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

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROPLÁSTICOS DA COMBINAÇÃO DE
ESCITALOPRAM E CANABINÓIDES**

FRANCIELE FRANCO SCARANTE

RIBEIRÃO PRETO
2018

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

FRANCIELE FRANCO SCARANTE

**Efeitos comportamentais e neuroplásticos da combinação de escitalopram e
canabinóides**

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^a Dr^a Aline Cristina de Campos.

RIBEIRÃO PRETO
2018

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

Scarante, Franciele Franco

Efeitos comportamentais e neuroplásticos da combinação de
escitalopram e canabinóides. Ribeirão Preto, 2018.

180 p.: il. ; 30 cm

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

Orientador: Campos, Aline Cristina de.

1. Escitalopram. 2. Canabidiol. 3. URB597. 4. Estresse. 5.
Antidepressivo. 6. Ansiolítico. 7. Neuroplasticidade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SCARANTE, Franciele Franco

Título: Efeitos comportamentais e neuroplásticos da combinação de escitalopram e canabinóides.

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

Aprovado em: ____/____/ 2018

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Alline Cristina de Campos

FMRP/USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Membro 1: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Membro 2: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Membro 3: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

*Aos meus pais pelo apoio, às minhas
irmãs pela inspiração e aos amigos por
serem pessoas tão iluminadas.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por estarem sempre comigo a cada novo desafio. Sem o seu incentivo, esse trabalho nunca teria sido possível.

Às minhas irmãs, Aline e Patrícia, por serem sempre tão incríveis. A admiração que eu sinto por vocês me motiva a seguir em frente.

À minha família, especialmente meus avós, por ajudarem na minha formação e me apoiarem a todo momento.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Alline Campos, por ser tão brilhante, determinada e inspiradora. É impressionante o que você contruiu em tão pouco tempo e me sinto honrada por fazer parte disso de alguma forma. Tenho muito respeito e admiração por você, como orientadora e como pessoa. Obrigada pelos seus valiosos ensinamentos e pela paciência e dedicação para orientar uma aprendiz de pesquisadora.

Aos colegas que estão ou já estiveram no laboratório: Eduardo, Rafael, Gabriel, Melissa, Mariana, Davi, Paula, Erika, Jordan, Maria Adrielle, Cláudia e Vinícius. Agradeço a todos pelas contribuições técnicas e pelas produtivas discussões científicas. Todos contribuíram, de alguma forma, para que esse trabalho fosse possível. Muito obrigada!

Ao doutorando Rafael por fornecer os dados sobre os efeitos do escitalopram em camundongos estressados por 21 dias no modelo de estresse crônico imprevisível. Obrigada, Rafa, por ser esse ser humano tão iluminado. É uma honra conviver com você e presenciar um pouquinho dessa sua luz. Você é, sim, muita coisa na fila do pão.

Ao mestrando Eduardo, pela parceria desde que eu entrei no laboratório. Obrigada pela consultoria técnica para realização das análises moleculares e por aturar minhas

constantemente crises de insegurança no laboratório e na vida. Você é um dos melhores seres humanos que eu já conheci, muito obrigada por tudo!

Ao doutorando Gabriel, obrigada por trazer o seu brilhantismo e gingado carioca para o laboratório. Obrigada por toda a ajuda na escrita da dissertação e pelo *happy hour* de açaí que você implementou no laboratório.

A mestrande Melissa, obrigada por trazer essa alegria e esse espírito “vózinha” para o nosso laboratório. Eu posso não deixar você me abraçar, mas gosto muito de ti.

À Maria Adrielle e sua pequena Mariana, obrigada por sempre nos apoiar durante o (sempre difícil) processo de iniciar um laboratório. Obrigada por sua doçura e compreensão, Mamãe Dri.

Aos ICs mais lindos, Mariana, Paula, Davi (agora mestrando) e Jordan, por toda a disposição e o interesse em aprender. Vocês são maravilhosos.

Ao Prof. Dr. Francisco Guimarães, pelos valiosos ensinamentos e discussões científicas e por gentilmente fornecer o espaço físico do seu laboratório para a realização dos nossos experimentos. Obrigada por dividir um pouco de suas experiências científicas e culturais, é sempre uma honra ouvir suas histórias e suas dicas sobre filmes, música, viagens e fotografia.

Às alunas do laboratório do professor Guimarães: Alice, Andreza, Carla, Naielly, Nicole, Sabrina, às alunas de iniciação científica e ao técnico Marquinhos. Obrigada pelas contribuições técnicas e intelectuais, pela disponibilidade e paciência, mesmo quando eu precisava ocupar o laboratório de vocês para fazer meus experimentos. Agradeço, ainda, por serem as primeiras pessoas a me acolherem em Ribeirão Preto, principalmente Naielly, Nicole, Alice e Andreza. Agradecimento especial a Naielly, essa mulher empoderada e inspiradora que eu tenho a honra de chamar de amiga (e

que tem os gatos mais fofos do universo), e a Vanda, essa sergipana arretada que em pouco tempo ganhou para sempre nossos corações.

Aos amigos que Ribeirão Preto me trouxe, por serem a base que me sustenta. Vocês me ensinam todos os dias que a amizade é a maior preciosidade que alguém pode ter na vida. Muito obrigada a todos vocês!

À Kelin, por toda força e parceria. Passamos por tantas aventuras juntas e nessa aventura, mesmo a quilômetros de distância, você pode ter certeza que você sempre esteve comigo. Muito obrigada por tudo, tenho muito orgulho de ter como amiga!

À Camila, por todo o incentivo. Nossos passos podem ter tomado direções distintas, mas você será sempre a pessoa que iniciou comigo essa jornada pela farmacologia e eu me sinto muito honrada por isso. Muito obrigada por tudo, você sempre será uma inspiração!

À Eleni, pelo apoio técnico para processamento dos tecidos para as análises histológicas;

À Ramon e Gislaine, pela paciência e pela disponibilidade e eficiência para me ajudar sempre que necessário.

A todos os funcionários e técnicos do departamento de Farmacologia pela importante ajuda na execução desse trabalho.

A todos os professores do departamento de Farmacologia, que, durante disciplinas, bancas, palestras ou discussões científicas se mostram sempre brilhantes e inspiradores.

Ao Laboratório da Prof^a Dr^a Rita Tostes, por disponibilizar o fotodocumentador para realizar a leitura dos dados moleculares.

Às pessoas que me ajudaram nos primeiros passos na carreira acadêmica e que me inspiraram a seguir em frente, especialmente a Prof^a Dr^a Joice Maria da Cunha, da

Universidade Federal do Paraná (UFPR), e aos membros do laboratório de farmacologia da dor, e ao Prof. Dr. Marcelo de Meira Santos Lima e aos membros do laboratório de neurofisiologia da UFPR. Obrigada, ainda, a todos os colegas da primeira turma de Biomedicina de UFPR.

Ao Prof. Dr. Francisco Fernandes de Miguel e a todos os membros de seu laboratório por me acolher e orientar no mês de setembro de 2017 durante estágio realizado na Divisão de Neurociências do Instituto de Fisiologia Celular da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM).

A Prof^a Dr^a Elaine Del Bel por fornecer o auxílio financeiro, junto a *International Brain Research Organization*, para a viagem para o estágio realizado na UNAM;

Aos membros da banca, pela disponibilidade, pelo tempo dedicado e pelas brilhantes contribuições.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto L'Oreal pelo apoio financeiro.

“Science has taught me that everything is more complicated than we first assume, and that being able to derive happiness from discovery is a recipe for a beautiful life.”

Hope Jahren, *Lab Girl*.

RESUMO

RESUMO

SCARANTE, F. F. **Efeitos comportamentais e neuroplásticos da combinação de escitalopram e canabinóides**. 2018. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Antidepressivos clássicos apresentam uma série de limitações na prática clínica, sendo uma das mais relevantes a latência de 4 a 8 semanas para indução de uma melhora significativa dos sintomas. Existem evidências que canabinóides, como o fitocanabinóide canabidiol (CBD) e o inibidor de degradação da anandamida URB597 (URB) geram efeitos comportamentais semelhantes aos antidepressivos. Canabinóides e antidepressivos podem, inclusive, apresentar mecanismos moleculares em comum. O presente estudo investigou os efeitos comportamentais e neuroplásticos de uma semana de tratamento com a combinação de uma dose do antidepressivo escitalopram (ESC) que gera efeitos comportamentais após 3 semanas de tratamento com doses sub-efetivas de canabinóides em camundongos estressados. Para isso, camundongos C57Bl6 machos foram submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível (CUS) ou ao protocolo de estresse de derrota social (SDS) por 10 dias. Os animais foram divididos em 7 grupos experimentais (n=8-13; Controle (Não estressado); Veículo (Veí/Veí); ESC 10mg/kg (Esc/Veí); CBD 7,5 mg/kg (Veí/CBD); URB 0,1 mg/kg (Veí/CBD); ESC/CBD; ESC/URB) e foram tratados durante os 7 últimos dias do protocolo de estresse (via i.p.). O tratamento com a combinação de escitalopram e CBD gerou respostas preditivas de um efeito do tipo-antidepressivo no teste de suspensão pela cauda e de um efeito do tipo-ansiolítico no *novelty suppressed feeding* tanto no modelo de estresse homotípico (SDS) quanto no modelo de estresse heterotípico (CUS). Paralelamente às alterações comportamentais, foi observado que o grupo ESC/CBD apresentou uma maior expressão relativa de sinaptofisina no córtex pré-frontal, evidenciando um possível efeito pró-sinaptogênico da combinação. Esse mesmo tratamento promoveu aumento na expressão de sinaptotagmina e β -actina no hipocampo. Os resultados encontrados no presente estudo evidenciam que a combinação com CBD pode otimizar a ação do antidepressivo escitalopram.

Palavras-chave: escitalopram, canabidiol, URB597, estresse, antidepressivo, ansiolítico, neuroplasticidade.

ABSTRACT

ABSTRACT

SCARANTE, F. F. **Behavioral and neuroplastic effects of the combination of escitalopram and cannabinoids**. 2018. Dissertation (Master). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Despite their widespread use, antidepressant drugs show some limitations in the clinical practice, including a delayed onset of action. Cannabinoid drugs, such as cannabidiol (CBD) and the anandamide degradation inhibitor URB597 (URB), have shown behavioral effects that are similar to those induced by antidepressants in pre-clinical studies. Antidepressants and cannabinoids might even share common mechanisms. This study aimed to evaluate the behavioral and neuroplastic effects of one week of treatment of stressed animals with the combination of sub-effective doses of cannabinoids with 10mg/Kg of escitalopram (ESC)- dose that prevented- stress-induced behavioural changes only after 3 weeks of treatment. Male C57Bl6 mice were subjected to a 10-day protocol of either social defeat stress (SDS) or chronic unpredictable stress (CUS). Animals were divided in 7 experimental groups (n=8-13; Control (Non-stressed); Vehicle (Veh/Veh); ESC 10mg/kg (Esc/Veh); CBD 7,5mg/kg (Veh/CBD); URB 0,1mg/kg (Veh/CBD); ESC/CBD; ESC/URB) and the treatment was conducted during the 7 last days of the stress protocol (via i.p.). The treatment with the combination of ESC and CBD produced responses that are considered predictive of antidepressant-like effects in the tail suspension test and of anxiolytic-like effects in the novelty suppressed feeding in both the homotypic stress (SDS) and the heterotypic stress (CUS) models. In parallel with the behavioral outcomes, molecular analysis revealed that the ESC/CBD group showed a higher relative expression of synaptophysin in the PFC, suggesting a pro-synaptogenic effect of the combination. Increased relative expression of synaptotagmin and β -actin in the hippocampus following ESC/CBD treatment were also reported. The results presented in this study provide evidence that the combination with CBD can optimize the action of the antidepressant escitalopram.

