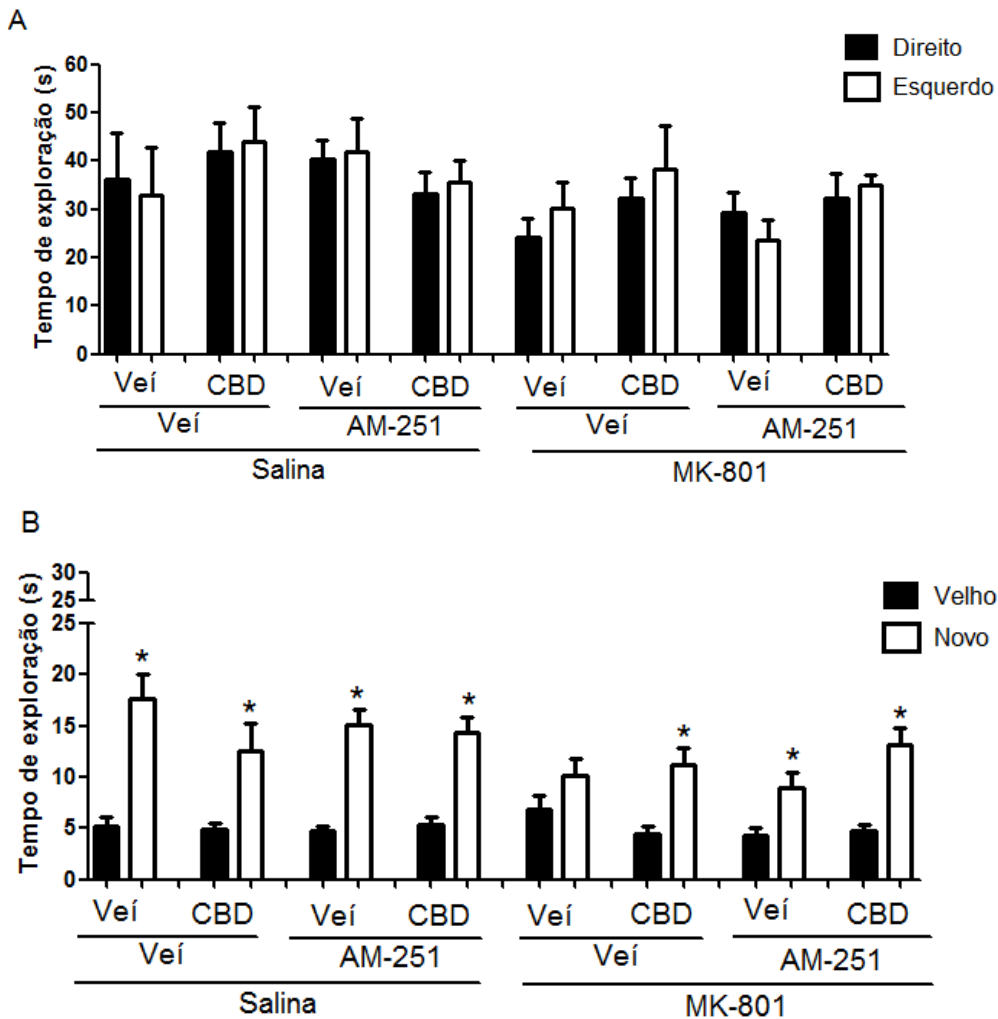


Figura 12. Tratamento repetido com AM251 (0,3 mg/kg) não bloqueia efeito do CBD (30 mg/kg) em atenuar o prejuízo no teste de IS induzido pelo tratamento com MK-801. (n=7-12/grupo). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. * $p<0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de *Dunnett's*.

Reconhecimento de objeto: Na sessão de aquisição não houve preferência de nenhum dos grupos por algum dos objetos idênticos ($p>0,05$, teste t de *student*; Figura 13a). Por outro lado, na sessão de retenção, o tempo gasto explorando o objeto novo em relação ao objeto familiar foi significativamente maior entre todos os grupos, exceto para o grupo MK-801+veículo+veículo ($p<0,05$, teste t de *student*; Figura 13b). Em relação ao índice de discriminação, o prejuízo induzido pelo MK-801 foi observado pela

diminuição do índice de discriminação nos animais tratados com veículo+MK-801 e este prejuízo foi atenuado pelo tratamento com AM251, CBD e a combinação de AM251+CBD. A ANOVA de três vias indicou uma tendência para o efeito do primeiro tratamento (administração de salina ou MK-801) ($F_{1,75}=3,43$, $P=0,068$), porém não houve efeito do segundo tratamento (administração de veículo ou AM251) ($F_{1,75}=1,056$ $P=0,307$), e não houve um efeito significativo do terceiro tratamento (administração de veículo ou CBD) ($F_{1,75}=0,009$, $P=0,926$) e uma interação entre o primeiro e terceiro tratamento ($F_{1,75}=7,27$, $P=0,009$). O *post-hoc* de Dunnett's indicou uma diferença entre os animais tratados com MK-801-veículo-veículo em relação ao grupo salina-veículo-veículo ($p<0,05$ ANOVA de uma via seguida de teste de *Dunnett*, Figura 13c).



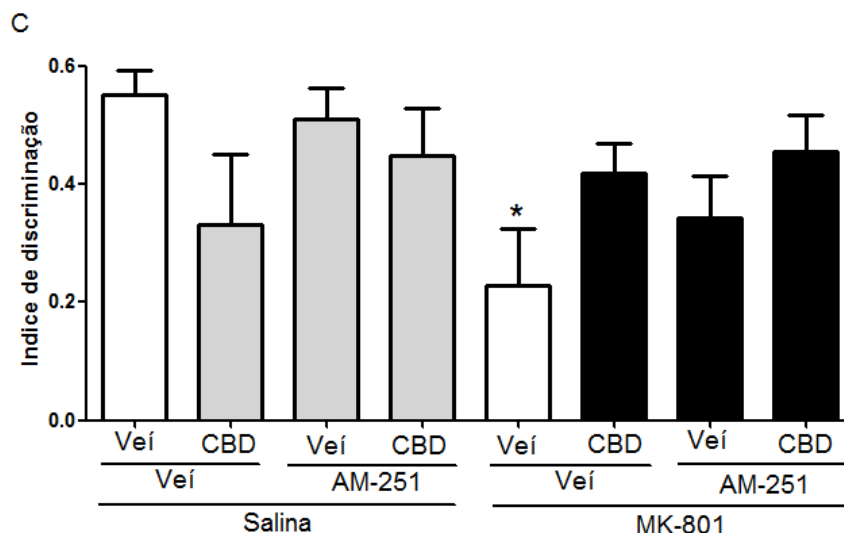


Figura 13. O tratamento repetido com AM251 (0,3 mg/kg) não bloqueou o efeito do CBD (30 mg/kg) em atenuar o prejuízo no teste de RO induzido por MK-801. (A) Efeito dos tratamentos sobre a exploração de dois objetos idênticos na sessão de aquisição. (B) Efeito dos tratamentos sobre a exploração de um objeto novo e um objeto familiar na sessão de retenção. 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 ($n=7-12$ /grupo). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de *Dunnett's*.

4.3.2 Efeito do tratamento com AM251 na dose de 0,1 mg/kg sobre a ação do CBD nos testes de IS e RO após o pré-tratamento com MK-801

Interação social: Diferente da dose de 0,3 mg/kg, o tratamento com AM251 na dose de 0,1 mg/kg não reverteu os prejuízos induzidos pelo MK-801, mas também não foi capaz de bloquear os efeitos do CBD (30 mg/kg) sobre o prejuízo induzido por MK-801. A ANOVA de três vias indicou que não houve efeito do primeiro tratamento (administração de salina ou MK-801) ($F_{1,62}=0,52$, $p=0,475$), assim como, no segundo tratamento (administração de veículo ou AM251) ($F_{1,62}=0,41$, $p=0,523$), entretanto, houve um efeito significativo do terceiro tratamento (administração de veículo ou CBD) ($F_{1,62}=9,66$, $p=0,003$) e uma interação entre o primeiro e terceiro tratamento

($F_{1,62}=10,84$, $p=0,002$). O teste post-hoc de Dunnett's indicou que houve diferença entre o grupo MK+veículo+veículo e MK+AM251+veículo comparado ao grupo salina+veículo+veículo ($p<0,05$; Figura 14) indicando que o MK-801 foi eficaz em causar prejuízo no teste de IS e este prejuízo não foi atenuado pelo tratamento com AM251 (0,1 mg/kg), mas sim, pelo CBD (30 mg/kg).