Key-words: escitalopram, cannabidiol, URB597, stress, antidepressive, anxiolytic, neuroplasticity.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. Introdução	17
1.1. Transtornos mentais e estresse	18
1.2. Antidepressivos: Breve histórico	21
1.3. Antidepressivos: Usos e limitações	24
1.4. Mecanismos de ação de antidepressivos: Além da hipótese monoaminérgica	30
1.5. Neuroplasticidade e ação de antidepressivos	32
1.6. Sistema endocanabinóide e canabinóides: Efeitos comportamentais e neuroplásticos	38
1.7. Antidepressivos, sistema endocanabinóide e canabinóides	43
1.8. Hipótese	46
2. Objetivos	48
2.1. Objetivo geral	49
2.2. Objetivos específicos	49
3. Materiais e Métodos	50
3.1. Animais	51
3.2. Drogas	51
3.3. Estresse de derrota social (<i>Social defeat stress, SDS</i>)	51
3.4. Estresse crônico imprevisível (<i>Chronic unpredictable stress, CUS</i>)	51
3.5. Testes comportamentais	52
3.5.1. <i>Novelty suppressed feeding (NSF)</i>	52
3.5.2. Teste de suspensão pela cauda (<i>Tail suspension test - TST</i>)	52
3.5.3. <i>Open field (OF)</i>	53
3.6. <i>Western blot</i>	53
3.7. Técnica de Golgi	55
3.8. Procedimentos experimentais	56
3.8.1. Caracterização dos efeitos comportamentais do escitalopram em camundongos cronicamente estressados	56
3.8.2. Quais são os efeitos comportamentais da combinação de escitalopram com canabinóides no modelo de estresse de derrota social	57
3.8.3. Quais são os efeitos comportamentais da combinação de escitalopram no modelo de estresse crônico imprevisível	58
3.8.4. Quais são os efeitos neuroplásticos da combinação de escitalopram e camundongos em camundongos cronicamente estressados	59
3.9. Análise estatística	60
4. Resultados	61
4.1. Análises comportamentais	62

4.1.1. O tratamento por 21, mas não por 7 dias, com escitalopram altera as respostas comportamentais de animais estressados	62
4.1.2. A combinação de escitalopram e CBD reduz o comportamento passivo de enfrentamento de animais estressados após 7 dias de tratamento	70
4.1.3. A combinação de escitalopram e CBD reduz a resposta de hiponeofagia em camundongos estressados.....	78
4.1.4. Os efeitos comportamentais da combinação de escitalopram e canabinóides não estão relacionados a alterações locomotoras	83
4.2. Efeitos neuroplásticos	85
4.2.1. Efeitos sobre plasticidade sináptica: Expressão de proteínas vesiculares	85
4.2.2. Efeitos sobre plasticidade sináptica: PSD95, BDNF e β -actina.....	92
4.2.3. Efeitos sobre plasticidade sináptica: Espinhos dendríticos	98
5. Discussão	101
6. Conclusão.....	127
7. Referências.....	129

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Transtornos mentais e estresse

O estudo da Carga Global de Doenças de 2016, fornecido pelo Instituto de Métricas e Avaliação da Saúde, indicou que transtornos mentais são a principal causa de anos vividos com incapacidade (AVI). A Depressão Maior e os transtornos de ansiedade contribuem de maneira significativa para essa estatística, contabilizando, respectivamente, 5,49% e 3,29% dos AVI. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que existam 322 milhões de pessoas sofrendo de Depressão e 264 milhões de pessoas com algum tipo de transtorno de ansiedade.

A problemática sobre transtornos psiquiátricos é ainda mais fortalecida pela negligência demonstrada em políticas públicas e em sistemas de saúde (VIGO; THORNICROFT; ATUN, 2016). Segundo a OMS, em países de baixa e média renda, estima-se que 76 a 85% dos indivíduos com transtornos psiquiátricos severos não recebam tratamento algum. Isso pode estar relacionado aos estigmas sociais que ainda cercam a visão sobre esses transtornos (HENDERSON et al., 2014; LASALVIA et al., 2013).

Apesar de a maioria dos transtornos mentais serem idiopáticos, alguns fatores podem contribuir para a manifestação dos seus sintomas. Dentre esses fatores, o estresse não-adaptativo é reconhecido como um agente precipitador de transtornos mentais em indivíduos susceptíveis (SCHLESS et al., 1977). Estima-se que indivíduos com Depressão Maior apresentam uma chance 2,5 vezes maior de ter passado por um evento estressor em comparação a indivíduos saudáveis e 80% dos casos de Depressão Maior são precedidos por um estresse severo (MAZURE, 1998).

A exposição ao estresse desafia a manutenção da homeostase (do grego, *homeo* = igual, *stasis* = estabilidade; ou seja, a estabilidade ou equilíbrio) do

organismo (MCEWEN, 1998; MCEWEN; WINGFIELD, 2010; RAMSAY; WOODS, 2014; ROMERO; DICKENS; CYR, 2009). Nesse sentido, a relação entre estresse e psiquiatria é evidenciada pelo importante papel do cérebro em coordenar as respostas a estímulos estressores, o que parece essencial para a alostase (do grego, *allos* = variável, *stasis*= estabilidade; ou seja, a manutenção da estabilidade do organismo através da variabilidade ou adaptabilidade) do organismo. Essa alostase compreende um processo ativo de recrutamento de respostas neuroendócricas, imunes, autonômicas, metabólicas e de diversas vias de transdução de sinal que orquestram a adaptação aos estímulos estressores, possibilitando um enfrentamento adequado frente a uma situação de estresse (MCEWEN, 2013; MCEWEN et al., 2015; MCEWEN; GRAY; NASCA, 2015).

O estresse pode ser classificado como “bom”, “tolerável” ou “tóxico”. O estresse bom está associado a um desafio que leva a uma melhora do desempenho do indivíduo. O estresse tolerável causa desconforto, mas o cérebro saudável é capaz de se adaptar a essa situação. Já o estresse tóxico caracteriza-se por não induzir uma resposta alostática apropriada, ou seja, o cérebro não é capaz de gerar respostas que permitam o melhor enfrentamento frente ao estímulo estressor. O estresse tóxico pode ser resultado de uma desregulação ou sobregarga da resposta alostática e pode levar a respostas maladaptativas que podem contribuir para a fisiopatologia de transtornos mentais (MCEWEN, 2017; MCEWEN et al., 2015).

Em modelos animais, a exposição ao estresse é capaz de gerar alterações tanto em respostas comportamentais quanto em respostas fisiopatológicas. Testes comportamentais, fomentados por suas validades preditivas, de face ou de constructo, permitem a avaliação de respostas afetivas, defensivas, cognitivas e de recompensa que podem ser relacionados a comportamentos que experimentalmente são

extrapolados para o contexto da sintomatologia de transtornos psiquiátricos. Isso faz com que a exposição ao estresse aliada a testes comportamentais adequados forneça uma importante ferramenta experimental na complexa tarefa de modelar comportamentos que possam, ainda que de maneira preditiva, relacionar-se a prática clínica (CAMPOS et al., 2013a; KRISHNAN; NESTLER, 2011; NESTLER; HYMAN, 2010). Animais estressados usualmente manifestam, dentre outras respostas, uma redução de estratégias ativas de enfrentamento frente a um desafio comportamental agudo (expressa em testes como nado forçado ou suspensão pela cauda), um comportamento do tipo-anedônico (manifestado através da redução da preferência por soluções adocicadas) e um aumento de respostas comportamentais geradas por componentes aversivos em testes de conflito (CAMPOS et al., 2013a; KRISHNAN; NESTLER, 2011; NESTLER; HYMAN, 2010; WILLNER et al., 1987; WILLNER; MUSCAT; PAPP, 1992). Por exemplo, no conflito entre aversão por um ambiente novo e a fome gerada por jejum no teste de *novelty suppressed feeding*, a exposição ao estresse tende a facilitar a aversão pelo ambiente novo, exacerbando a hipofagia induzida por neofobia (CAMPOS et al., 2013a). Já as respostas fisiopatológicas geradas pelo estresse em modelos animais incluem, dentre outras, alterações de peso, sono e desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Alterações fisiopatológicas semelhantes são observadas em pacientes com Depressão Maior (MOCKING et al., 2015; XIAO et al., 2018), transtornos de ansiedade (BROWN et al., 2017; LENZE et al., 2011) e transtorno de estresse pós-traumático (RAUCH et al., 2015).

Com relação ao tratamento desses transtornos psiquiátricos, especialmente os associados ao estresse, até os anos 1950 o desconhecimento das bases neurobiológicas e farmacológicas envolvidas nessas patologias tornava obscura a

ideia de encontrar drogas que poderiam, através da atuação em alvos moleculares específicos, ser utilizadas para o tratamento desses transtornos. Isso é demonstrado pela experiência a seguir, relatada pelo Professor Heinz Edgar Lehmann, da Universidade McGill, no Canadá (em uma tradução livre):

Eu me lembro bem de um grupo de estudantes circulando comigo em 1952 no Hospital Protestante Verdun (agora Hospital Douglas) em Montreal. Estávamos olhando dois pacientes esquizofrênicos gesticulando excitadamente em direção ao teto de onde eles ouviam vozes ameaçadoras. Um dos estudantes perguntou sussurrando 'algum dia conseguiremos uma pílula para ajudar essas pessoas?' Eu sorri condescendentemente e respondi que, infelizmente, nunca será tão simples quanto uma simples pílula. (LEHMANN, 1986, p. 01).

Durante as décadas de 50 e 60, entretanto, a ascensão da ciência conhecida como Psicofarmacologia possibilitou uma verdadeira revolução no que diz respeito ao tratamento de transtornos psiquiátricos. Os fármacos que hoje compreendem a classe dos antidepressivos tiveram grande destaque nesse contexto.

1.2. Antidepressivos: Breve histórico

Em 1957, motivados por relatos de que o anti-tuberculostático iproniazida geraria uma resposta de elevação de humor, Loomer e colaboradores testaram tal agente em indivíduos com depressão. Os resultados indicaram uma melhora de 70% dos pacientes tratados (LOOMER; SAUNDERS; KLINE, 1957). Mais ou menos na mesma época, derivados anti-histamínicos eram testados quanto ao seu potencial antipsicótico. Um desses derivados, posteriormente conhecido como imipramina,

apesar de não melhorar os sintomas de psicose, gerava uma melhora do humor deprimido de pacientes com transtornos esquizoafetivos (KUHN, 1958).

Em 1952, Zeller descreveu a ação da iproniazida como um inibidor da monoamina oxidase (MAO), enzima que degrada monoaminas (ZELLER; BARSKY, 1952). Já na década de 60, estudos desenvolvidos por Julius Axelrod caracterizaram a imipramina como um inibidor da recaptação de catecolaminas (AXELROD, 1964, 1971; AXELROD; HERTTING; POTTER, 1962; AXELROD; WHITBY; HERTTING, 1961; GLOWINSKI; AXELROD, 1964; HERTTING; AXELROD, 1961). Esses achados evidenciam uma constante observada nos estudos iniciais sobre antidepressivos: a relação entre essa classe de fármacos e a transmissão monoaminérgica. Outras evidências se destacam nesse contexto, como a observação de que a reserpina desencadeia episódios de depressão e que suas ações centrais envolvem uma depleção dos níveis de catecolaminas (PLETSCHER; SHORE; BRODIE, 1956; SHORE et al., 1957). Ademais, encéfalos de pacientes com depressão que haviam cometido suicídio apresentaram níveis de serotonina (5-HT) significativamente reduzidos (SHAW; CAMPS; ECCLESTON, 1967). Esse contexto sustentou o fortalecimento da chamada “hipótese monoaminérgica” da depressão e da ação de antidepressivos. Essa hipótese postula que a fisiopatologia de depressão e a ação antidepressiva de fármacos envolveriam, respectivamente, uma deficiência e um aumento da neurotransmissão monoaminérgica (BUNNEY; DAVIS, 1965; SCHILDKRAUT, 1965), especialmente serotoninérgica (COPPEN, 1967).

A proposição de possíveis aspectos moleculares relacionados à neurobiologia de depressão e ao mecanismo de ação de antidepressivos possibilitou que o desenvolvimento de fármacos dessa classe deixasse de ser baseado no *serendipity* e passasse para o design de drogas com alvos moleculares específicos (LOPEZ-

MUNOZ; ALAMO, 2009; RAMACHANDRAIH et al., 2011). Surgiram, assim, antidepressivos mais seletivos, com destaque para os inibidores da recaptação de 5-HT e noradrenalina, os inibidores da recaptação de noradrenalina e dopamina e, finalmente, os inibidores seletivos da recaptação de 5-HT (ISRS) (RAMACHANDRAIH et al., 2011).

O primeiro ISRS sintetizado foi a fluoxetina, descrita inicialmente em 1974 por Wong e colaboradores como um agente que inibe de modo preferencial a recaptação de 5-HT em detrimento da recaptação de noradrenalina e dopamina (WONG et al., 1974). Alguns anos depois, em 1977, citalopram, derivado do inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina talopram, demonstrou alta seletividade para o transportador de 5-HT em ensaios *in vitro* (CHRISTENSEN, A. V, FJALLAND, B., PEDERSEN, V., DANNESKIOLD-SAMSØE, P., & SVENDSEN, 1977; HYTTEL, 1977). Tal composto foi aprovado para o tratamento de depressão maior em 1989 na Dinamarca em uma formulação que continha seus 2 enantiômeros, R-citalopram e S-citalopram (escitalopram) (SCHATZBERG; NEMEROFF, 2009). Em 1992, Hyttel e colaboradores descreveram que apenas o enantiômero S- seria provido da propriedade de inibição da recaptação de 5-HT (HYTTEL et al., 1992) e estudos subsequentes sugeriram que o enantiômero R- poderia, inclusive, antagonizar os efeitos do enantiômero S- (EL MANSARI et al., 2005, 2007; FISH, 2003; MNIE-FILALI et al., 2007; MØRK; KREILGAARD; SÁNCHEZ, 2003). Em 2002, a formulação contendo apenas o enantiômero S-, o escitalopram, foi aprovado para o tratamento de Depressão Maior (SCHATZBERG; NEMEROFF, 2009). Cipriani e colaboradores (2009), ao comparar 12 fármacos antidepressivos, demonstrou que o escitalopram foi um dos que apresentou um melhor perfil de aceitabilidade e responsividade na prática clínica.

1.3. Antidepressivos: Usos e limitações

A Associação Americana de Psiquiatria e as diretrizes da Federação Mundial das Sociedades de Psiquiatria Biológica estabelecem fármacos antidepressivos, especialmente ISRS, como tratamento de primeira escolha ou tratamento adjunto para transtornos como: depressão maior, depressão pós-parto, transtorno de ansiedade generalizada, agorafobia, transtorno de ansiedade social, transtorno do pânico, transtorno de estresse pós-traumático, transtornos alimentares e transtorno obsessivo compulsivo. A Tabela 1 descreve algumas características observadas em estudos clínicos frente ao tratamento com ISRS nos diferentes transtornos.

Tabela 1. ISRS na Clínica						
TRANSTORNO	INDICAÇÃO	LATÊNCIA	RESPOSTA	REMISSÃO	RECIDIVA	OBS
Depressão Maior	Primeira escolha	4-8 semanas	40-60% de pacientes responsivos	35-45% (PIERZ; THASE, 2014; THASE; ENTSUAH; RUDOLPH, 1999)	11-25%	Pacientes com transtorno de ansiedade concomitante podem demorar ainda mais para começar a responder ao tratamento (10-12 semanas)
Transtorno de Ansiedade Generalizada	Primeira escolha	2-4 semanas (dependendo do caso, de 6 a 8)	50-60% de pacientes responsivos	30-50% (RICKELS et al., 2006)	12-20% (BATELAAN et al., 2017)	
Transtorno de estresse pós-traumático	Primeira escolha	6-12 semanas de tratamento (MARSHALL et al., 2007; STEIN et al., 2006, 2015)	Fluoxetina e Sertralina tiveram sua efetividade comprovada na clínica após uso continuado (entre 12 e	23-26% (DAVIDSON, 2004)	5-25% (DAVIS et al., 2006)	Pacientes com transtorno relacionado a situações de combate não respondem bem ao

			24 meses) (BANDELO W et al., 2012)			tratamento (BENEDEK et al., 2009)
Bulimia nervosa	Tratamento inicial	1 semana (GOLDSTEIN et al., 1995)	Variável (AIGNER et al., 2011; YAGER et al., 2012)		19% (GOLDSTEI N et al., 1995)	
Transtorno obsessivo compulsivo	Primeira escolha	8-12 semanas (PITTENGER; BLOCH, 2014)	40-70% de pacientes responsivos (JANARDH AN REDDY et al., 2017)	10-40% (JANARDHAN REDDY et al., 2017)	9-42% (FINEBERG et al., 2007)	Citalopram normalment e não é indicado em razão das altas doses requeridas (KORAN; SIMPSON, 2013)
Transtorno de pânico e agorafobia	Primeira escolha	4-6 semanas (MARCHESI, 2008)	43-86% (PULL; DAMSA, 2008)	18-80% (DAVIDSON, 1998)	14-78% (BIONDI; PICARDI, 2003; PULL; DAMSA, 2008)	
Transtorno de ansiedade social	Primeira escolha	4-12 semanas (SCHNEIER, 2011)	43-70% (BLANCO; ANTIA; LIEBOWITZ , 2002)	50% (PELISSOLO; MOUKHEIBE R, 2013)	25-50% (BLANCO; ANTIA; LIEBOWITZ, 2002; SCHNEIER, 2011)	

Baseado nas características descritas na tabela 1, pode-se notar que, apesar de amplamente prescritos, antidepressivos apresentam algumas limitações na prática clínica. Entre 40 a 50% dos pacientes diagnosticados com depressão maior ou transtorno de ansiedade generalizada não respondem ao tratamento. Além disso, as taxas de remissão dos sintomas raramente ultrapassam os 50% para quase todos os transtornos supracitados. Adicionalmente, a ocorrência frequente de efeitos colaterais como os listados na Tabela 2 pode prejudicar a aderência dos pacientes ao tratamento.

Tabela 2. Efeitos colaterais de ISRS	
TIPO	EFEITO COLATERAL
Gastrointestinal	Náusea
	Vômito
	Diarreia
	Sangramento gastrointestinal
Neurológico	Dores de cabeça
	Ativação
	Ansiedade
	Insônia
	Sonolência
	Sedação
	Efeitos extrapiramidais
Disfunção sexual	Tontura
	Disfunção erétil
	Disfunção na ejaculação
	Perda da libido
Outros	Anorgasmia
	Acatisia
	Bruxismo
	Diaforese
	Risco de quedas
	Fadiga
	Osteopenia
	Ganho de peso
	Síndrome serotoninérgica
	Interações medicamentosas
	Síndrome de retirada

Dados baseados em: Gelenberg AJ et al. *Practice Guideline for the treatment of patients with major depressive disorder*. 3ª edição. American Psychiatric Association, 2010.

Entretanto, uma das limitações mais marcantes do tratamento com os antidepressivos é a latência para indução de uma melhora clínica. Para todos os transtornos para os quais os ISRS são indicados como abordagem farmacológica de primeira escolha, o tratamento deve ser realizado por mais de 2 semanas até que seja observado um efeito significativo do tratamento. Essa latência pode chegar a 12 semanas, dependendo do transtorno.

As limitações dessa classe de fármacos tão amplamente utilizada no contexto de psicofarmacologia evidencia a necessidade de se buscar alternativas que permitam uma otimização da ação de ISRS, principalmente no que diz respeito ao tempo de latência para remissão dos sintomas. Isso passa pelo melhor entendimento dos

mecanismos aos quais pode ser atribuída essa efetividade tardia de antidepressivos. Nesse sentido, estudos pré-clínicos são essenciais para a melhor caracterização das consequências comportamentais e moleculares do tratamento com fármacos dessa classe.

Conforme abordado no tópico 1.1, a exposição ao estresse aliada a testes comportamentais adequados é uma forma de modelar respostas que podem, ainda que muitas vezes de maneira correlata, ser associadas a determinados sintomas na prática clínica. Como descrito na tabela 3, diversos estudos indicam que o tratamento com antidepressivos é capaz de reverter ou prevenir as consequências comportamentais do estresse em modelos animais. Os efeitos, entretanto, comumente só são observados após um tratamento continuado, por 2 semanas ou mais. Ou seja, o efeito de antidepressivos em modelos animais baseados na exposição ao estresse crônico mimetiza o padrão de resposta observado na prática clínica, com uma latência considerável até que a efetividade do tratamento seja observada.

Tabela 3. Efeitos comportamentais de ISRS em modelos animais de estresse					
FÁRMACO	MODELO	TESTE	TEMPO	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
Escitalopram	Ratos submetidos a 8 semanas de CMS.	Preferência por sacarose.	4 e 8 semanas.	O tratamento com escitalopram (5 mg/kg) reduziu a resposta do tipo-anedônica de aproximadamente 50% dos animais estressados.	(NIETO-GONZALEZ et al., 2015)
Fluoxetina	Ratos submetidos a 6 semanas de CMS.	Preferência por sacarose, nado forçado e <i>novelty suppressed feeding</i> .	2 semanas.	O tratamento com fluoxetina (10 mg/kg) reduziu as consequências comportamentais da exposição ao estresse crônico em todos os testes comportamentais empregados.	(BESSA et al., 2008)

Fluoxetina	Ratos submetidos a 4 meses de CMS.	Preferência por sacarose e nado forçado.	4 meses.	O tratamento com fluoxetina aumentou a preferência por sacarose e reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em ratos estressados.	(LU et al., 2017)
Escitalopram	Camundongos expostos a 4 semanas de CUS.	Preferência por etanol e por sacarose.	4 semanas.	Escitalopram (30mg/kg) aumentou tanto a preferência por etanol quanto por sacarose em animais estressados.	(BURSTEIN et al., 2017)
Fluvoxamina	Camundongos expostos ao modelo de desespero comportamental crônico por 5 dias.	Nado forçado e teste de suspensão pela cauda.	25 dias.	Fluvoxamina (30mg/kg) reduziu a resposta passiva de enfrentamento de animais estressados quando expostos tanto ao nado forçado quanto ao teste de suspensão pela cauda.	(NORMANN et al., 2017)
Fluoxetina	Ratos expostos a um protocolo de SDS.	Reconhecimento de objetos e medo condicionado.	30 dias	Fluoxetina (10mg/kg) aumentou o índice de discriminação no teste de reconhecimento de objetos e reduziu o tempo de <i>freezing</i> na sessão de medo condicionado ao contexto de animais expostos ao SDS.	(GOTTSCHALK et al., 2018)
Citalopram	Ratos expostos a 14 dias de nado forçado.	Preferência por sacarose.	14 dias.	Citalopram (15mg/kg) reduziu o comportamento do tipo-anedônico de animais estressados.	(LIU et al., 2012)
Paroxetina	Camundongos expostos a 3 semanas de SDS.	Labirinto em cruz elevado, campo aberto, teste de nado forçado,	3 semanas.	Paroxetina (20mg/kg) não alterou significativamente a	(WAGNER et al., 2012)

		interação social e <i>female urine sniffing test</i> .		resposta de animais estressados nos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado e no <i>female urine sniffing test</i> . No nado forçado, paroxetina reduziu o comportamento passivo de enfrentamento em camundongos estressados.	
Escitalopram	Ratos expostos a separação materna.	Nado forçado e labirinto aquático de Morris.	1 mês.	Escitalopram (25mg/kg) aumentou a latência para o primeiro episódio de imobilidade e reverteu o déficit de memória de ratos expostos a separação materna.	(COUTO et al., 2012)
Fluoxetina	Camundongos expostos a 7 semanas de CUS.	<i>Splash test</i> , teste de suspensão pela cauda e <i>novelty suppressed feeding test</i> .	5 semanas.	Fluoxetina (15mg/kg) reduziu a resposta do tipo-anedônica dos animais estressados no <i>splash test</i> , reduziu a imobilidade do teste de suspensão pela cauda e reduziu a resposta de hipofagia induzida por neofobia no <i>novelty suppressed feeding</i> .	(MUTLU et al., 2012)
Citalopram	Ratos expostos ao estresse pré-natal (estresse de restrição).	Labirinto em cruz elevado e nado forçado.	38 dias.	Citalopram aumentou a porcentagem de tempo despendido nos braços abertos do labirinto em cruz elevado e reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado	(ZOHAR et al., 2015)

1.4. Mecanismos de ação de antidepressivos: Além da hipótese monoaminérgica

As observações clínicas e pré-clínicas caracterizando as limitações de fármacos antidepressivos, especialmente com relação a sua efetividade tardia, colocam em cheque a atribuição de seus efeitos ao simples aumento da disponibilidade de monoaminas, como proposto pela teoria monoaminérgica. Nesse contexto, estudos buscam a melhor caracterização dos mecanismos que poderiam contribuir para a ação de antidepressivos.

Blier e de Montigny (1994) propuseram que a efetividade tardia de antidepressivos estaria relacionada a complexa dinâmica da neurotransmissão serotoninérgica. Neurônios serotoninérgicos apresentam autorreceptores somatodendríticos e pré-sinápticos que regulam negativamente a liberação de 5-HT. Agudamente, o bloqueio da recaptação de 5-HT por antidepressivos levaria a um aumento discreto e transitório da disponibilidade de neurotransmissor em razão da ativação de receptores serotoninérgicos, especialmente os autorreceptores 5-HT_{1A} somatodendríticos, que inibiriam a liberação de 5-HT por neurônios serotoninérgicos. Por outro lado, cronicamente, haveria uma dessensibilização desses autorreceptores e, dessa forma, o aumento da disponibilidade de 5-HT seria muito mais marcante. Segundo a hipótese proposta nesse estudo, essas adaptações tardias da neurotransmissão serotoninérgica frente a administração crônica de antidepressivos contribuiriam para a efetividade do tratamento.

Duman e colaboradores (1997) propuseram que a inibição da recaptação de 5-HT, a longo prazo, levaria a um aumento do segundo mensageiro adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC), culminando com a ação do fator de transcrição *cAMP response elements binding protein* (CREB), o qual induz a produção de neurotrofinas, especialmente do fator de transcrição derivado do cérebro (BDNF). A ação neurotrófica do BDNF favorecendo a sobrevivência celular e formação de novas sinapses contribuiria, em última instância, para a efetividade de antidepressivos (DUMAN, 2004; DUMAN et al., 2016; DUMAN; LI, 2012; DUMAN; MALBERG; THOME, 1999).

Existe, ainda, a hipótese de que a efetividade de antidepressivos pode estar relacionada a normalização da função do eixo HPA. Evidências indicam que o tratamento crônico com antidepressivos restaura os níveis de cortisol e normaliza a ação do *feedback* negativo exercido por estruturas límbicas, especialmente o hipocampo, sobre a função do eixo HPA (BARDEN, 2004). Outros processos e sistemas também ganham crescente interesse com relação a seu possível envolvimento na ação de antidepressivos. Esses processos incluem mediadores neuroimunes e respostas neuroinflamatórias (GAŁECKI; MOSSAKOWSKA-WÓJCIK; TALAROWSKA, 2018; HODES et al., 2015; KOHLER et al., 2016), modificações na expressão gênica mediadas por mecanismos epigenéticos (MASSART; MONGEAU; LANFUMEY, 2012; MENKE; BINDER, 2014; VIALOU et al., 2013) e alterações na dinâmica da neurotransmissão glutamatérgica (MUSAZZI et al., 2013; SANACORA; TRECCANI; POPOLI, 2012; THOMPSON et al., 2015).

A complexidade clínica de transtornos psiquiátricos provavelmente se reflete em suas bases neurobiológicas e, conseqüentemente, na farmacologia dos antidepressivos. A maioria dos mecanismos supracitados podem ser complementares

e não necessariamente exclusivos. Basicamente todos esses mecanismos envolvem processos, sistemas de neurotransmissão, fatores e vias moleculares que fazem parte ou que afetam um conjunto de fenômenos que constituem o que se entende por neuroplasticidade.