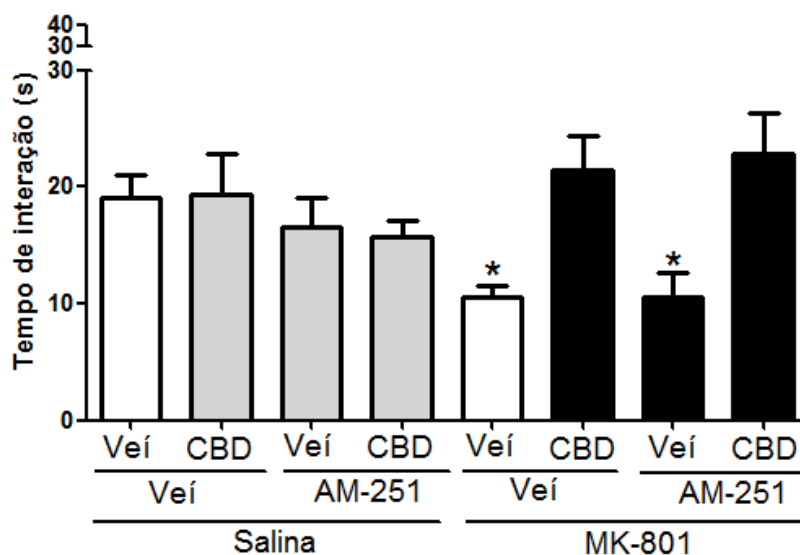
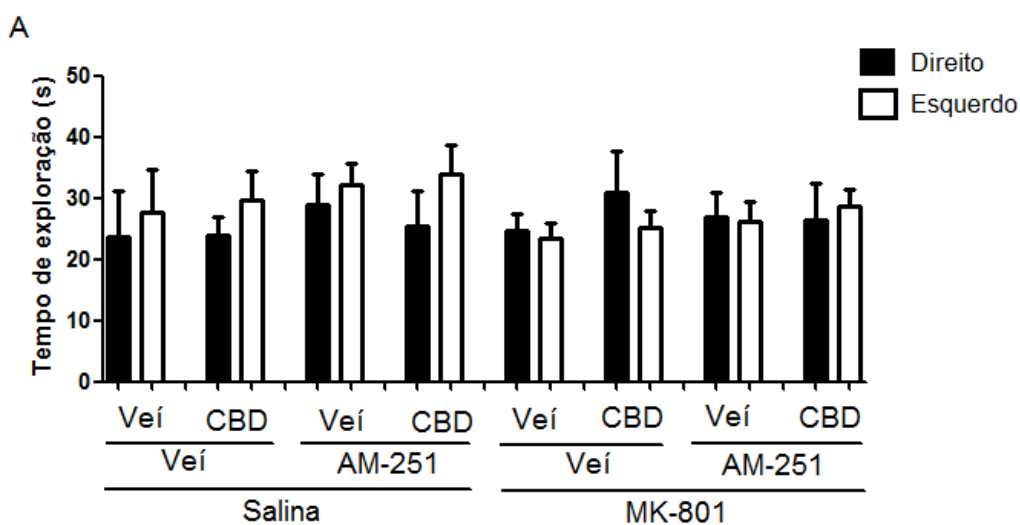


Figura 14. Tratamento repetido com AM251 (0,1 mg/kg) não bloqueia efeito do CBD (30 mg/kg) em atenuar o prejuízo induzido pelo tratamento com MK-801 no teste de IS. (n=8-9/grupo). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. * $p<0,05$ em relação ao grupo Veículo+salina, ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de *Dunnett's*.

Reconhecimento de objeto: Na sessão de aquisição não houve preferência de nenhum dos grupos por algum dos objetos idênticos ($p>0,05$, teste t de *student*; Figura 14a). Entretanto, na sessão de retenção, o tempo gasto explorando o objeto novo em relação ao objeto familiar foi significativamente maior entre todos os grupos, exceto MK-801+veículo+veículo e MK-801+AM251+veículo ($p<0,05$, teste t de *student*; Figura 14b). Em relação ao índice de discriminação, a ANOVA de três vias indicou um efeito significativo do primeiro tratamento (administração de salina ou MK-801) ($F_{1,62}=6,88$, $p=0,011$), mas não houve efeito do segundo

tratamento (administração de veículo ou AM251) ($F_{1,62}=0,22$, $p=0,641$), assim como para o terceiro tratamento (administração de veículo ou CBD) ($F_{1,62}=1,84$, $p=0,180$), porém, também foi observada uma interação entre o primeiro e terceiro tratamento ($F_{1,62}=18,85$, $p<0,001$). O *post-hoc* de *Dunnett's* revelou um prejuízo induzido pelo MK-801 evidenciado pela diminuição do índice de discriminação no grupo MK-801+veículo+veículo em relação ao grupo salina+veículo+veículo e este prejuízo foi atenuado pelo tratamento com CBD, e a combinação de AM251+CBD, indicando que o AM251 não bloqueou os efeitos do CBD. E ainda, o tratamento com AM251 (0,1 mg/kg) *per se* não induziu nenhum efeito ($p<0,05$; ANOVA de três vias seguido pelo teste de *Dunnett's*; Figura 14c).



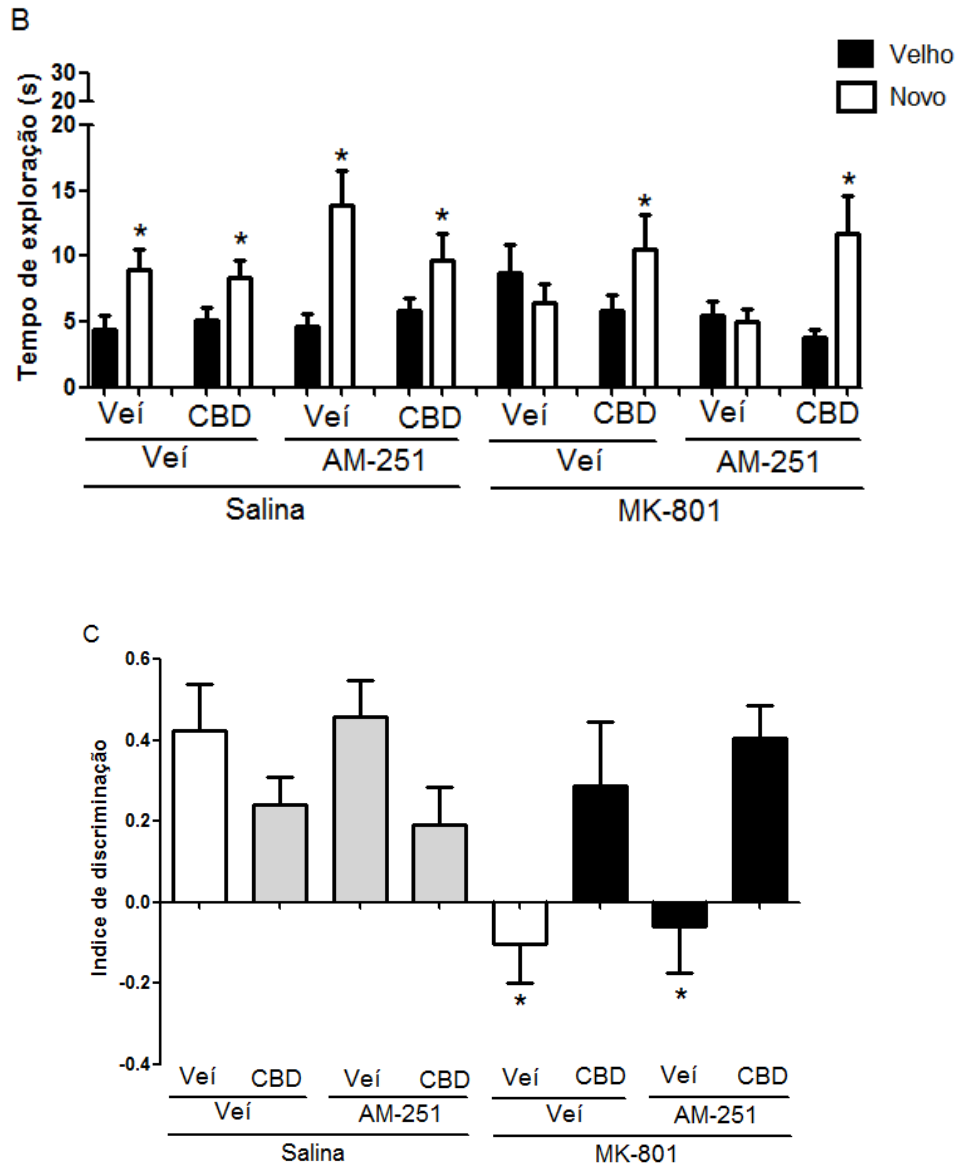


Figura 15. O tratamento repetido com AM251 (0,1 mg/kg) não bloqueou o efeito do CBD (30 mg/kg) em atenuar o prejuízo no teste de RO induzido por MK-801. (A) Efeito dos tratamentos sobre a exploração de dois objetos idênticos na sessão de aquisição. (B) Efeito dos tratamentos sobre a exploração de um objeto novo e um objeto familiar na sessão de retenção. 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 ($n=8-9$ /grupo). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de *Dunnnett's*.

4.4. Experimento 4: Efeito do tratamento com WAY100635 por 7 dias sobre a ação do CBD nos testes de IS e RO após o pré-tratamento com MK-801

4.4.1 Efeito do tratamento com WAY100635 na dose de 0,3 mg/kg sobre a ação do CBD nos testes de IS e RO após o pré-tratamento com MK-801

Interação social: O tratamento com WAY100635 (0,3 mg/kg) foi capaz de bloquear os efeitos do CBD (30 mg/kg) sobre o prejuízo induzido por MK-801 no teste de IS. A ANOVA de três vias indicou um efeito significativo do primeiro tratamento (administração de salina ou MK-801) ($F_{1,39}=10,41$, $p=0,003$), um efeito significativo do segundo tratamento (administração de veículo ou WAY100635) ($F_{1,39}=7,35$, $p=0,010$), e a ausência de efeito do terceiro tratamento (administração de veículo ou CBD) ($F_{1,39}=0,45$, $p=0,508$) e uma interação entre eles ($F_{1,39}=9,437$ $p<0,001$; Figura 16). O *post-hoc* de *Dunnett's* revelou uma diferença entre os grupos MK-801+veículo+veículo, MK-801+WAY100635+Veículo e MK-801+WAY100635+CBD, o que indica que o WAY100635 foi capaz de bloquear o efeito do CBD sem causar efeito *per se* ($p<0,05$, ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de *Dunnett's*; Figura 16).