1.5. Neuroplasticidade e ação de antidepressivos

Neuroplasticidade é a capacidade do tecido nervoso de alterar sua estrutura e função frente a demandas comportamentais e fisiológicas. Esse conceito do cérebro como uma estrutura maleável surgiu a partir de estudos do neurocientista espanhol Santiago Ramon y Cajal. Em seu ensaio *The Croonian Lecture – La fine Structure des Centres Nerveux*, defendendo a teoria neuronal em contraponto da teoria reticular (de rede contínua) da estrutura do sistema nervoso, Ramon y Cajal afirmou:

Uma rede contínua pré-estabelecida (...) é algo rígido, imutável, imodificável, o que vai contra o sentimento que temos de que o órgão do pensamento é, dentro de certos limites, maleável e susceptível a aperfeiçoamento. (CAJAL, 1894, p. 6).

A plasticidade do cérebro fornece a esse tecido o dinamismo requerido para que ele desempenhe suas tão complexas funções (SCHAEFER et al., 2017). Os processos que são enquadrados como manifestações de fenômenos neuroplásticos incluem respostas neuroquímicas que alteram a função sináptica (aumento ou redução do número de receptores, alterações na maquinaria de liberação de neurotransmissores, alterações de estabilidade sináptica, entre outros), sinaptogênese (formação de novos contatos sinápticos), modificações na morfologia dendrítica (tanto de arborização dendrítica quanto variações no número e morfologia

de espinhos dendríticos), gliogênese e neurogênese (geração de novos neurônios em nichos neurogênicos do cérebro adulto) (BRUEL-JUNGEMAN; DAVIS; LAROCHE, 2007). Esse conjunto de respostas neuroplásticas são finamente reguladas por uma série de vias intracelulares, processos metabólicos, mecanismos epigenéticos, moduladores endócrinos, mediadores neuroimunes, fatores neurotróficos e sistemas de neurotransmissão e neuromodulação, dentre outros (CHENG; HOU; MATTSON, 2010; FASS et al., 2014; MATTSON et al., 2018; TARDITO et al., 2006).

A propriedade de neuroplasticidade é essencial para a homeostase do tecido nervoso. Entretanto, respostas neuroplásticas maladaptativas podem ocorrer frente a uma situação de carga alostática (MCEWEN, 2000a, 2000b, 2017; MCEWEN; GIANAROS, 2011; MCEWEN; MORRISON, 2013). Isso é evidenciado em modelos animais baseados na exposição ao estresse crônico, nos quais alterações maladaptativas são observadas em diferentes regiões cerebrais, principalmente em estruturas particularmente relevantes para o controle de respostas afetivas e de comportamento defensivo, como hipocampo, núcleo *accumbens*, córtex pré-frontal e amígdala (MCEWEN; GIANAROS, 2011).

As manifestações neuroplásticas maladaptativas descritas em condições de estresse crônico em modelos animais incluem atrofia da arborização dendrítica e redução do número de espinhos dendríticos de neurônios piramidais da região CA3 e de neurônios piramidais das camadas II e III do córtex pré-frontal medial (CHEN et al., 2008; COOK; WELLMAN, 2004; HAINS et al., 2009; MAGARIÑOS et al., 1996; MAGARIÑOS; MCEWEN, 1995; RADLEY et al., 2006; WATANABE; GOULD; MCEWEN, 1992), prejuízo na indução de potenciação de longo prazo (*long-term potentiation*, LTP) na via perforante, nos colaterais de Schaffer e na via hipocampo-córtex pré-frontal (CERQUEIRA et al., 2007; FOY et al., 1987; KIM; FOY;

THOMPSON, 1996; MCEWEN, 1999; SHORS; DRYVER, 1994; SHORS; SERVATIUS, 1995), facilitação do fenômeno de depressão de longo prazo (*long-term depression*, LTD) nos colaterais de Schaffer (KIM; FOY; THOMPSON, 1996), redução nos níveis de fatores neurotróficos como BDNF (HASHIKAWA et al., 2015; THAKARE et al., 2017; VAN BOXELAERE et al., 2017; ZU et al., 2017), diminuição na expressão de proteínas de estabilidade sináptica, como PSD95 (ZHAO et al., 2017), alterações na maquinaria de liberação de neurotransmissores (MÜLLER et al., 2011; THOME et al., 2001; ZHAO et al., 2017), alteração na expressão e função de receptores, incluindo receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA (WEI et al., 2016; YUEN; WEI; YAN, 2017) e déficit de proliferação, diferenciação e sobrevivência celular no processo de neurogênese hipocampal adulta (CZÉH et al., 2002; GOULD et al., 1997; HEINE et al., 2004; PHAM et al., 2003). A Figura 1 resume alguns dos efeitos neuroplásticos do estresse.

ESTRESSE

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

- Redução da arborização dendrítica de neurônios hipocampais e corticais
- Redução do número de espinhos dendríticos em neurônios hipocampais e corticais.

ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS

- Redução em proteínas e receptores a nível pós-sináptico (receptores AMPA, proteína PSD95);
- Exacerbação da excitotoxicidade mediada por glutamato (via receptores NMDA);
- Alteração na liberação de neurotransmissores e em proteínas pré-sinápticas;
- Déficit de fatores neurotróficos (como BDNF), respostas epigenéticas maladaptativas e alterações em vias que regulam expressão gênica e plasticidade sináptica.

EXCITABILIDADE CELULAR

- Prejuízo na resposta de potenciação de longo prazo (LTP) e facilitação da resposta de depressão de longo prazo (LTD) em vias hipocampais;
- Aumento do input da amígdala para o hipocampo

NEUROGÊNESE ADULTA

- Redução da proliferação, da diferenciação e da sobrevivência de células da camada subgranular do giro denteado do hipocampo.

Figura 1. Alterações neuroplásticas geradas por exposição ao estresse. Estresse altera a morfologia (número de espinhos dendríticos, arborização dendrítica), altera sinapses e fatores que regulam a plasticidade sináptica e outras respostas neuroplásticas (como *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), gera modificações na função e eficiência sinápticas (como evidenciado pela mensuração de fenômenos como *long-term potentiation* – LTP – e *long-term depression* – LTD) e causa prejuízo na neurogênese hipocampal adulta (processo complexo que envolve diferentes etapas – proliferação, *fate specification*, diferenciação, migração e integração sináptica – e diferentes tipos celulares – células do tipo-glia radiais, células progenitoras neurais, neurônios imaturos e neurônios granulares maduros. (Imagens da plataforma *Mind the graph* foram utilizadas para o design dessa figura).

Em humanos, transtornos mentais também são caracterizados por respostas neuroplásticas maladaptativas. Isso é particularmente evidenciado em estudos que avaliaram o volume de diferentes regiões cerebrais em pacientes diagnosticados com transtornos psiquiátricos em comparação a indivíduos saudáveis. Sheline e colaboradores (2003) observaram através de imagens obtidas por ressonância magnética que o volume hipocampal em pacientes diagnosticados com Depressão Maior foi inversamente proporcional ao tempo que o paciente permaneceu sem tratamento. Uma redução do volume hipocampal também foi encontrada em pacientes com transtorno de estresse pós-traumático (BONNE et al., 2008), assim como evidências de que um menor volume do hipocampo poderia contribuir para a susceptibilidade ao desenvolvimento ou a persistência do transtorno (GILBERTSON et al., 2002; VAN ROOIJ et al., 2015). Além disso, estudos de neuroimagem funcional indicam que os padrões de conectividade são distintos em transtornos como Depressão Maior, transtorno de ansiedade social, transtorno de ansiedade generalizada, entre outros (ETKIN et al., 2009; HAHN et al., 2011; KIM et al., 2011; PRATER et al., 2013; VEER, 2010; ZENG et al., 2012; ZHANG et al., 2011).

Os efeitos neuroplásticos de antidepressivos são, em geral, opostos aos observados frente a exposição ao estresse. Estudos sugerem que o tratamento com antidepressivos induz um aumento da neurogênese hipocampal (MALBERG et al., 2000), favorecimento da resposta de LTP na via hipocampo-cortex pré-frontal

(OHASHI et al., 2002), aumento de espinhos dendríticos em neurônios piramidais hipocampais (HAJSZAN; MACLUSKY; LERANTH, 2005) e estímulo de vias neurotróficas (D'SA; DUMAN, 2002; TARDITO et al., 2006). Além disso, Normann e colaboradores (2017) mostraram que o tratamento com fluvoxamina por 25 dias preveniu a facilitação do fenômeno de LTD na região CA1 gerado por exposição a 5 dias de nado forçado. Li e colaboradores (2015), por sua vez, encontraram que ratos submetidos ao estresse crônico moderado por 8 semanas apresentaram alterações na morfologia dos terminais sinápticos e na expressão de proteínas associadas a funções sinápticas e o tratamento com escitalopram por 28 dias contrapôs a maior parte desses efeitos do estresse sobre a plasticidade sináptica. Outras respostas neuroplásticas geradas por estresse e revertidas ou prevenidas pelo tratamento crônico com antidepressivos incluem déficit no processo de neurogênese hipocampal (JAYATISSA et al., 2006, 2008; SANTARELLI et al., 2003), alterações em mecanismos neurotróficos (LAIFENFELD et al., 2005; SCHULTE-HERBRÜGGEN et al., 2009) e em vias associadas ao controle de respostas neuroplásticas (SEO et al., 2017). Ou seja, antidepressivos contrapõem os efeitos neuroplásticos gerados por estresse em um intervalo de tempo condizente com o necessário para observação de efeitos comportamentais.

Portanto, estresse e antidepressivos afetam de forma oposta fenômenos neuroplásticos em diferentes regiões cerebrais. Esses fenômenos neuroplásticos interferem com diferentes sistemas de neurotransmissão (incluindo monoaminérgico ou glutamatérgico), atuam em vários processos em distintas populações celulares e envolvem diferentes mecanismos de controle (incluindo modulação epigenética, mediadores neuroimunes e vias neurotróficas). Dessa forma, a hipótese neuroplástica da ação de antidepressivos, que propõe que a efetividade dessa classe de fármacos

estaria diretamente relacionada a seus efeitos sobre os diversos fenômenos que compõem o processo de neuroplasticidade, é capaz de incorporar conceitos e pressupostos de outras hipóteses sobre os mecanismos dessa classe de fármacos.

Partindo dos pressupostos estabelecidos pela hipótese neuroplástica, a busca pela otimização da ação de antidepressivos pode ser baseada em abordagens que permitam a facilitação de seus efeitos neuroplásticos. Uma das possibilidades é a combinação de antidepressivos com outros agentes que também apresentem potencial para gerar ou facilitar essas respostas de neuroplasticidade. Dentre os possíveis alvos moleculares para interferir com propriedades plásticas do tecido cerebral, sistemas de neuromodulação são particularmente interessantes por interferirem com o equilíbrio e função de várias vias de neurotransmissão em distintas populações celulares. O sistema endocanabinóide consiste em um dos principais sistemas de neuromodulação e o tópico a seguir trata das ações neuroplásticas de canabinóides derivados da planta *Cannabis sativa* ou de drogas sintéticas que atuam preferencialmente em um alvo específico do sistema.

1.6. Sistema endocanabinóide e canabinóides: Efeitos comportamentais e neuroplásticos

O estudo da farmacologia de canabinóides ganhou grande impulso a partir da década de 1930, quando compostos derivados da planta *Cannabis sativa* começaram a ser isolados e a ter suas estruturas químicas evidenciadas. Um desses compostos, o canabidiol (CBD), foi isolado por Adams e colaboradores em 1940 e teve sua estrutura descrita por Mechoulam e Shvo, em 1963. Ao contrário do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), CBD foi descrito como desprovido de propriedades psicotomiméticas (MECHOULAM et al., 1970). A partir da década de 70, CBD foi

caracterizado como um composto com potencial efeito antiepiléptico (CARLINI et al., 1973), capaz de reduzir efeitos ansiogênicos de altas doses de Δ^9 -THC em humanos (KARNIOL et al., 1974; ZUARDI et al., 1982) e de gerar efeitos do tipo-ansiolítico, antidepressivo e antipsicótico em estudos pré-clínicos (GUIMARÃES et al., 1990; ZANELATI et al., 2010; ZUARDI; RODRIGUES; CUNHA, 1991).

Ainda que tenham sido descritos e isolados entre as décadas de 1930 e 1960, não foi até o final da década de 1980 que os mecanismos associados a ação de canabinóides começaram a ser revelados. Em 1988, Devane e colaboradores, em um estudo avaliando a inibição competitiva do *binding* de [^{3} H]CP55,940 por diferentes fitocanabinóides, forneceu uma das primeiras evidências da existência de um receptor canabinóide no cérebro de ratos (DEVANE et al., 1988). Em 1990, Matsuda e colaboradores clonaram o receptor canabinóide do tipo 1 (CB₁) e, 3 anos depois, foi clonado o receptor canabinóide do tipo 2 (CB₂) (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). O primeiro ligante endógeno descrito para esses receptores foi a anandamida, em 1992 (DEVANE et al., 1992) e, pouco tempo depois, o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) também foi descrito como um endocanabinóide (MECHOULAM et al., 1995). Posteriormente, foram caracterizadas as enzimas de síntese (N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipase D – NAPE-PLD – para anandamida, diacilglicerol lipase – DAGL – para 2-AG) (BISOGLNO et al., 2003) e de degradação dos endocanabinóides (*fatty acid amide hydrohilase* – FAAH – para anandamida, monoacilglicerol lipase – MAGL – para 2-AG) (CRAVATT et al., 1996). Além de AEA e 2-AG, recentemente outros ligantes endógenos de receptores canabinóides foram descritos, incluindo outros derivados lipídicos, como N-araquidonoil-dopamina (GRABIEC; DEHGhani, 2017) e também derivados não lipídicos, como a

hemopressina, a qual atua como um agonista inverso de receptores CB₁ (HEIMANN et al., 2007).

Os endocanabinóides são classicamente descritos como sinalizadores retrógrados liberados sob demanda (Figura 2). Frente a um estímulo que levem ao aumento da concentração intracelular de cálcio, as enzimas de síntese são ativadas e os endocanabinóides são produzidos no terminal pós-sináptico. Uma vez liberados na fenda sináptica, tais moduladores podem atuar em receptores canabinóides CB₁ no terminal pré-sináptico. A resultante ativação da sinalização mediada por proteína G_{i/o} leva a uma inibição da liberação de neurotransmissores. O término da sinalização se dá pela degradação dos endocanabinóides. Embora essa seja a descrição clássica desse sistema, evidências recentes adicionam complexidade ao modelo de sinalização mediada por endocanabinóides. O receptor CB₂, o qual era inicialmente considerado um receptor estritamente de células periféricas, foi encontrado no tecido nervoso e é possível que seja expresso em terminais pós-sinápticos (BRUSCO et al., 2008). Ademais, o receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) foi incorporado a esse sistema como um alvo de atuação de endocanabinóides (VAN DER STELT et al., 2005). Existe, ainda, a proposição de um possível transportador de membrana de endocanabinóides (EMT) (CHICCA et al., 2012). Além de neurônios, outras células nervosas podem expressar receptores canabinóides. Na micróglia, a sinalização endocanabinóide parece ser essencial para definir o fenótipo microglial (STELLA, 2010). Ademais, Navarrete e Araque (2008) mostraram que, em células hipocâmpais, a liberação de endocanabinóides por neurônios piramidais pode ativar receptores CB₁ em astrócitos, levando a uma via de sinalização mediada por fosfolipase C que culmina com o recrutamento de Ca²⁺ de reservas intracelulares. A elevação de Ca²⁺ evoca a liberação de glutamato pelos astrócitos. Esse glutamato pode atuar em

receptores NMDA presentes em neurônios piramidais. Dessa forma, a sinalização endocanabinóide parece ser essencial para a comunicação entre astrócitos e neurônios.

Figura 2. Sinalização do sistema endocanabinóide. Representação esquemática simplificada do sistema endocanabinóide, com receptores CB₁ expressos em astrócito (onde pode se acoplar a G_q), micróglia e em terminais pré-sinápticos, onde a ativação desses receptores leva a uma redução da liberação de neurotransmissores. Receptores CB₂ estão representados como expressos na micróglia e propõe-se a expressão no terminal pós-sináptico. Propõem-se, ainda, a existência de um transportador membranar de endocanabinóides (EMT) Siglas: AEA: anandamida; AA: ácido aracdônico; DAG: diacilglicerol; DAGL: diacilglicerol lipase; EMT: *endocannabinoid membrane transporter*; FAAH: *fatty acid amide hydrolase*; NAPE: *N-acylphosphatidylethanolamine*; NAPE-PLD: *N-acylphosphatidylethanolamine phospholipase D*; MAGL: *monoacilglicerol lipase*. Adaptado de: Campos AC et al. In: Pébay A & Wong RCB; Springer International Publishing, pp. 119, 2017

Hill e colaboradores (2009) encontraram que os níveis séricos basais de AEA e 2-AG foram significativamente menores em mulheres com depressão maior em comparação a indivíduos controle. Polimorfismos do gene CNR1 que codifica o receptor CB₁ em humanos parecem influenciar a vulnerabilidade ao desenvolvimento de sintomas de depressão após um evento estressor recente (JUHASZ et al., 2009). Em modelos animais, o *knockout* de receptores CB₁ aumenta a sensibilidade ao estresse (ASO et al., 2008; FRIDE et al., 2005; STEINER et al., 2007) e, em contraste,

a superexpressão de CB₂ parece proteger das consequências comportamentais da exposição ao estresse (GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2010).

CBD e drogas que facilitam a transmissão endocanabinóide apresentam efeitos comportamentais semelhantes a antidepressivos em modelos animais. Campos e colaboradores (2013b) mostraram que em camundongos submetidos a 14 dias de estresse crônico imprevisível o tratamento concomitante com CBD na dose de 30mg/kg preveniu a exacerbação do tempo de latência para consumo de alimento em um contexto de neofobia no teste de *novelty suppressed feeding* e esse efeito foi dependente da indução de neurogênese hipocampal. De modo semelhante, URB597, um inibidor da degradação de anandamida, reduziu a resposta do tipo-anedônica de ratos cronicamente estressados após 5 semanas de tratamento (BORTOLATO et al., 2007).

A ação modulatória do sistema endocanabinóide sobre os diferentes sistemas de neurotransmissão destaca o relevante papel desse sistema em mecanismos neuroplásticos, especialmente em resposta ao estresse (SONG; ZHANG; CHEN, 2015). Shoshan e colaboradores (2017) demonstraram que a exposição a um protocolo estressor severo gerou um déficit da indução de LTP na região CA1 do hipocampo de ratos e o tratamento com URB597 foi capaz de reduzir esse efeito deletério do estresse. Em um modelo de hipoperfusão cerebral, URB597 aumentou a expressão da proteína de vesícula sináptica sinaptofisina no hipocampo e córtex frontal (SU et al., 2016). CBD, por sua vez, é capaz de exacerbar a neurogênese hipocampal em modelos animais (CAMPOS et al., 2013b; ESPOSITO et al., 2011; FOGAÇA et al., 2018; MORI et al., 2017; SCHIAVON et al., 2016; WOLF et al., 2010). Ademais, CBD também foi capaz de prevenir o efeito de estresse crônico sobre o número de espinhos dendríticos de neurônios granulares do giro denteado do

hipocampo, além de prevenir a redução da expressão de sinapsina 1a/b e de aumentar a expressão de PSD95 nos sinaptosomas obtidos do hipocampo de animais submetidos ao estresse (FOGAÇA et al., 2018). Além disso, em cultura de células PC12, Santos e colaboradores (2015) demonstraram que CBD promoveu neuritogênese, diferenciação celular e aumentou o nível de proteínas associadas a vesículas sinápticas.

1.7. Antidepressivos, sistema endocanabinóide e canabinóides

Antidepressivos são capazes de afetar a função do sistema endocanabinóide. Smaga e colaboradores (2017) reportaram que o tratamento crônico com escitalopram aumentou o *binding* do agonista tritiado [³H]CP55940 a receptores CB₁ no córtex pré-limbico, córtex infralímbico, córtex cingulado, amígdala, região CA1 do hipocampo e em algumas porções do estriado. O tratamento crônico com escitalopram também foi capaz de aumentar os níveis hipocampais de AEA (SMAGA et al., 2014). Adicionalmente, fluoxetina, após 14 dias de tratamento, aumentou a ação do agonista CB₁ WIN55,212-2 em inibir a enzima adenilato-ciclase (MATO et al., 2010).

Um polimorfismo do gene CNR1 está associado com um maior risco de resistência ao tratamento antidepressivo (DOMSCHKE et al., 2008) e, em camundongos, o *knockout* de receptores CB₁ altera a responsividade a ISRS (STEINER et al., 2007). Além disso, a combinação aguda de uma dose sub-efetiva de fluoxetina administrada sistemicamente com concentrações sub-efetivas de AEA ou URB597 administradas via intra-cerebroventricular reduziu o tempo de imobilidade de camundongos no teste do nado forçado (UMATHE; MANNA; JAIN, 2011). Esses achados evidenciam que o sistema endocanabinóide pode participar diretamente da efetividade de antidepressivos. Fortalecendo ainda mais esses indícios, a ação do

antidepressivo imipramina em inibir a ativação das células da região parvocelular medial dorsal do núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos estressados foi bloqueada pelo agonista invertebrado CB₁ AM251, indicando que a supressão da ativação do eixo-HPA pela imipramina em ratos estressados é dependente de receptores canabinóides CB₁ (HILL et al., 2006).

Além da ação de antidepressivos sobre o sistema endocanabinóide, vias e receptores monoaminérgicos (sistema primariamente alvo da ação de ISRS) são afetados por canabinóides e podem contribuir para seus efeitos comportamentais. Bambico e colaboradores (2016) mostraram que os efeitos comportamentais de URB597 em ratos após uma administração aguda foram prevenidos por para-clorofenilalanina, um inibidor da síntese de 5-HT. Esse mesmo estudo indicou que, no hipocampo de animais que receberam URB597, houve uma redução da inibição de neurônios piramidais frente a aplicação de agonistas 5-HT_{2A/C} ou 5-HT_{1A}, um efeito que também foi observado nos animais que receberam tratamento com o ISRS citalopram. Esses achados indicam que, semelhante a antidepressivos, o tratamento com URB597 gera uma dessensibilização de receptores serotoninérgicos no hipocampo. O tratamento com URB597 também é capaz de aumentar o disparo de neurônios serotoninérgicos do núcleo da rafe (BAMBICO et al., 2016; GOBBI et al., 2005; MCLAUGHLIN et al., 2012).

CBD é descrito como um possível agonista do receptor 5-HT_{1A} (RUSSO et al., 2005), o qual pode participar de forma relevante nos efeitos gerados pelo fitocanabinóide em modelos animais. Resstel e colaboradores (2009) mostraram que a capacidade do CBD de reduzir as consequências cardiovasculares e comportamentais da exposição ao estresse de restrição em ratos foi prevenida pela administração do antagonista 5-HT_{1A} WAY100635. No modelo de bulbectomia

olfatória, o qual induz respostas comportamentais relacionadas a um estado do tipo-depressivo, CBD reverteu o estado do tipo-anedônico dos animais e, paralelamente, impediu o prejuízo na função de receptores 5HT_{1A} no núcleo dorsal da rafe, no hipocampo e na amígdala de animais bulbectomizados (LINGE et al., 2016).

Canabinóides e antidepressivos também demonstram mecanismos em comum envolvendo outros sistemas e processos. Existem evidências de que o fator neurotrófico BDNF e o fator de transcrição CREB, os quais são frequentemente associados aos efeitos do tratamento crônico com antidepressivos (BJÖRKHOLM; MONTEGGIA, 2016; CASTRÉN; KOJIMA, 2017), também podem ser alterados frente ao tratamento com URB597 ou CBD (BAMBICO et al., 2016; CAMPOS et al., 2015; MORI et al., 2017; SU et al., 2016; VINOD et al., 2012).

Alvos comuns entre antidepressivos e canabinóides também compreendem vias de sinalização que regulam processos metabólicos, de síntese proteica e de proliferação celular. Algumas dessas vias convergem para a sinalização mediada por *mammalian/mechanistic target of rapamycin* (mTOR), uma proteína quinase que desempenha um papel crítico no controle de respostas neuroplásticas (SWITON et al., 2017). Park e colaboradores (2014) mostraram que rapamicina, um inibidor de mTOR, impediu os efeitos do ISRS escitalopram no que se refere a indução de crescimento neurítico e ao aumento das proteínas sinápticas PSD95 e sinaptofisina. De modo semelhante, existem evidências de que alguns efeitos do CBD são dependentes de mTOR (GOBIRA et al., 2015). Wang e colaboradores (2017), por sua vez, mostraram que URB597 em ratos submetidos a hipoperfusão cerebral aumentou a ativação da via Akt/mTOR, indicando que essa via de sinalização também pode estar associada com a ação do URB597.

Tanto BDNF e CREB quanto a via de sinalização mediada por mTOR participam no controle de respostas neuroplásticas, indicando que tais vias potencialmente participam tanto nos efeitos comportamentais quanto nos efeitos neuroplásticos de antidepressivos e de canabinóides. Outros mecanismos compartilhados por ISRS e CBD ou URB597 incluem modulação de respostas neuroimunes (CAMPOS et al., 2015; MAGEN et al., 2010; MORI et al., 2017; MURPHY et al., 2012), alterações epigenéticas (LOMAZZO et al., 2017; TODD et al., 2017), regulação de autofagia e outros processos metabólicos (GASSEN et al., 2014; HOSSEINZADEH et al., 2016; NABISSI et al., 2015; WANG et al., 2017; ZSCHOCKE et al., 2011), restauração do balanço redox e neuroproteção (BEHR; MOREIRA; FREY, 2012; BIERNACKI et al., 2016; BORGES; DA SILVA, 2017; CHANG et al., 2015; HAMPSON et al., 1998; HOSSEINZADEH et al., 2016; PELIÇÃO et al., 2016; SANTOS et al., 2015; XU; STEVEN RICHARDSON; LI, 2003; YOUNG, 2002).