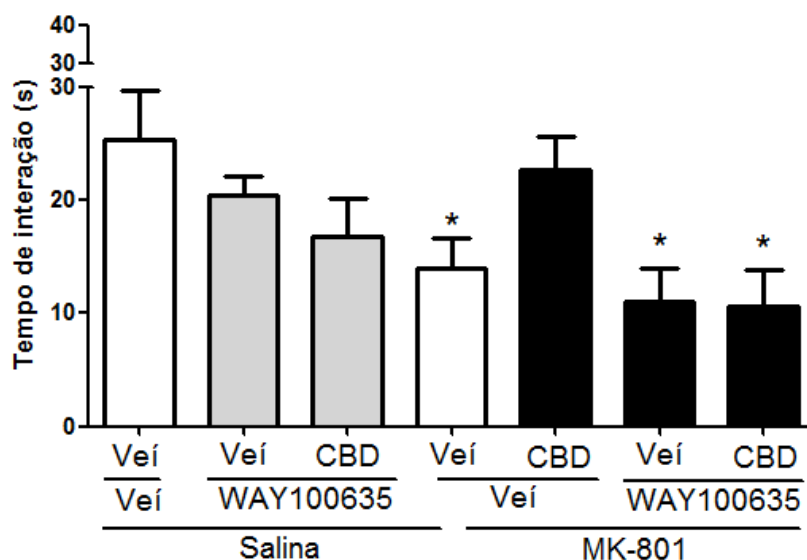
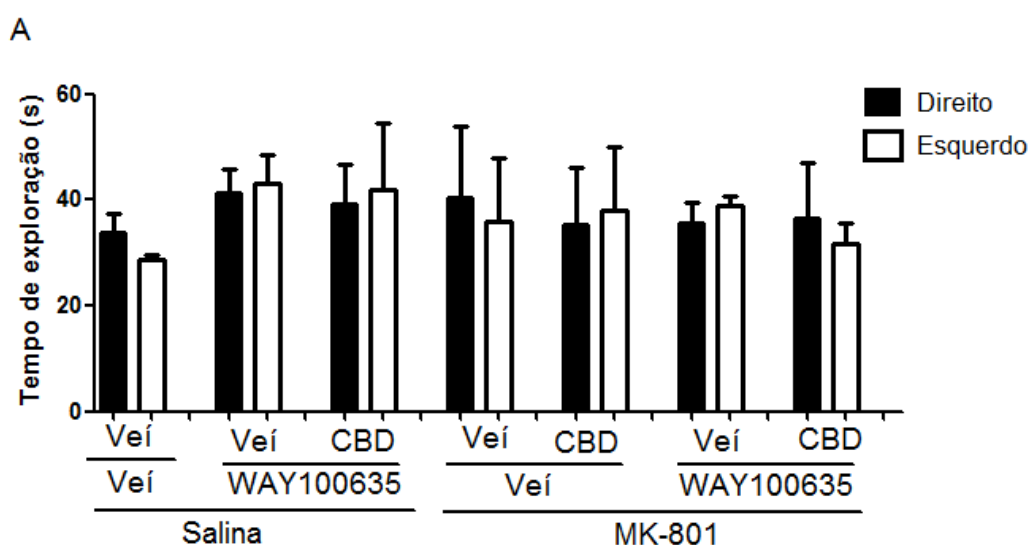


Figura 16. Tratamento repetido com WAY100635 (0,3 mg/kg) bloqueou o efeito do CBD (30 mg/kg) em atenuar o prejuízo no teste de IS induzido pelo tratamento com MK-801. (n=5-7/grupo). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. *p<0,05 em relação ao grupo salina+veículo+veículo, ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de *Dunnett's*.

Reconhecimento de objeto: Na sessão de aquisição não houve preferência de nenhum dos grupos por algum dos objetos idênticos (p>0,05, teste t de *student*; Figura 17a). Por outro lado, na sessão de retenção, o tempo gasto explorando o objeto novo em relação ao objeto familiar foi significativamente maior entre todos os grupos exceto MK-801+veículo+veículo e MK-801+WAY100635+CBD (p<0,05, teste t de *student*; Figura 17b). Em relação ao índice de discriminação, a ANOVA de três vias indicou um efeito do primeiro tratamento (administração de salina ou MK-801) ($F_{1,39}=23,66$, p<0,01), a ausência de efeito do segundo tratamento (administração de veículo ou WAY100635) ($F_{1,39}=0,01$, p=0,922), assim como do terceiro tratamento (administração de veículo ou CBD) ($F_{1,39}=1,54$, p=0,222), entretanto houve uma interação entre o segundo e terceiro tratamento ($F_{1,39}=9,92$, p=0,003; Figura 17c). O prejuízo induzido pelo MK-801 foi observado pela diminuição do índice de discriminação no grupo MK-801+veículo+veículo e este prejuízo foi atenuado pelo tratamento com CBD e WAY100635 na dose de 0,3 mg/kg mas não com a combinação de WAY100635+CBD (p<0,05, ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de *Dunnett's*; Figura 17c).



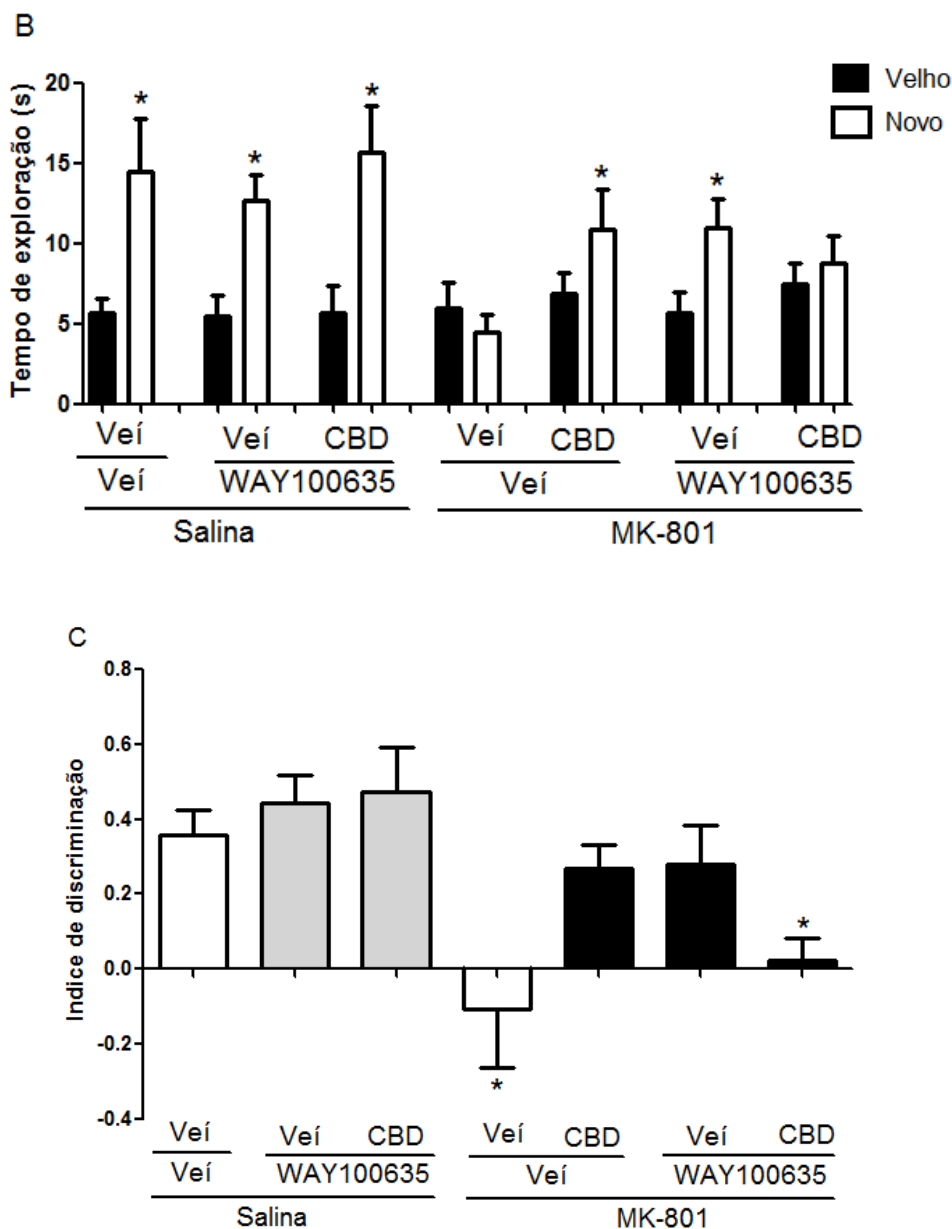


Figura 17. O tratamento repetido com WAY100635 (0,3 mg/kg) bloqueou o efeito do CBD (30 mg/kg) em atenuar o prejuízo no teste de RO induzido por MK-801. (A) Efeito dos tratamentos sobre a exploração de dois objetos idênticos na sessão de aquisição. (B) Efeito dos tratamentos sobre a exploração de um objeto novo e um objeto familiar na sessão de retenção. 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 ($n=5-7$ /grupo). Os dados estão apresentados como a média e o EPM.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de *Dunnett's*.