Canabinóides ou moduladores da função endocanabinóide e antidepressivos apresentam, portanto, uma marcante coincidência de efeitos comportamentais e neuroplásticos. Tais efeitos podem, inclusive, derivar de mecanismos moleculares compartilhados por esses compostos. É possível, deste modo, que atuando paralelamente ou diretamente em vias em comum, a combinação de canabinóides e antidepressivos possa gerar efeitos comportamentais e neuroplásticos em modelos animais.

1.8. Hipótese

Em suma, considerando que:

- (1) Escitalopram apresenta efeitos comportamentais em animais estressados após pelo menos 3 semanas de tratamento;

(2) CBD e URB597 geram respostas comportamentais e neuroplásticas semelhantes a antidepressivos e

(3) ISRS e canabinóides podem atuar através de mecanismos em comum, a hipótese do presente estudo é que, após uma semana de tratamento, a combinação de escitalopram (em uma dose efetiva em alterar o comportamento após 21 dias de tratamento) com doses sub-efetivas de CBD ou de URB597 em camundongos estressados poderia gerar efeitos comportamentais e, paralelamente, alterar marcadores de plasticidade sináptica.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar as respostas comportamentais e neuroplásticas frente a combinação de escitalopram com doses sub-efetivas de CBD ou de URB597 em camundongos cronicamente estressados.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos comportamentais da combinação de escitalopram e CBD ou URB597 após 7 dias de tratamento em camundongos submetidos ao modelo de estresse de derrota social ou de estresse crônico imprevisível;
- Investigar o efeito da combinação de escitalopram e CBD ou URB597 sobre a expressão de proteínas da maquinaria de liberação de neurotransmissores no hipocampo e PFC de camundongos estressados;
- Mensurar a expressão das proteínas *post-synaptic density 95* e BDNF no hipocampo e PFC de camundongos estressados tratados com escitalopram em combinação com CBD ou URB597;
- Investigar o efeito do tratamento com escitalopram em combinação com CBD ou URB597 sobre a morfologia e número de espinhos dendríticos de neurônios do giro denteado do hipocampo de camundongos cronicamente estressados.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl6 (idade entre 10 e 12 semanas) e camundongos da linhagem Swiss (idade aproximada: 6 meses) provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo/Campus Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em condições de temperatura e umidade controladas e em ciclo claro/escuro de 12h/12h, com ração e água *ad libitum*. Todos os protocolos foram conduzidos de acordo com as resoluções do comitê de ética em uso de animais (Protocolo nº032/2015-1).

3.2. Drogas

Foram utilizados escitalopram (ISRS, oxalato de escitalopram, Prati-Donaduzzi; 3 e 10 mg/kg; baseado em Aguiar et al., dados não publicados) dissolvido em salina, URB597 (Cayman, inibidor da enzima FAAH; 0,1mg/kg; Fusse et al., dados não publicados) e CBD (7,5mg/kg, BSPG; Marrubia et al., dados não publicados) dissolvidos em salina e Tween 80 (2%).

3.3. Estresse de derrota social (*Social Defeat Stress, SDS*)

O modelo, adaptado de Golden *et al.* (2011), consiste em colocar um camundongo Swiss maior e dominante (proveniente de acasalamento) em uma caixa com 3 camundongos C57Bl6 que, por estarem alojados juntos por pelo menos 4 semanas, já estabeleceram sua dinâmica social. A presença do invasor causa um conflito nos residentes da caixa, que perdem a hierarquia previamente estabelecida. O protocolo foi realizado diariamente por 2 horas durante 10 dias, sempre utilizando um invasor diferente a cada dia em cada caixa de camundongos residentes.

3.4. Estresse crônico imprevisível (*Chronic Unpredictable Stress, CUS*)

O modelo, adaptado de Willner *et al.* (1992), consiste em submeter diariamente os camundongos C57Bl6 de maneira alternada a um dos seguintes estressores: maravalha molhada, nado forçado, caixa inclinada, privação de comida, restrição no tubo falcon, ciclo intermitente e inversão de ciclo (CAMPOS *et al.*, 2013b). Os seguintes estressores foram repetidos para completar os 10 dias de protocolo: maravalha molhada, nado forçado e restrição no tubo falcon.

3.5. Testes comportamentais

3.5.1. *Novelty suppressed feeding (NSF)*

Utilizado para avaliação de comportamento defensivo, o teste compreende privar os animais de comida por 24 horas e colocá-los no aparato experimental, que consiste em uma caixa transparente (50x50x20cm) contendo aproximadamente 2cm de serragem e, no centro, uma plataforma branca iluminada contendo um *pellet* de ração. Foi quantificada a latência para que os camundongos coloquem as duas patas dianteiras e o focinho no *pellet* de ração, com tempo de corte de 10 minutos (600 segundos). A quantidade de comida ingerida em 5 minutos na *home-cage* foi medida como parâmetro controle. Esse teste é particularmente interessante para os propósitos do presente estudo por não ser sensível ao efeito agudo, mas apenas ao efeito crônico do tratamento com antidepressivos (DULAWA *et al.*, 2004).

3.5.2. Teste de suspensão pela cauda (*Tail suspension test – TST*)

O teste foi utilizado para medir respostas de enfrentamento frente a exposição a um desafio comportamental agudo, ou seja, para avaliar respostas de *stress coping*. O teste consiste em colocar os animais suspensos pela cauda a 50cm acima do chão por 6 minutos. Conforme método proposto por Steru *et al.* (1985), foram avaliadas como medidas de estratégias passivas de enfrentamento o tempo de imobilidade e a latência para o primeiro episódio de imobilidade. A resposta comportamental tida

como preditiva de um efeito do tipo-antidepressivo é a redução do tempo de imobilidade e/ou o aumento da latência para o primeiro episódio de imobilidade.

3.5.3. Open Field (OF)

O teste foi utilizado para avaliação de respostas locomotoras, com monitoramento, através do software AnyMaze, da distância percorrida em uma arena cilíndrica (40 cm de diâmetro) por um período de 5 minutos.

3.6. Western blot

O método foi utilizado como uma abordagem semi-quantitativa de avaliação da expressão de proteínas de interesse. Após a eutanásia dos animais, o PFC e os hipocampus dos animais foram dissecados e armazenados em tubos independentes. Em seguida, os tecidos foram macerados em tampão de lise (Tris-HCl 25mM pH=7,5, NaCl 75mM, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}_7\text{P}_2$ 2,5mM, Na_3VO_4 1mM, Na_2MoO_4 5mM, 0,5% Triton X-100) com coquetel de inibidor de protease (*Protease Inhibitor Cocktail powder*, Cat. P2714, Componentes: *AEBSF*, *Aprotinin*, *Bestatin*, *E-64*, *EDTA*, *Leupeptin*; *Sigma Aldrich*) através de um homogeneizador do tipo *bead-beater* (30Hz (hipocampo), 40Hz (PFC), 90 segundos; *TissueLyser LT Adapter*, Qiagen). Após a lise, as amostras passaram por duas etapas de centrifugação (12000 rpm, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante resultante foi estocado em alíquotas a -80°C.

A concentração proteica das amostras foi avaliada pelo método de Bradford, com curva padrão de BSA e leitura da absorbância a 450nm em *NanoDrop* (*NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer*, *Thermo Scientific*). As amostras de hipocampo tiveram uma concentração proteica entre 9 e 21g/L e as amostras de PFC apresentaram uma concentração entre 2 e 8g/L. Para separação proteica, eletroforese foi conduzida em gel de poliacrilamida com densidade gradiente (4-12% - *NuPAGE™*

Invitrogen), com um volume de 20uL e a uma concentração proteica de 1g/L por poço do gel. Após a separação, foi realizada a eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. A transferência foi confirmada através de coloração por Ponceau. A fim de bloquear sítios inespecíficos, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (leite 10% - *Blotting grade blocker non fat dry milk, BioRad Laboratories* - em Salina Tamponada em Tris e Tween 20 (TBS-t)) por, no mínimo, 2 horas. Em seguida, foi realizada a incubação *overnight* com os anticorpos primários diluídos em TBS-t com 1% de BSA (descritos na Tabela 4).

Tabela 4. Anticorpos primários utilizados no *Western blot*

ANTICORPO PRIMÁRIO	HOSPEDEIRO	MARCA	DILUIÇÃO
Anti-sinaptofisina	Coelho	Cell Signaling	1:1000
Anti-sinaptotagmina	Coelho	Cell Signaling	1:1000
Anti-sinapsina 1a/b	Coelho	Abcam	1:2000
Anti-PSD95	Coelho	Cell Signaling	1:1000
Anti- β -Actina	Camundongo	Cell Signalling	1:10000
Anti-BDNF	Coelho	Santa Cruz	1:200
Anti- α -tubulina	Camundongo	Cell Signaling	1:10000

Após 3 etapas de lavagem com TBS-t, as membranas foram incubados com o anticorpo secundário durante 2 horas (*Anti-rabbit, GE Healthcare*, 1:10000 ou *Anti-mice, GE Healthcare*, 1:10000). Em seguida, as membranas foram novamente submetidas a 3 lavagens em TBS-t. A revelação se deu por quimioluminescência em um fotodocumentador (*ImageQuant LAS 4000 series, GE Healthcare Life Sciences*). As bandas resultantes tiveram, então, suas densidades avaliadas através do software *Image Studio Lite 5.2*.

No caso das amostras hipocâmpais, as proteínas sinaptofisina (~33kDa), sinaptotagmina (~60kDa), PSD95 (~95kDa) e β -actina (~45kDa) foram marcadas nas mesmas membranas. Essas membranas não foram deblotadas e a proteína α -tubulina (~52kDa) foi utilizada como normalizador. Em outras membranas, foram marcadas as proteínas sinapsina 1a/b (~80-86kDa) e BDNF (~14kDa). Essas membranas foram deblotadas através de um protocolo de *mild stripping* (Solução com 0,15% glicina, 0,01% SDS, 1% Tween 20, pH=2,2) antes da normalização por α -tubulina. No caso das análises de amostras de PFC, nenhuma das membranas foi deblotada.

3.7. Técnica de Golgi

Para o método de impregnação por Golgi foi utilizado o *FD Rapid GolgiStain Kit* (FD NeuroTechnologies, INC) e o protocolo foi conduzido conforme instruções do fabricante. Brevemente, após a eutanásia dos animais, os cérebros foram retirados, imerso na solução de dicromato de potássio e mantido à temperatura ambiente por 10 dias. Em seguida, os tecidos foram transferidos para a solução de lavagem e estocados em temperatura ambiente por pelo menos 72 horas para depois serem seccionados em criostato em secções de 100 μ m e colocados em lâminas gelatinizadas. As secções foram mantidas hidratadas até o processamento, que consiste em completar a reação com cloreto de mercúrio e posterior processo de desidratação em etapas sucessivas de etanol e xileno. A análise foi realizada em neurônios granulares do giro denteado do hipocampo, selecionando 10 μ m da porção inicial de dendritos secundários para realizar a quantificação e classificação de espinhos dendríticos após escaneamento no modo de reflexão do microscópio confocal (Leica TCS SPE) (Spiga et al., 2011). O processo de classificação de morfologia dendrítica (em *stubby*, *thin*, *filopodia* ou *mushroom*) foi realizado conforme esquema representado na Figura 3.

Figura 3. Critérios de classificação de espinhos dendríticos. Uma vez definido como um espinho dendrítico, a classificação será feita a partir da razão entre o comprimento do pescoço ($C_{\text{pescoço}}$) e o diâmetro da cabeça ($d_{\text{cabeça}}$) da formação.

3.8. Procedimentos experimentais

3.8.1. Caracterização dos efeitos comportamentais do escitalopram em camundongos cronicamente estressados

Para avaliar o efeito do escitalopram no modelo de SDS, foram selecionadas duas doses de escitalopram para serem testadas: 3 e 10 mg/kg. Os animais foram divididos em grupo estressado e não-estressado e, dentro de cada grupo, subdivididos quanto aos tratamentos com: (1) Veículo; (2) Escitalopram 3 mg/kg e (3) Escitalopram 10 mg/kg. O protocolo de SDS foi conduzido por 10 dias e o tratamento foi realizado via i.p. nos 7 últimos dias do protocolo de estresse, sempre com pelo menos 4h de diferença entre o tratamento e o estressor diário. No 11º dia, os animais foram submetidos ao teste de *novelty-suppressed feeding* e, no 12º, ao *tail suspension test* (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática do protocolo de avaliação do efeito do escitalopram no modelo de SDS. O protocolo de estresse de derrota social (SDS) foi realizado por 10 dias e o tratamento (Veículo, Escitalopram 3 mg/kg ou Escitalopram 10mg/kg) foi realizado durante os 7 últimos dias do protocolo de estresse. Os testes comportamentais foram realizados no 11º e no 12º dias do protocolo.

Um outro conjunto de animais foi testado quanto ao efeito do escitalopram (10 mg/kg) no modelo de estresse crônico imprevisível (CUS). Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: (1) Controle (não-estressado); (2) CUS / Veículo e (3) CUS / Escitalopram 10 mg/kg. O procedimento de estresse e o protocolo de tratamento via i.p. foram conduzidos de forma concomitante por 21 dias. Os testes comportamentais foram conduzidos nos dias 20 e 22 do protocolo (Figura 5).

Figura 5. Representação esquemática do protocolo de avaliação do efeito do escitalopram no modelo de CUS. O protocolo de estresse crônico imprevisível foi realizado por 21 dias, com tratamento realizado de forma concomitante (Veículo ou Escitalopram 10mg/kg). Os testes comportamentais foram realizados no 20º e no 22º dias do protocolo.

3.8.2. Quais são os efeitos comportamentais da combinação de escitalopram com canabinóides no modelo de derrota social?

Definidas as doses a serem utilizadas para combinação, foi estabelecido o protocolo esquematizado na Figura 6. Os animais foram divididos nos seguintes

grupos experimentais: (1) Controle (Não-estressado; Veí+Veí); (2) Estressado Veí+Veí; (3) Estressado Esc+Veí; (4) Estressado Veí+CBD; (5) Estressado Veí+URB597; (6) Estressado Esc+CBD e (7) Estressado Esc+URB597. O SDS foi conduzido por 10 dias e o tratamento via i.p. ocorreu nos 7 últimos dias do protocolo de SDS, sempre com pelo menos 4h de diferença entre o último tratamento e o estressor diário. No 11º dia, os animais foram submetidos aos testes comportamentais, mas em blocos individuais: ou os animais foram submetidos aos testes de TST e OF ou foram submetidos ao teste de NSF. No 11º dia também foi realizada a coleta de tecidos para análises posteriores (Figura 6).

Figura 6. Representação esquemática do protocolo de avaliação dos efeitos da combinação de escitalopram e canabinóides no modelo de SDS. O protocolo de estresse de derrota social (SDS) foi realizado por 10 dias e o tratamento (Veículo ou Escitalopram 10mg/kg + Veículo ou Canabidiol (CBD) 7,5mg/kg ou URB597 0,1 mg/kg) foi realizado durante os 7 últimos dias do protocolo de estresse. Os testes comportamentais e a coleta de tecidos para análises subsequentes foram feitos no dia seguinte ao final dos protocolos de estresse e tratamento.

3.8.3. Quais são os efeitos comportamentais da combinação de escitalopram e canabinóides no modelo de estresse crônico imprevisível?

O protocolo de estresse crônico imprevisível (CUS), foi conduzido o protocolo esquematicamente representado na Figura 7. Os animais foram divididos nos mesmos grupos experimentais descritos no item 3.8.2. O CUS foi conduzido por 10 dias e o

tratamento ocorreu nos 7 últimos dias do protocolo de estresse. A diferença desse protocolo para o de SDS foi que os mesmos animais foram submetidos a todos os testes comportamentais, visando a otimização do protocolo e a redução do número de animais utilizados.

Figura 7. Representação esquemática do protocolo de avaliação dos efeitos da combinação de escitalopram e canabinóides no modelo de CUS. O protocolo de estresse crônico imprevisível (CUS) foi realizado por 10 dias e o tratamento (Veículo ou Escitalopram 10mg/kg + Veículo ou Canabidiol (CBD) 7,5mg/kg ou URB597 0,1 mg/kg) foi realizado durante os 7 últimos dias do protocolo de estresse. O teste de suspensão pela cauda (TST) e o *open field* (OF) foram realizados no 10º dia do protocolo e o *novelty supressed feeding test* (NSF) foi realizado no 11º dia, assim como a coleta de tecidos para análises posteriores.

3.8.4. Quais são os efeitos neuroplásticos da combinação de escitalopram e canabinóides em camundongos cronicamente estressados?

Os efeitos neuroplásticos da combinação de escitalopram e canabinóides foram avaliados em tecidos coletados de animais submetidos aos protocolos descritos nos tópicos 3.8.2 e 3.8.3. De uma parte dos animais foram coletados tecidos para análises moleculares que objetivaram avaliar marcadores de plasticidade sináptica no hipocampo e PFC. Esses marcadores foram PSD95, β -actina, o fator neurotrófico BDNF e as proteínas da maquinaria vesicular sinapsina 1a/b, sinaptofisina e sinaptotagmina.

Outro conjunto de animais, após a eutanásia, teve o cérebro inteiro retirado e processado para realizar a técnica de coloração de Golgi. O objetivo desse procedimento experimental foi caracterizar o efeito da combinação de escitalopram com CBD ou URB597 sobre a morfologia de espinhos dendríticos.

3.9. Análise estatística

Os dados estão representados como média $\pm$ Erro padrão da média (EPM) e exceções estão especificadas nas legendas e descrições dos dados correspondentes. A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Kolmorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Os dados foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias seguida do teste de Duncan para comparações múltiplas ou teste t de amostras independentes para análises entre 2 grupos. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

Nos protocolos de combinação de drogas, o efeito do fator Condição (estresse) foi avaliado através da comparação do grupo controle, não estressado, com o grupo estressado tratado apenas com veículo (através do teste t de amostras independentes conforme especificado acima). O efeito dos fatores Tratamento 1 (Veículo ou Escitalopram) e Tratamento 2 (Veículo, CBD ou URB597) foram avaliados por ANOVA de duas vias. A comparação entre cada grupo individualmente foi realizada por ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan (dentro de cada condição).

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Análises comportamentais

4.1.1. O tratamento por 21, mas não por 7 dias, com escitalopram altera as respostas comportamentais de animais estressados

Uma característica frequentemente observada em modelos animais baseados na exposição ao estresse crônico é a responsividade aos efeitos comportamentais de fármacos antidepressivos apenas frente a um tratamento crônico. Dessa forma, o primeiro passo foi caracterizar os efeitos do escitalopram nos protocolos de estresse empregados nesse estudo.

O efeito do tratamento com 7 dias com escitalopram (nas doses de 3 e 10 mg/kg) foi testado em animais submetidos ao protocolo de SDS por 10 dias. No teste de suspensão pela cauda (TST), ANOVA de duas vias não indicou um efeito significativo do fator estresse sobre a latência para o primeiro episódio de imobilidade e sobre a imobilidade total no TST ($F_{(1,36)}=0,324$; $p=0,573$ para a latência e $F_{(1,36)}=0,005$; $p=0,947$ para a imobilidade). Embora ANOVA de duas vias não tenha revelado um efeito significativo do fator tratamento no TST para nenhuma das variáveis testadas, dentro do grupo controle houve um efeito significativo do fator tratamento ($F_{(2,18)}=3,884$; $p=0,04$ para latência e $F_{(2,18)}=5,307$; $p=0,015$ para o tempo de imobilidade total), com o grupo tratado com escitalopram na dose de 10 mg/kg apresentando uma latência para o primeiro episódio de imobilidade significativamente menor do que o grupo veículo e os grupos tratados com escitalopram nas doses de 3 e 10mg/kg apresentando um tempo de imobilidade significativamente maior do que o grupo veículo (ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan) (Figura 8).

Figura 8. Efeito do escitalopram nas doses de 3 e 10 mg/kg na resposta de animais estressados no TST. Animais controle (não-estressados) ou submetidos ao protocolo de SDS por 10 dias receberam tratamento por 7 dias com veículo, 3 mg/kg de escitalopram ou 10 mg/kg de escitalopram (n=7/grupo) e foram testados quanto (A) a latência para o primeiro episódio de imobilidade e quanto (B) ao tempo de imobilidade total no TST. Valores expressos como Média $\pm$ EPM; (*) Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo correspondente a mesma condição (ANOVA de duas vias; ANOVA de uma via seguido de pos-hoc de Duncan).

ANOVA de duas vias não indicou um efeito significativo do fator estresse ($F_{(1,36)}=0,058$; $p=0,810$), mas indicou um efeito significativo do fator tratamento ($F_{(2,36)}=3,250$; $p=0,05$) sobre a resposta de hipofagia induzida por neofobia no teste de NSF. Entretanto, ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan não indicou uma diferença significativa entre nenhum dos grupos testados ($F_{(2,18)}=3,032$, $p=0,073$). Como medida controle da fome dos animais, foi mensurado o consumo de alimento na sua respectiva *home-cage* durante 5 minutos. ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo do fator estresse ($F_{(1,36)}=4,099$, $p=0,05$), mas não do fator tratamento ($F_{(2,36)}=0,755$, $p=0,477$) sobre esse parâmetro. Não houve interação entre os fatores ($F_{(2,36)}=0,463$, $p=0,633$) (Figura 9).

Figura 9. Efeito do escitalopram nas doses de 3 e 10 mg/kg na resposta de camundongos estressados no NSF. Animais controle (não-estressados) ou submetidos ao protocolo de SDS por 10 dias receberam tratamento por 7 dias com veículo, 3 mg/kg de escitalopram ou 10 mg/kg de escitalopram (n=7/grupo) e foram testados quanto (A) a latência para comer em um ambiente novo no teste de NSF, (B) quanto ao consumo de alimentos na *home-cage* como uma medida controle quanto a fome dos animais. Valores expressos como Média $\pm$ EPM.

A fim de testar se a dose de 10 mg/kg de escitalopram seria capaz de alterar as respostas comportamentais de camundongos cronicamente estressados em um maior tempo de tratamento, foi conduzido um protocolo de 21 dias de estresse crônico imprevisível, com tratamento concomitante com veículo ou escitalopram (10 mg/kg, via i.p.). Não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto a latência para o primeiro episódio de imobilidade (Controle vs CUS Veí: teste t de amostras independentes; $t_{(8)}=1,379$, $p=0,205$; CUS Veí vs CUS Escitalopram: teste t de amostras independentes; $t_{(8)}=0,162$, $p=0,876$). Por outro lado, o grupo CUS Veículo apresentou um tempo total de imobilidade significativamente maior do que os animais não-estressados (teste t de amostras independentes; $t_{(8)}=3,005$, $p=0,017$). O grupo CUS tratado com escitalopram apresentou uma significativa redução do tempo de imobilidade em comparação ao grupo estressado tratado com veículo (teste t de amostras independentes; $t_{(8)}=3,996$, $p=0,004$), indicando que o tratamento por 21 dias com escitalopram foi capaz de proteger contra o efeito do estresse de exacerbar respostas passivas de enfrentamento no TST (Figura 10).

Figura 10. Efeito do Escitalopram (10mg/kg) em camundongos submetidos a 21 dias de estresse crônico imprevisível. Animais controle (não-estressados, tratados com veículo) ou submetidos ao protocolo de CUS por 21 dias (tratados de modo concomitante com veículo ou escitalopram na dose de 10mg/kg) (n=5/grupo) foram testados quanto (A) a latência para o primeiro episódio de imobilidade e (B) ao tempo de imobilidade no TST. Valores expressos como Média ± EPM; (*) Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; (#) Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo estressado tratado com veículo (Teste t de amostras independentes) .

Já no NSF, a exposição a 21 dias de estresse aumentou significativamente a latência para consumo de alimento num contexto de neofobia em comparação a animais controle, não-estressados (teste t de amostras independentes; $t_{(8)}=3,681$, $p=0,006$). Não houve uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo CUS tratado com veículo e o grupo CUS tratado com escitalopram (teste t de amostras independentes; $t_{(8)}=0,280$, $p=0,786$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quanto ao consumo de comida na *home-cage* (teste t de amostras independentes; Controle vs CUS Veículo: $t_{(8)}=1,039$, $p=0,329$; CUS Veículo vs CUS Escitalopram: $t_{(8)}=1,185$, $p=0,270$) (Figura 11).

Figura 11. Efeito do Escitalopram (10mg/kg) em camundongos submetidos a 21 dias de estresse crônico imprevisível. Animais controle (não-estressados, tratados com veículo) ou submetidos ao protocolo de CUS por 21 dias (tratados de modo concomitante com veículo ou escitalopram na dose de 10mg/kg) ($n=5/\text{grupo}$) foram testados quanto (A) a latência para consumo de alimento em um ambiente novo e (B) ao consumo de comida nas *home-cage* como uma medida controle. Valores expressos como Média $\pm$ EPM; (*) Indica $p<0,05$ em relação ao grupo controle (teste t de amostras independentes).

4.1.2. A combinação de escitalopram e CBD reduz o comportamento passivo de enfrentamento de animais estressados após 7 dias de tratamento

A dose de 10 mg/kg de escitalopram, por alterar significativamente a resposta comportamental de animais estressados apenas após 21, mas não 7 dias de tratamento, foi selecionada para avaliar se a combinação com canabinóides geraria um efeito comportamental após 1 semana de tratamento. As doses de URB597 e CBD foram definidas a partir de estudos prévios do laboratório.

Inicialmente, a combinação de escitalopram e canabinóides foi testada em animais submetidos a 10 dias de SDS e testados no TST. A latência para o primeiro episódio de imobilidade foi significativamente maior nos animais estressados tratados apenas com veículo em comparação ao grupo de animais não estressados (teste t de amostras independentes; $t_{(15)}=2,787$, $p=0,014$). Considerando apenas os grupos de animais estressados, ANOVA de duas vias não indicou um efeito significativo do fator tratamento 1 ($F_{(1,44)}=2,236$, $p=0,142$) ou do fator tratamento 2 ($F_{(2,44)}=1,554$, $p=0,223$) e não houve interação entre os fatores ($F_{(2,44)}=0,640$, $p=0,532$). ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan indicou que a combinação de escitalopram com CBD foi capaz de aumentar significativamente a latência para o primeiro episódio de imobilidade dos animais estressados em comparação aos animais tratados apenas com veículo. Quanto ao parâmetro de tempo de imobilidade total não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos testados (teste t de amostras independentes Controle vs SDS Veí+Veí: $t_{(15)}=1,279$, $p=0,220$; ANOVA de duas vias no grupo SDS: 1º tratamento: $F_{(1,44)}=1,251$, $p=0,269$; 2º tratamento: $F_{(2,44)}=1,056$, $p=0,356$; Interação: $F_{(2,44)}=0,594$, $p=0,557$) (Figura 12).