4.4.2 Efeito do tratamento com WAY100635 na dose de 0,1 mg/kg sobre a ação do CBD nos testes de IS e RO após o pré-tratamento com MK-801

Interação social: O tratamento com WAY100635 (0,1 mg/kg) foi capaz de bloquear os efeitos do CBD (30 mg/kg) sobre o prejuízo induzido por MK-801 no teste de IS. A ANOVA de três vias indicou um efeito significativo do primeiro tratamento (administração de salina ou MK-801) ($F_{1,43}=22,87$, $p < 0,001$), um efeito significativo do segundo tratamento (administração de veículo ou WAY100635) ($F_{1,43}=8,46$, $p=0,006$), e do terceiro tratamento (administração de veículo ou CBD) ($F_{1,43}=11,20$, $p=0,002$) e uma interação entre o segundo e terceiro tratamento ($F_{1,43}=5,86$ $p=0,02$; Figura 18). O *post-hoc* de *Dunnett's* revelou uma diferença entre os grupos MK-801+veículo+veículo, MK-801+WAY100635+Veículo e MK-801+WAY100635+CBD, o que indica que o WAY100635 foi capaz de bloquear o efeito do CBD sem causar efeito *per se* ($p < 0,05$, ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de *Dunnett's*; Figura 18).

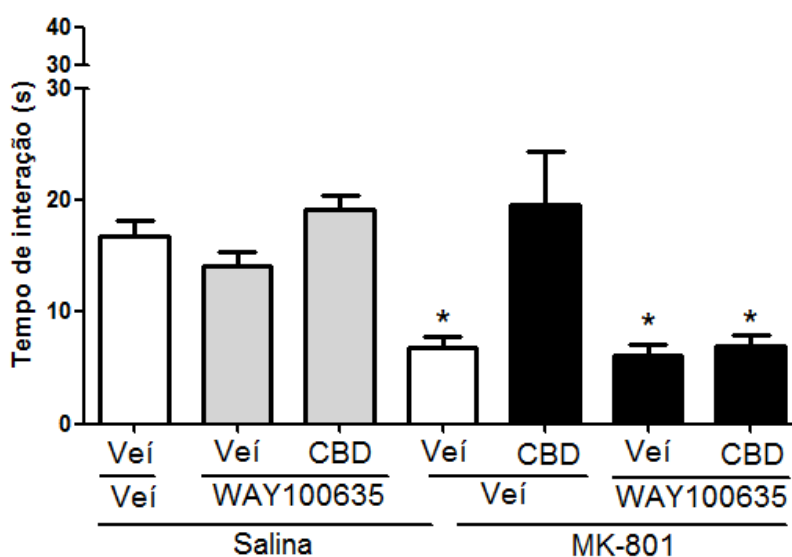
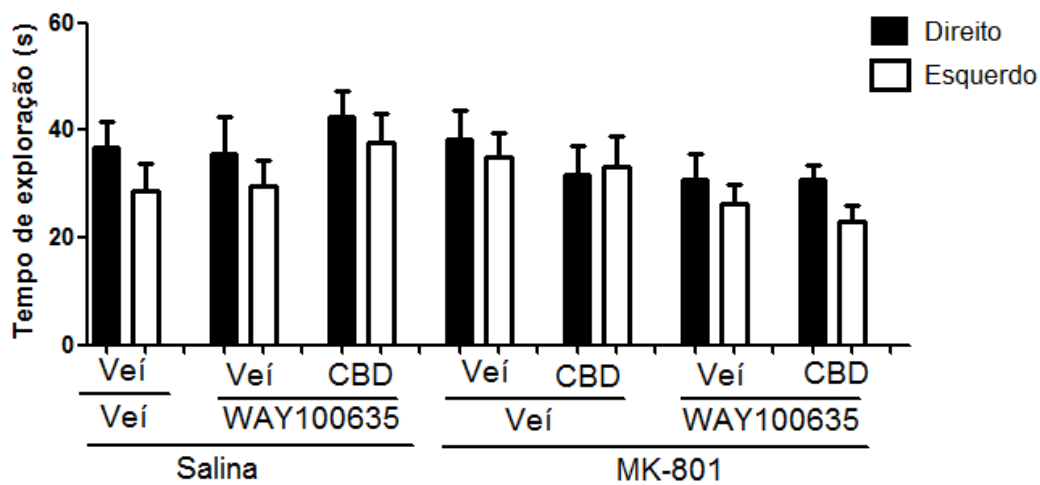


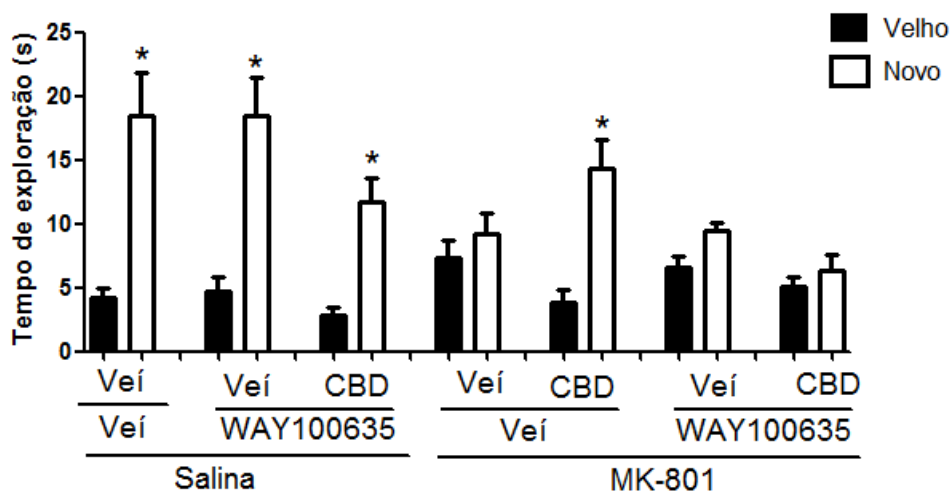
Figura 18. Tratamento repetido com WAY100635 (0,1 mg/kg) bloqueou o efeito do CBD (30 mg/kg) em atenuar o prejuízo no teste de IS induzido pelo tratamento com MK-801. (n=6-9/grupo). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. *p<0,05 em relação ao grupo salina+veículo+veículo, ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de *Dunnett's*.

Reconhecimento de objeto: Na sessão de aquisição não houve preferência de nenhum dos grupos por algum dos objetos idênticos ($p > 0,05$, teste t de *student*; Figura 19a). Por outro lado, na sessão de retenção, o tempo gasto explorando o objeto novo em relação ao objeto familiar foi significativamente maior entre todos os grupos exceto MK-801+veículo+veículo, MK-801+WAY100635+veículo e MK-801+WAY100635+CBD ($p < 0,05$, teste t de *student*; Figura 19b). Em relação ao índice de discriminação, a ANOVA de três vias indicou um efeito do primeiro tratamento (administração de salina ou MK-801) ($F_{1,43}=36,94$, $p < 0,01$), do segundo tratamento (administração de veículo ou WAY100635) ($F_{1,43}=6,16$, $p=0,017$), e uma tendência para o efeito do terceiro tratamento (administração de veículo ou CBD) ($F_{1,43}=3,81$, $p=0,057$), entretanto houve uma interação entre o segundo e terceiro tratamento ($F_{1,43}=11,29$, $p=0,002$; Figura 19c). O prejuízo induzido pelo MK-801 foi observado pela diminuição do índice de discriminação no grupo MK-801+veículo+veículo e este prejuízo foi atenuado pelo tratamento com CBD mas não com o tratamento com WAY100635 e pela combinação de WAY100635+CBD ($p < 0,05$, ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de *Dunnett's*; Figura 19c).

A



B



C

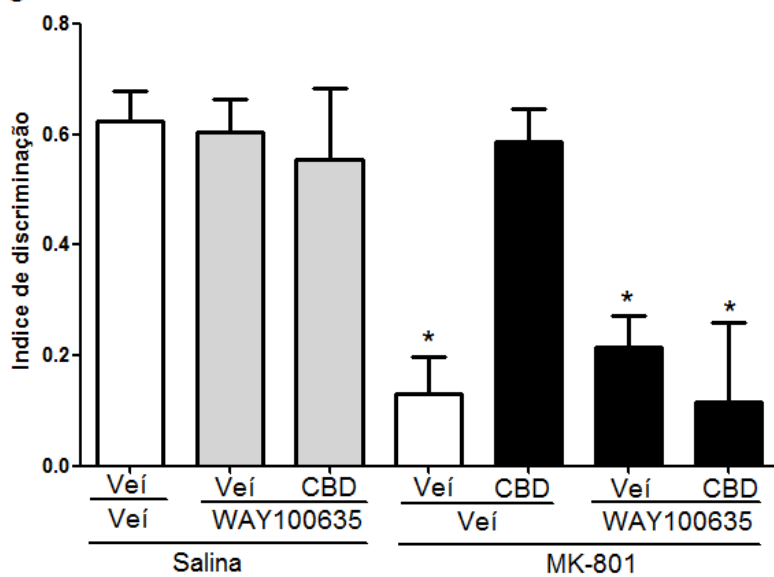


Figura 19. O tratamento repetido com WAY100635 (0,1 mg/kg) bloqueou o efeito do CBD (30 mg/kg) em atenuar o prejuízo no teste de RO induzido por MK-801. (A) Efeito dos tratamentos sobre a exploração de dois objetos idênticos na sessão de aquisição. (B) Efeito dos tratamentos sobre a exploração de um objeto novo e um objeto familiar na sessão de retenção. 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=6-9/grupo). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina, ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de *Dunnett's*.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que o tratamento com MK-801 por 14 dias na dose de 0,5 mg/kg é capaz de induzir prejuízos nos testes de IS e RO que foram observados 8 dias após o fim do tratamento. Semelhante ao antipsicótico atípico clozapina, o CBD, nas doses de 15, 30 e 60 mg/kg, reverteu os prejuízos induzidos pelo MK-801 no teste de IS e, nas doses de 15 e 30 mg/kg, no teste de RO, reforçando a proposta de que o CBD possui propriedades antipsicóticas. Esses achados vão ao encontro aos resultados obtidos pelo nosso grupo onde o tratamento repetido com CBD concomitantemente ao MK-801 atenuou as alterações comportamentais avaliadas nos testes de PPI, RO e IS induzidas pelo tratamento repetido com MK-801 (Gomes *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2015).

Sabe-se que drogas antipsicóticas atípicas recebem tal classificação principalmente por não induzirem sintomas extrapiramidais nas doses terapêuticas utilizadas para o tratamento de sintomas da esquizofrenia. Entretanto, apesar dos avanços no desenvolvimento de novos antipsicóticos, os medicamentos disponíveis na clínica não são eficazes em tratar sintomas negativos e cognitivos além de apresentar baixa tolerabilidade, o que causa um alto índice de desistência do tratamento (Ellevag e Goldberg, 2000; Lewis e Lieberman, 2008; Lieberman *et al.*, 2005; Hanson *et al.*, 2010).

O CBD é capaz de inibir estereotipias induzidas por apomorfina e inibe hiperlocomoção induzida por anfetamina, sugerindo assim, um possível efeito sobre os sintomas positivos da esquizofrenia, considerando que estes modelos são relacionados com estes sintomas (Zuardi *et al.*, 1991; Moreira e Guimaraes, 2005). Além disso, o CBD não induz catalepsia mesmo em altas

doses (Zuardi *et al.*, 1991), indicando que este composto teria um perfil similar aos antipsicóticos atípicos, visto que o teste de catalepsia é um teste preditivo para avaliar a capacidade do composto em produzir efeitos extrapiramidais. Em relação ao efeito sobre os sintomas negativos e cognitivos, o tratamento agudo com CBD reverteu o prejuízo no teste de IS induzido por MK-801 e o tratamento repetido com CBD preveniu o prejuízo no teste de IS e RO (Gururajan *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2014). Dessa forma, considerando que os estudos clínicos utilizando o CBD indicam que esta substância é bem tolerada pelos pacientes, o CBD pode ser um possível antipsicótico atípico e com um potencial efeito sobre os sintomas negativos e cognitivos, portanto, o mecanismo de ação pelo qual essa substância exerce essa atividade ainda não foi elucidado.

A hipótese de que o sistema endocanabinoide estaria envolvido no mecanismo de ação do CBD é baseada principalmente, no fato de que o CBD parece ser capaz de inibir a enzima FAAH ativando, de forma indireta, os receptores endocanabinóides (Giuffrida, *et al.*, 2004). Além disso, alguns achados como o efeito antipsicótico do CBD em pacientes ter sido acompanhado pelo aumento nos níveis de AEA e o bloqueio da degradação de AEA ter atenuado comportamentos tipo-psicóticos induzidos por PCP e anfetamina em roedores (Seillier *et al.*, 2010; Leweke *et al.*, 2012), entre outros estudos citados anteriormente, nos motivaram a testar o efeito do antagonismo dos receptores CB1 através do pre-tratamento com AM251 na atividade do CBD nos testes de IS e RO. Nossos dados mostraram que o antagonismo farmacológico dos receptores CB1 não bloqueou os efeitos do CBD, indicando

que a ativação dos receptores CB1 parece não ser essencial para o efeito do CBD em reverter os prejuízos induzidos pelo MK-801 nos testes de IS e RO.

Em contrapartida, o AM251, na dose de 0,3 mg/kg, assim como o CBD, foi capaz de atenuar os prejuízos induzidos pelo MK-801. Esses resultados estão de acordo com estudos mostrando que o tratamento repetido com AM251 reverteu déficits nos testes de IS e RO em um modelo baseado em isolamento social (Zamberletti *et al.*, 2012), bem como em atenuar os prejuízos induzidos pelo PCP no teste de PPI (Ballmaier *et al.*, 2007). Sendo assim, o efeito do CBD pode estar relacionado com a estimulação de outros receptores, como o receptor vanilóide do tipo 1 (TRPV1), por exemplo, visto que a AEA, além de ativar os receptores CB1, também atua como agonista endógeno dos receptores TRPV1. Considerando que o envolvimento deste receptor parece ser importante na redução de hiperatividade induzida por aumento da neurotransmissão dopaminérgica (Tzavara *et al.*, 2006), e que o efeito do tratamento agudo com CBD sobre o prejuízo no PPI induzido por MK-801 foi bloqueado por capsazepina, um antagonista TRPV1 (Long *et al.*, 2006), o efeito indireto do CBD via inibição da FAAH pode ser dependente da ativação do receptor TRPV1, para esclarecer essa hipótese novas investigações são necessárias para avaliar se a ativação desse receptor poderia estar envolvida no efeito antipsicótico do CBD.

Embora a fisiopatologia da esquizofrenia ainda não seja completamente compreendida, os efeitos dos antipsicóticos atípicos utilizados para o tratamento deste transtorno sugerem o envolvimento de vias serotoninérgicas em seu mecanismo de ação. Como descrito na introdução, o aripiprazol, clozapina, ziprazidona, tandospirona e lurasidona, tem uma ação agonista

parcial nos receptores 5-HT_{1A} e esta característica é associada com seus efeitos sobre os sintomas negativos e cognitivos em humanos e em modelos animais (Meltzer *et al.*, 2003; Horiguchi e Meltzer, 2012; Horiguchi *et al.*, 2016). O fato de que o CBD é capaz de atenuar os efeitos do MK-801 nos testes de IS e RO e ainda que o CBD tem uma ação como agonista do receptor 5-HT_{1A}, embasou a hipótese de que este possa induzir efeitos tipo-antipsicóticos dependente da ativação dos receptores 5-HT_{1A} (Campos *et al.*, 2016). Os nossos resultados indicam que, de fato, o antagonismo dos receptores 5-HT_{1A} através do pre-tratamento com o antagonista dos receptores 5-HT_{1A} WAY100635 bloqueou o efeito do CBD em reverter os prejuízos induzidos por MK-801 nos testes de IS e RO, portanto, o mecanismo de ação pelo qual o CBD exerce o efeito tipo-antipsicótico parece depender da ativação dos receptores 5-HT_{1A}, característica compartilhada com os antipsicóticos atípicos.

Alguns antipsicóticos atípicos como a lurasidona e tandospirona aumentam o efluxo cortical e hipocampal de dopamina por um mecanismo dependente da ativação do receptor 5-HT_{1A} e este aumento de dopamina parece ser importante para a melhora dos prejuízos cognitivos (Ichikawa *et al.*, 2002; Tanahashi *et al.*, 2012). Esta interação pode ocorrer no hipocampo, visto que esta estrutura tem projeções para o córtex pré-frontal, amígdala e regiões límbicas, assim, a desregulação nestas estruturas pode ter um papel importante no desenvolvimento de sintomas positivos, negativos e cognitivos. A desinibição de células piramidais do hipocampo leva a um estado hiperdopaminérgico, o que pode causar os sintomas positivos da esquizofrenia (Lisman *et al.*, 2008; Grace, 2016). O tratamento subcrônico com PCP elevou o limiar para a potencialização a longo prazo (do inglês: "*long term potentiation*"),

LTP) nas sinapses excitatórias da região CA1 do hipocampo, uma das principais regiões relacionadas a aprendizagem e a memória (Nomura *et al.*, 2016). Este limiar de LTP elevado pode estar associado com o aumento da entrada inibitória aos neurônios piramidais na CA1 através do aumento da atividade dos interneurônios GABAérgicos, o que levaria a uma hipofunção dos neurônios hipocampais (Luttgen *et al.*, 2005). Nos interneurônios GABAérgicos do córtex e hipocampo existe uma alta densidade de receptores 5-HT_{1A} e estes tem um efeito inibitório via hiperpolarização neuronal (Schmitz e Empson, 1995). A estimulação dos receptores 5-HT_{1A} nestes interneurônios pode diminuir a influência inibitória nos neurônios piramidais do hipocampo que tem um papel essencial na regulação de oscilações gama que tem um papel importante em funções cognitivas (Klausberger, 2009). Os neurônios piramidais do hipocampo quando disparados estimulam os interneurônios GABAérgicos contendo a proteína de ligação ao cálcio parvalbumina e então, produzem a inibição perisomática de células piramidais do hipocampo, que então param de disparar. Alterações nesse controle excitatório-inibitório resulta em desregulação das oscilações gama. Estas oscilações estão reduzidas em pacientes com esquizofrenia e esta redução é relacionada com a severidade dos sintomas negativos e cognitivos da doença (Lee *et al.*, 2003; Lisman, 2012).

Em um modelo de esquizofrenia induzido pelo tratamento com MK-801, o CBD, assim como a clozapina, foi capaz de reverter a diminuição no número de interneurônios parvalbumina positivos no córtex pré-frontal medial (Gomes *et al.*, 2015), portanto, o CBD reestabelece a modulação dos neurônios piramidais por um mecanismo que envolve os interneurônios parvalbumina

positivos e essa alteração nos interneurônios promovida pelo CBD pode depender da ativação do sistema serotoninérgico.

Além desse papel nos interneurônios parvalbumina positivos, a neurotransmissão serotoninérgica via 5-HT_{1A} parece ser importante em processos plásticos também relacionados com transtornos psiquiátricos como, por exemplo, a neurogênese e a formação de espinhos dendríticos. A serotonina pode estimular a neurogênese via 5-HT_{1A} e agonistas destes receptores podem prevenir os efeitos inibitórios do estresse em células precursoras granulares (Gould, 1999). A redução da neurogênese hipocampal adulta parece estar relacionada com a neurobiologia da esquizofrenia, visto que esta parece estar diminuída em vários modelos animais de esquizofrenia assim como, em pacientes com esquizofrenia (Teuchert-Noodt *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2006; Reif *et al.*, 2006; Cardon *et al.*, 2010). Enquanto o tratamento com haloperidol não alterou neurogênese, antipsicóticos atípicos como clozapina e olanzapina foram capazes de aumentar o número de células brdU positivas no hipocampo, que são um indicativo de neurogênese, assim como atenuaram a redução da neurogênese induzida por estresse de restrição repetido, injeção pré-natal de ácido poliriboinosínico-poliribocítídílico (poli I:C) e PCP (Halim *et al.*, 2004; Kodama *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2007; Piontkewitz *et al.*, 2012). Entretanto, estudos que investigam se este efeito é dependente da neurotransmissão serotoninérgica ainda não foram realizados.

Além disso, a ativação do receptor 5-HT_{1A} parece ser importante para a formação de espinhos dendríticos em células do giro denteado do hipocampo (Faber e Haring, 1999) e essa sinaptogênese também parece estar alterada em pacientes com esquizofrenia. Em amostras *post-mortem* foram observados

uma alteração na densidade de espinhos dendríticos no córtex frontal e temporal e estriado (Roberts *et al.*, 1996; Garey *et al.*, 1998). Em animais tratados com PCP houve uma diminuição de aproximadamente 42% no número de espinhos sinápticos no córtex pré-frontal (Elsworth *et al.*, 2011). Além disso, o tratamento com clozapina aumenta a densidade de espinhos dendríticos enquanto o haloperidol diminui a densidade de espinhos dendríticos no hipocampo (Critchlow *et al.*, 2006).

O CBD foi capaz de aumentar a neurogênese em um protocolo de estresse crônico imprevisível em relação aos animais não estressados assim como, em um modelo animal de Alzheimer (Esposito *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2013; Fogaça, 2016), portanto não há estudos relacionando o aumento de neurogênese induzida por CBD e a melhora nos sintomas da esquizofrenia, tampouco se este efeito depende da ativação dos receptores 5-HT_{1A}. Além disso, ainda não foi elucidado se o CBD é capaz de atenuar a diminuição de espinhos dendríticos e da neurogênese induzida pelos antagonistas NMDA.

Em relação ao efeito *per se* observado com o tratamento com WAY100635 na dose de 0,3 mg/kg em reverter os efeitos do MK-801 no teste de RO, este resultado vai ao encontro de um estudo onde o WAY100635, administrado via intraperitoneal, na mesma dose utilizada neste trabalho preveniu os efeitos do ácido 3-((R)-2-carboxi-piperidin-4-il)-propil-1-fosfato (CPP) administrado via intracerebral no hipocampo no teste de discriminação espacial de duas plataformas (Carli *et al.*, 1999). Portanto, a dose utilizada poder ser considerada uma dose alta em relação a outros estudos nos quais o WAY100635 bloqueia o efeito tipo-antipsicótico do CBD, antipsicóticos atípicos e agonistas 5-HT_{1A}. As altas concentrações do antagonista pode ter resultado

em uma perda de seletividade, com atuação em outros receptores como 5-HT7, por exemplo, que culminaram no efeito observado (Ichikawa *et al.*, 2002; Sonogo *et al.*, 2016; . Rajagopal *et al.*, 2016).

No conjunto, nossos resultados sugerem que os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos do CBD podem ter algumas características em comum com os antipsicóticos atípicos, entretanto são necessários mais estudos clínicos para explorar se esta droga é eficaz em diminuir os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia. De qualquer forma, o mecanismo de ação do CBD revertendo os déficits negativos e cognitivos pode ser importante para se explorar a neurobiologia da esquizofrenia e assim, melhorar as alternativas terapêuticas disponíveis. Para tanto, estudos envolvendo o efeito do CBD sobre outros aspectos deste transtorno como, por exemplo, a neuroplasticidade, inflamação e as vias intracelulares envolvidas nestes processos são necessários.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Estes resultados sugerem que o tratamento repetido com CBD, assim como a clozapina, é capaz de reverter alterações induzidas pelo MK-801 nos testes de IS e RO, relacionados com os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia, respectivamente. Nossos resultados sugerem ainda que este efeito do CBD não é mediado pela ativação dos receptores CB1, mas que pode depender da ativação do receptor 5HT_{1A}. Desse modo, este composto poderia ser uma nova alternativa terapêutica, com perfil semelhante a um antipsicótico atípico e com uma ação sobre os sintomas positivos, negativos e cognitivos.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

BALLMAIER, M.; BORTOLATO, M.; RIZZETTI, C; ZOLI, M.; GESSA, G.; HEINZ, A.; SPANO, P. Cannabinoid receptor antagonists counteract sensorimotor gating deficits in the phencyclidine model of psychosis. **Neuropsychopharmacology**. v.32, n.10, p.2098-107, 2007.

BISOGNO, T.; HANUS, L.; DE PETROCELLIS, L.; TCHILIBON, S.; PONDE, D. E.; BRANDI, I.; MORIELLO, A. S.; DAVIS, J. B.; MECHOULAM, R.; DI MARZO, V. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. **Br J Pharmacol**. v.134, n.4, p.845-52, 2001

BRUINS SLOT, L.A.; KLEVEN, M.S.; NEWMAN-TANCREDI, A. Effects of novel antipsychotics with mixed D2 antagonist/5-HT1A agonist properties on PCP-induced social interaction deficits in the rat. **Neuropharmacology**. v.49, p.996–1006, 2005.

BUBENIKOVA-VALESOVA, V.; VOTAVA, M.; PALENICEK, T.; HORÁČEK, J. The opposite effect of a low and a high dose of serotonin 1A agonist on behavior induced by MK-801. **Neuropharmacology**. v.52, n.4, p.1071-8, 2007.

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.

CAMPOS, A. C.; ORTEGA, Z.; PALAZUELOS, J.; FOGAÇA, M. V.; AGUIAR, D. C.; DÍAZ-ALONSO, J.; ORTEGA-GUTIÉRREZ, S.; VÁZQUEZ-VILLA, H.; MOREIRA, F. A.; GUZMÁN, M.; GALVE-ROPERH, I.; GUIMARÃES, F. S. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. **Int J Neuropsychopharmacol**. v.16, n.6, p.1407-19, 2013.

CAMPOS, A.C.; MOREIRA, F.A.; GOMES, F.V.; DEL BEL, E.A.; GUIMARÃES, 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.5367, n.1607, p.3364-78, 2012

CAMPOS, A. C.; FOGACA, M. V.; SONEGO, A. B.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. **Pharmacological Research**, v.112, p.119–127, 2016

CARDON, M.; RON-HAREL, N.; COHEN, H.; LEWITUS, G. M.; SCHWARTZ, M. Dysregulation of kisspeptin and neurogenesis at adolescence link inborn immune deficits to the late onset of abnormal sensorimotor gating in congenital psychological disorders. **Mol Psychiatry**. v.15, n.4, p.415-25, 2010.

CARLI, M.; SILVA, S.; BALDUCCI, C.; SAMANIN, R. WAY 100635, a 5-HT_{1A} receptor antagonist, prevents the impairment of spatial learning caused by blockade of hippocampal NMDA receptors. v.38, n.8, p.1165–1173, 1999.

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.

CHONG, H. Y.; TEOH, S. L.; WU, D. B.; KOTIRUM, S.; CHIOU, C.; CHAIYAKUNAPRUK, N. Global economic burden of schizophrenia: a systematic review **Neuropsychiatr Dis Treat**. v.12, p.357–373, 2016.

CHOU, S.; JONES, S.; LI, M. Adolescent olanzapine sensitization is correlated with hippocampal stem cell proliferation in a maternal immune activation rat model of schizophrenia. **Brain Res**. v.27, n.1618, p.122–135, 2015.

COOPER, J. R.; BLOOM, F. E.; ROTH, R. H. **The Biochemical Basis of Neuropharmacology** 8th Edition. Oxford: Oxford University Press, 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.

CRITCHLOW, H. M.; MAYCOX, P. R.; SKEPPER, N.; KRYLOVA, O. Clozapine and haloperidol differentially regulate dendritic spine formation and synaptogenesis in rat hippocampal neurons. **Mol Cell Neurosci**. v.32, n.4, p.356-65, 2006.

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.

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.

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.

DEIANA, S.; WATANABE, A.; YAMASAKI, Y.; AMADA, N.; KIKUCHI, T.; STOTT, C.; RIEDEL, G. MK-801-induced deficits in social recognition in rats: reversal by aripiprazole, but not olanzapine, risperidone, or cannabidiol. **Behav Pharmacol.** v.26, n.8, p.748-65, 2015.

DEVINSKY, O.; CILIO, M.R.; CROSS, H.; FERNANDEZ-RUIZ, J.; FRENCH, J.; HILL, C.; KATZ, R.; DI MARZO, V.; JUTRAS-ASWAD, D.; NOTCUTT, W.G.; MARTINEZ-ORGADO, J.; ROBSON, P.J.; ROHRBACK, B.G.; THIELE, E.; WHALLEY, B.; FRIEDMAN, D. Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. **Epilepsia.** v. 55 n.6 p.791-802, 2014.

DIAZ-MATAIX, L.; SCORZA, M. C.; BORTOLOZZI, A.; TOTH, M.; CELADA, P.; ARTIGAS, F. Involvement of 5-HT_{1A} Receptors in Prefrontal Cortex in the Modulation of Dopaminergic Activity: Role in Atypical Antipsychotic Action. **The Journal of Neuroscience**, v.25, n.47, p.10831–10843, 2005.

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

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.

DRAGO, A.; RONCHI, D. D.; SERRETTI, A. 5-HT_{1A} gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies. *Int J Neuropsychopharmacol.* v.11, n.5, p.701-21, 2008.

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.

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.

ELSWORTH, J. D.; HAJSZAN, T.; LERANTH, C.; ROTH, R. H. Loss of asymmetric spine synapses in dorsolateral prefrontal cortex of cognitively impaired phencyclidine-treated monkeys. **Int J Neuropsychopharmacol.** v.14, n.10, p.1411-5, 2011.

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.

ENNACEUR, A.; One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. **Behav Brain Research** v.215 p.244–254, 2010

ESPOSITO, G.; SCUDERI, C.; VALENZA, M.; TOGNA, G. I.; LATINA, V.; DE FILIPPIS, D.; CIPRIANO, M.; CARRATÙ, M. R.; IUUVONE, T.; STEARDO, L. Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. **PLoS One.** v.6, n.12, p.28668, 2006.

FABER, K. M.; HARING, J. H. Synaptogenesis in the postnatal rat fascia dentata is influenced by 5-HT_{1a} receptor activation. **Brain Res Dev Brain Res.** v.114, n.2, p.245-52, 1999.

Fejgin, K.; Safonov, S.; Pålsson, E.; Wass, C.; Engel, J. A.; Svensson, L.; Klamer, D.; The atypical antipsychotic, aripiprazole, blocks phencyclidine-induced disruption of prepulse inhibition in mice. **Psychopharmacology (Berl)**,v.191, n.2, p.377-85, 2007.

FOGAÇA, M. V. Mecanismos envolvidos nos efeitos comportamentais e pró-neurogênicos da administração repetida do canabidiol em camundongos submetidos ao estresse crônico variável. 2016. 134 páginas. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, SP – 2016.

GAREY, L. J.; ONG, W. Y.; PATEL, T. S.; KANANI, M.; DAVIS, A, Mortimer AM, Barnes TR, Hirsch SR. Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** v.65, n.4, p.446-53, 1998.

GIUFFRIDA, A.; LEWEKE, F. M.; GERTH, C. W.; SCHREIBER, D.; KOETHE, D.; FAULHABER, J.; KLOSTERKÖTTER, J.; PIOMELLI, D. Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. **Neuropsychopharmacology.** v.29, n.11, p.2108-14, 2004.

GOMES, F. V.; ISSY, A. C.; FERREIRA, F. R.; VIVEROS, M. P.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol attenuates sensorimotor gating disruption and molecular changes induced by chronic antagonism of NMDA receptors in mice. **Int J Neuropsychopharmacol.** v.18 n.5, 2014.

GOMES, F. V.; LLORENTE, R.; DEL BEL, E. A.; VIVEROS, M. P.; LÓPEZ-GALLARDO, M.; GUIMARÃES, F. S. Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. **Schizophr Res.** v.164, n.1-3, p.155-63, 2015.

GOULD, E.; Serotonin and hippocampal neurogenesis. **Neuropsychopharmacology**, v.21, n.2, p.46S-51S, 1999.

GRACE A. A. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. **Nat Rev Neurosci.** v.17, n.8, p.524-32, 2016.

GRAYSON, B.; IDRIS, N.F.; NEILL, J.C. Atypical antipsychotics attenuate a sub-chronic PCP-induced cognitive deficit in the novel object recognition task in the rat. **Behav Brain Res.** v.184, n.1, p.31-8, 2007.

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.

HALIM, N. D.; WEICKERT, C. S.; MCCLINTOCK, B. W.; WEINBERGER, D. R.; LIPSKA, B. K. Effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on neurogenesis in the adult rat hippocampus. **Neuropsychopharmacology.** v.29, n.6, p.1063-9, 2004.

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.

HARTMANN, A. S. Efeitos do canabidiol no comportamento agressivo induzido por isolamento social em camundongos. 01/2016. 74 páginas. **Dissertação (mestrado)** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, SP – 2016.

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.

HERKENHAM, M. et. al. Cannabinoid receptor localization in brain. **Neurobiology**, v. 87, n. 5, p. 1932-6, 1990.

HORIGUCHI, M.; MELTZER, H. Y. The role of 5-HT_{1A} receptors in phencyclidine (PCP)-induced novel object recognition (NOR) deficit in rats. **Psychopharmacology**, v.221, p.205–215, 2012.

HORIGUCHI, M.; MIYAUCHI, M.; NEUGEBAUER, N. M.; OYAMADA, Y.; MELTZER H. Y. Prolonged reversal of the phencyclidine-induced impairment in novel object recognition by a serotonin (5-HT)_{1A}-dependent mechanism. **Behavioural Brain Research**, v.301, p.132–141, 2016.

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 Pharmacokinetic Biopharm**, v. 9, n. 3, p. 245-60, 1981.

ICHIKAWA, J.; LI, Z.; DAI, J.; MELTZER, H. Y. Atypical antipsychotic drugs, quetiapine, iloperidone, and melperone, preferentially increase dopamine and acetylcholine release in rat medial prefrontal cortex: role of 5-HT_{1A} receptor agonism. **Brain Res**. v.956, p.349–357, 2002.

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.

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.

KARGIEMAN, L.; RIGA, M. S.; ARTIGAS, F.; CELADA, P. Clozapine Reverses Phencyclidine-Induced Desynchronization of Prefrontal Cortex through a 5-HT1A Receptor-Dependent Mechanism. **Neuropsychopharmacology**, v.37, p.723–733, 2012

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

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

KLAUSBERGER, T. GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus, **Eur. J. Neurosci.** v.30, p.947–957, 2009.

KODAMA, M.; FUJIOKA, T.; DUMAN, R. S. Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat. **Biol Psychiatry**. v.56, n.8, p.570-80, 2004.

KRYSTAL, J. H.; PERRY, E. B., JR.; GUEORGUIEVA, 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.

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.

LEE, K. H.; WILLIAMS, L. M.; BREAKSPEAR, M.; GORDON, E. Synchronous gamma activity: a review and contribution to

an integrative neuroscience model of schizophrenia. **Brain Res Brain Res Rev.** v.41 n.1, p.57-78, 2003.

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 CUtLASS: 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.

Lisman, J. E.; Coyle, J. T.; Green, R. W.; Javitt, D. C.; Benes, F. M.; Heckers, S.; Grace, A. A.; Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. **Trends Neurosci**, v.31, n.5, p.234-42, 2008.

Lisman, J.; Excitation, inhibition, local oscillations, or large-scale loops: what causes the symptoms of schizophrenia? **Curr Opin Neurobiol.** v.22, n.3, p.537-44, 2012.

LIU, J.; SUZUKI, T.; SEKI, T.; NAMBA, T.; TANIMURA, A.; ARAI, H. Effects of repeated phencyclidine administration on adult hippocampal neurogenesis in the rat. **Synapse.** v.60, n.1, p.56-68, 2006.

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.

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.

LUO, C.; XU, H.; LI, X. M. Quetiapine reverses the suppression of hippocampal neurogenesis caused by repeated restraint stress. **Brain Res.** v.23, n.1063(1), p.32-9, 2005.

LUONGO, L.; MAIONE, S.; DI MARZO, V. Endocannabinoids and neuropathic pain: focus on neuron-glia and endocannabinoid-neurotrophin interactions. **Eur J Neurosci**, v. 39, n. 3, p. 401–408, 2014.

LUTTGEN, M.; OGREN, S. O.; MEISTER, B. 5-HT_{1A} receptor mRNA and immunoreactivity in the rat medial septum/diagonal band of Broca-relationships to GABAergic and cholinergic neurons, **J. Chem. Neuroanat.** v,29, p.93–111, 2005.

MAEDA, K.; SUGINO, H.; HIROSE, T.; KITAGAWA, H.; NAGAI, T.; MIZOGUCHI, H.; TAKUMA, K.; YAMADA, K. Clozapine prevents a decrease in neurogenesis in mice repeatedly treated with phencyclidine. **J Pharmacol Sci.** v.103, n.3, p.299-308, 2007.

MAGEN, I.; AVRAHAM, Y.; ACKERMAN, Z.; VOROBIEV, L.; MECHOULAM, R.; BERRY, E. M. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile duct ligated mice via 5-HT_{1A} receptor activation. **Br J Pharmacol.** v.159, n.4, p.950-7, 2010.

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.

MARCUS, S. C.; OLFSO, M. Outpatient antipsychotic treatment and inpatient costs of schizophrenia. **Schizophr Bull.** v.34, n.1, p.173-80, 2008

MASELLIS, M.; BASILE, V.; MELTZER, H. Y.; LIEBERMAN, J. A.; SEVY, S.; MACCIARDI, F. M.; COLA, P.; HOWARD, A.; BADRI, F.; NÖTHEN, M. M.; KALOW, W.; KENNEDY, J. L. Serotonin subtype 2 receptor genes and clinical response to clozapine in schizophrenia patients. **Neuropsychopharmacology.** v.19, n.2, p.123-32, 1998.

MATHERN, G.; NEHLIG, A.; SPERLING, M. Cannabidiol and medical marijuana for the treatment of epilepsy. **Epilepsia.** v. 55 n.6 p.781-2, 2014.

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.

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.

MELTZER, H. Y.; LI, Z.; KANEDA, Y.; ICHIKAWA, J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v.27, n.71, p.159-72, 2003.

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.

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.

NAGAI, T.; MURAI, R.; MATSUI, K.; KAMEI, H.; NODA, Y.; FURUKAWA, H.; NABESHIMA, T. Aripiprazole ameliorates phencyclidine-induced impairment of recognition memory through dopamine D1 and serotonin 5-HT_{1A} receptors. **Psychopharmacology**, v.202, p.315–328, 2009.

NEELAKANTAN, H.; TALLARIDA, R. J.; REICHENBACH, Z. W.; TUMA, R. F.; WARD, S. J.; WALKER E. A. Distinct interactions of cannabidiol and morphine in three nociceptive behavioral models in mice. **Behavioural pharmacology**, v.26, n.3, p.304-14, 2015.

NOMURA, T.; OYAMADA, Y.; FERNANDES, H. B.; REMMERS, C. L.; XU, J.; MELTZER, H. Y.; CONTRACTOR, A. Subchronic phencyclidine treatment in adult mice increases GABAergic transmission and LTP threshold in the hippocampus. **Neuropharmacology**. v.100, p.90-7, 2016.

PAZOS, M.R.; MOHAMMED, N.; LAFUENTE, H.; SANTOS, M.; MARTÍNEZ-PINILLA, E.; MORENO, E.; VALDIZAN, E.; ROMERO, J.; PAZOS, A.; FRANCO, R.; HILLARD, C.J.; ALVAREZ, F.J.; MARTÍNEZ-ORGADO, J. Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic-ischemic newborn pigs: role of 5HT_{1A} and CB₂ receptors. **Neuropharmacology**, v.71 p.282-91, 2013

PETITET, F.; JEANTAUD, B.; REIBAUD, M.; IMPERATO, A.; DUBROEUCQ, M. C.; Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial

agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. **Life Sci.** v.63, n.1, p.1-6, 1998.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 11, p. 873–884, 2003.

PIOMELLI, D. The endocannabinoid system: a drug discovery perspective. **Curr Opin Investig Drugs**. v.6, n.7, p.672-9, 2005.

PIONTKIEWITZ, Y.; BERNSTEIN, H. G.; DOBROWOLNY, H.; BOGERTS, B.; WEINER, I.; KEILHOFF, G. Effects of risperidone treatment in adolescence on hippocampal neurogenesis, parvalbumin expression, and vascularization following prenatal immune activation in rats. **Brain Behav Immun**. v.26, n.2, p.353-63, 2012.

REIF, A.; FRITZEN, S.; FINGER, M.; STROBEL, A.; LAUER, M.; SCHMITT, A.; LESCH, K. P. Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. **Mol Psychiatry**. v.11, n.5, p.514-22, 2006.

Roberts, R. C.; Conley, R.; Kung, L.; Peretti, F. J.; Chute, D. J. Reduced striatal spine size in schizophrenia: a postmortem ultrastructural study. **Neuroreport**. v.7, n.6, p.1214-8, 1996.

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.

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.

SCHREIBER, R.; NEWMAN-TANCREDI, A.;
Improving cognition in schizophrenia with antipsychotics that

elicit neurogenesis through 5-HT(1A) receptor activation. **Neurobiol Learn Mem.** v.110, p.72-80, 2014.

SCHMITZ, D.; EMPSON, R. M.; Heinemann, U. Serotonin reduces inhibition via 5-HT1A receptors in area CA1 of rat hippocampal slices in vitro, **J. Neurosci.** v.15 p.7217–7225, 1995.

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

SEEMAN, P. Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D2High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose. **Transl Psychiatry.** v.6, n.10, p.920, 2016

SEILLIER, A.; ADVANI, T.; CASSANO, T.; HENSLER, J. G.; GIUFFRIDA, A. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase and CB1 receptor antagonism differentially affect behavioural responses in normal and PCP-treated rats. **Int J Neuropsychopharmacol.** v.13, n.3, p.373-86, 2010.

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

SILVEIRA, M. M.; ARNOLD, J. C.; LAVIOLETTE, S. R.; HILLARD, C. J.; CELORRIO, M.; AYMERICH, M. S.; ADAMS, W. K. Seeing through the smoke: Human and animal studies of cannabis use and endocannabinoid signalling in corticolimbic networks. **Neurosci Biobehav Rev.** v.S0149-7634, n.15, p.30363-8, 2016.

SNIGDHA, S.; NEILL, J. C. Efficacy of antipsychotics to reverse phencyclidine-induced social interaction deficits in female rats - A preliminary investigation. **Behavioural Brain Research,** v.187, p.489–494, 2008

SNIGDHA, S.; NEILL, J. C. Improvement of phencyclidine-induced social behaviour deficits in rats: Involvement of 5-HT1A receptors. **Behavioural Brain Research,** v.191 p. 26–31, 2008b

SOARES, V.P.; CAMPOS, A.C.; Evidences for the anti-panic actions of Cannabidiol. **Curr Neuropharmacol.**v.14, n.8, 2016

SONEGO, A. B.; GOMES, F. V.; DEL BEL, E. A.; GUIMARAES, F. S. Cannabidiol attenuates haloperidol-induced catalepsy and c-Fos protein

expression in the dorsolateral striatum via 5-HT_{1A} receptors in mice. **Behav Brain Res.** v.1, n.309, p.22-8, 2016.

SUMIYOSHI, T.; PARK, S.; JAYATHILAKE, K.; ROY, A.; ERTUGRUL, A.; MELTZER, H. Y. Effect of buspirone, a serotonin_{1A} partial agonist, on cognitive function in schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Schizophr Res.** v.95, n.1-3, p.158-68, 2007.

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.

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.

Tanahashi, S.; Yamamura, S.; Nakagawa, M.; Motomura, E.; Okada, M. Dopamine D₂ and serotonin 5-HT_{1A} receptors mediate the actions of aripiprazole in mesocortical and mesoaccumbens transmission, **Neuropharmacology**, v.62, p.765–774, 2012.

Teuchert-Noodt, G.; Dawirs, R. R.; Hildebrandt, K. Adult treatment with methamphetamine transiently decreases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus. **J Neural Transm (Vienna)**. v.107, n.2, p.133-43, 2000.

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

TSOU, K. et al. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. **Neuroscience**, v. 83, n. 2, p. 393-411, 1998.

TZAVARA, ET.; LI, DL.; MOUTSIMILLI, L.; BISOGNO, T.; DI MARZO, V.; PHEBUS, L. A.; NOMIKOS, G. G.; GIROS, B. Endocannabinoids activate transient receptor potential vanilloid 1 receptors to reduce hyperdopaminergia-related hyperactivity: therapeutic implications. **Biol Psychiatry**. v.59, n.6, p.508-15, 2006.

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

ZAMBERLETTI, E.; VIGANO, D.; GUIDALI, C.; RUBINO, T.; PAROLARO, D. Long-lasting recovery of psychotic-like symptoms in isolation-reared rats after chronic but not acute treatment with the cannabinoid antagonist AM251. **Int J Neuropsychopharmacol**. v.15, n.2, p.267-80, 2012.

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.

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.; 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.; 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.; 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. 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.; 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.

WEICKERT, T.W.; GOLDBERG, T.E.; GOLD, J.M.; BIGELOW, L.B.; EGAN, M.F.; WEINBERGER, D.R.; Cognitive impairments in patients with schizophrenia displaying preserved and compromised intellect. **Arch Gen Psychiatry**, v.57, n.9, p.907-13, 2000.

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.; 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.

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