Figura 12. Efeito da combinação de escitalopram com canabinóides nas respostas comportamentais no TST de animais submetidos ao protocolo de SDS. Animais controle (não-estressados, tratados com veículo) ou submetidos ao protocolo de SDS por 10 dias (tratados por 7 dias com veículo, escitalopram, CBD, URB597, Escitalopram+CBD ou Escitalopram+URB597) ($n=8-10$ /grupo) foram testados quanto (A) a latência para o primeiro episódio de imobilidade e (B) quanto ao tempo de imobilidade total. Valores expressos como Média $\pm$ EPM; (*) Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e (#) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo SDS tratado apenas com veículo (Teste t de amostras independentes; ANOVA de uma via seguido de pos-hoc de Duncan).

Para explorar o padrão de resposta comportamental dos animais ao longo do TST, foi, ainda, avaliado a progressão temporal da resposta de enfrentamento passivo, analisando o tempo de imobilidade a cada minuto do teste. A figura 13A mostra o decurso temporal da resposta de imobilidade ao longo dos 6 minutos de teste. Ao comparar apenas o grupo controle e o grupo SDS tratado com veículo, ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito significativo do fator tempo ($F_{(5,11)}=44,023$, $p<0,001$), mas não uma interação estatisticamente significativa entre tempo e condição (Wilks' Lambda, $F_{(5,11)}=2,265$, $p=0,120$). Considerando apenas os grupos submetidos ao SDS na análise, ANOVA de medidas repetidas não indicou um efeito estatisticamente significativo de nenhum dos tratamentos individualmente, mas houve interação entre os fatores tempo, tratamento 1 e tratamento 2 (Wilks' Lambda; $F_{(10,80)}=2,103$, $p=0,034$).

Uma vez que a análise do decurso temporal indicou diferenças entre os fatores implicados no protocolo de SDS, foi conduzida uma análise mais detalhada do tempo de imobilidade dos animais a cada minuto do TST (Figura 13B). No primeiro e no quarto minuto do teste os animais submetidos ao SDS e tratados apenas com veículo apresentaram um tempo de imobilidade significativamente maior do que o grupo não-estressado (Minuto 1: $t_{(15)}=2,231$, $p=0,041$; Minuto 4: $t_{(15)}=3,172$, $p=0,006$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de tratamento dentre os animais submetidos ao protocolo de estresse, mas ANOVA de duas vias indicou que, no último minuto do teste, houve uma significativa interação entre tratamento 1 e tratamento 2 ($F_{(2,44)}=3,935$, $p=0,027$), indicando que a combinação de fármacos teve um efeito distinto da ação dos fármacos isoladamente.

Figura 13. Efeito da combinação de escitalopram com CBD ou URB597 no perfil temporal de imobilidade de animais submetidos ao protocolo de SDS no TST. Foi avaliado em animais controle (não-estressados, tratados com veículo) ou submetidos ao protocolo de SDS por 10 dias (tratados por 7 dias com veículo, escitalopram, CBD, URB597, Escitalopram+CBD ou Escitalopram+URB597) (n=8-10/grupo) (A) o decurso temporal da resposta de imobilidade ao longo do teste e (B) a imobilidade a cada minuto do teste. Valores expressos como Média $\pm$ EPM; (*) Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (teste t de amostras independentes).

O efeito da combinação de escitalopram com canabinóides sobre as respostas passivas de enfrentamento no TST também foi testado em camundongos expostos a 10 dias de CUS. Animais estressados tratados apenas com veículo apresentaram uma latência para o primeiro episódio de imobilidade significativamente reduzida em comparação a animais não-estressados (teste t de amostras independentes; $t_{(21)}=2,652$, $p=0,015$). ANOVA de duas vias indicou que não houve um efeito significativo do fator tratamento 1 ($F_{(1,54)}=0,103$, $p=0,749$) ou do fator tratamento 2 ($F_{(2,54)}=3,026$, $p=0,057$) e não houve interação entre os fatores ($F_{(2,54)}=0,080$, $p=0,923$). ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan mostrou que não houve uma diferença significativa entre os grupos de tratamento quanto a latência para o primeiro episódio de imobilidade ($F_{(5,54)}=1,288$, $p=0,283$). Já com relação ao tempo de imobilidade total, teste t de amostras independentes revelou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo CUS tratado apenas com veículo e o grupo não-estressado ($t_{(21)}=2,363$, $p=0,028$), indicando que a exposição ao estresse exacerbou a manifestação da estratégia passiva de enfrentamento frente a exposição ao estressor agudo de suspensão pela cauda. Dentro do grupo estressado, não foi observado um efeito significativo de nenhum dos tratamentos (ANOVA de duas vias; Tratamento 1: $F_{(1,54)}=0,469$, $p=0,496$; Tratamento 2: $F_{(2,54)}=0,453$, $p=0,638$) e não houve interação entre os tratamentos ($F_{(2,54)}=0,621$, $p=0,541$). Não houve diferenças significativas entre os grupos de tratamento (ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan; $F_{(5,54)}=0,592$, $p=0,706$) (Figura 14).

Figura 14. Efeito da combinação de escitalopram e canabinóides nas respostas comportamentais no teste de suspensão pela cauda de animais submetidos ao protocolo de CUS. Animais controle (não-estressados, tratados com veículo) ou submetidos ao protocolo de CUS por 10 dias (tratados por 7 dias com veículo, escitalopram, CBD, URB597, Escitalopram+CBD ou Escitalopram+URB597) ($n=9-13/\text{grupo}$) foram testados quanto (A) a latência para o primeiro episódio de imobilidade e (B) quanto ao tempo de imobilidade total. Valores expressos como Média $\pm$ EPM; (*) Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste t de amostras independentes).

A semelhança do que foi realizado para os dados do protocolo de SDS, também foi analisado, no caso do protocolo de CUS, o decurso temporal e a imobilidade a cada minuto do TST. ANOVA de medidas repetidas indicou que houve uma interação entre os fatores tempo e condição (estresse ou não-estresse) com relação ao decurso temporal da resposta de imobilidade ao longo do TST (Wilks' Lambda; $F_{(5,17)}=3,565$, $p=0,022$) e indicou que houve um efeito significativo do fator condição ($F_{(1,21)}=7,863$, $p=0,011$). Análise de cada ponto do decurso temporal indicou uma diferença no tempo de imobilidade a partir do segundo minuto de teste que se manteve até o final do TST (teste t de amostras independentes; Minuto 2: $t_{(13,707)}=3,267$, $p=0,006$; Minuto 3: $t_{(21)}=3,044$, $p=0,006$; Minuto 4: $t_{(21)}=2,956$, $p=0,008$; Minuto 5: $t_{(21)}=2,342$, $p=0,029$; Minuto 6: $t_{(21)}=2,363$, $p=0,028$). Considerando apenas os animais submetidos ao modelo de estresse, não houve um efeito significativo dos tratamentos, tampouco uma interação entre tempo, tratamento 1 e tratamento 2 (ANOVA de medidas repetidas repetidas; $F_{(10,100)}=0,822$, $p=0,609$) (Figura 15A).

No que se refere a imobilidade em cada minuto do TST, observou-se que o grupo estressado tratado com veículo apresentou um tempo de imobilidade significativamente maior do que o grupo não-estressado durante o segundo minuto do teste ($t_{(14,009)}=3,489$, $p=0,004$). Ao considerar apenas os animais dos grupos submetidos ao CUS para análise, o único *time-point* em que foi observado um efeito significativo do tratamento foi o quinto minuto de teste. Nesse minuto, o grupo tratado com escitalopram em combinação com CBD apresentou um tempo de imobilidade significativamente menor em comparação ao grupo estressado tratado apenas com veículo (ANOVA de duas vias; ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan) (Figura 15B).

Figura 15. Efeito da combinação de escitalopram com CBD ou URB597 no perfil temporal de imobidade de animais submetidos ao protocolo de CUS no TST. Foi avaliado em animais controle (não-estressados, tratados com veículo) ou submetidos ao protocolo de SDS por 10 dias (tratados por 7 dias com veículo, escitalopram, CBD, URB597, Escitalopram+CBD ou Escitalopram+URB597) (n=9-13/grupo) (A) o decurso temporal da resposta de imobidade ao longo do teste e (B) a imobidade a cada minuto do teste. Valores expressos como Média $\pm$ EPM; (*) Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; (#) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo CUS Veí/Veí (teste t de amostras independentes; ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan).

4.1.3. A combinação de escitalopram e CBD reduz a resposta de hiponeofagia em camundongos estressados

O efeito da combinação de escitalopram e canabinóides em camundongos estressados também foi testado quanto a resposta dos animais no NSF. No modelo de SDS, um grupo independente de animais foi submetido ao teste de NSF ao fim dos 10 dias de estresse e 7 dias de tratamento. Ao analisar a normalidade dos dados através do teste de Kolmogorov-Smirnov, observou-se que os dados dos grupos Controle ($D_{(13)}=0,748$, $p=0,004$), SDS Escitalopram+CBD ($D_{(10)}=0,312$, $p=0,007$) e SDS Escitalopram+URB597 ($D_{(10)}=0,279$, $p=0,027$) não apresentaram uma distribuição normal. Em vista disso, foi realizada a transformação logarítmica de todos os dados, o que fez com que a distribuição de todos os grupos se enquadrasse dentro de uma distribuição normal. As análises estatísticas foram, então, conduzidas utilizando os dados obtidos pela transformação logarítmica. Não houve uma diferença significativa entre o grupo SDS tratado apenas com veículo e o grupo controle, não-estressado (teste t de amostras independentes; $t_{(15,707)}=0,228$, $p=0,823$). ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento 2 ($F_{(2,50)}=5,433$, $p=0,007$), mas não do tratamento 1 (Veículo ou Escitalopram; $F_{(1,50)}=0,286$, $p=0,595$), tampouco uma interação entre os tratamentos ($F_{(2,50)}=1,033$, $p=0,364$). Em animais submetidos a 10 dias de SDS, o tratamento por uma semana com escitalopram em combinação com CBD foi capaz de reduzir significativamente a latência para consumo de alimento no contexto de neofobia em comparação ao grupos tratados apenas com veículo ou apenas com escitalopram (ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan; $F_{(5,50)}=2,691$, $p=0,031$). Ademais, os camundongos estressados que receberam tratamento com URB597 isoladamente apresentaram uma redução da resposta de hipofagia induzida por neofobia manifestada por uma menor latência no teste de NSF

em comparação ao grupo tratado apenas com veículo (ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Duncan, $F_{(5,50)}=2,691$, $p=0,031$). A combinação de escitalopram e URB597 apresentou latência para consumo de alimento no NSF estatisticamente menor do que o grupo SDS tratado com escitalopram isoladamente (Figura 16A).

Quanto ao consumo de alimentos na *home-cage*, teste t de amostras independentes indicou que os animais estressados tratados apenas com veículo apresentaram um maior consumo de alimentos na home-cage em comparação aos animais controle, não estressados ($t_{(19)}= 2,821$, $p=0,011$). Considerando apenas os animais submetidos ao modelo de SDS, ANOVA de duas vias não revelou um efeito significativo dos tratamentos (Tratamento 1: $F_{(1,49)}=1,414$, $p=0,240$; Tratamento 2: $F_{(2,49)}=0,288$, $p=0,751$), mas houve uma interação entre os tratamentos ($F_{(2,49)}=3,283$, $p=0,046$). ANOVA de uma via não indicou uma diferença estatisticamente significativa, embora o *post-hoc* de Duncan tenha indicado uma diferença entre os grupos estressados tratados apenas com veículo ou com escitalopram isoladamente ($F_{(5,50)}=1,601$, $p=0,177$) (Figura 16B).

Figura 16. Efeito da combinação de escitalopram com CBD ou URB597 nas respostas comportamentais no teste de *novelty-suppressed feeding* de animais submetidos ao protocolo de SDS. Animais controle (não-estressados, tratados com veículo) ou submetidos ao protocolo de SDS por 10 dias (tratados por 7 dias com veículo, escitalopram, CBD, URB597, Escitalopram+CBD ou Escitalopram+URB597) (n=8-13/grupo) foram testados quanto (A) a latência para consumo de alimento em um ambiente novo e (B) ao consumo de comida nas *home-cage* como uma medida controle. Valores expressos como Média $\pm$ EPM; (*) Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; (#) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo SDS Veículo+Veículo (Teste t de amostras independentes; ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan).

No protocolo de CUS, os mesmos animais testados no TST foram também testados no NSF. Assim como para os dados do SDS, para as análises dos resultados dos grupos de animais estressados foi realizada uma transformação logarítmica. Não foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle, não estressado, e o grupo CUS tratado apenas com veículo (teste t de amostras independentes; $t_{(23)}=0,377$, $p=0,704$). ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do tratamento 1 ($F_{(1,74)}=0,43$, $p=0,043$), mas não do tratamento 2 ($F_{(2,74)}=2,879$, $p=0,062$). Houve, ainda, uma interação entre os tratamentos ($F_{(2,74)}=3,471$, $p=0,036$). O grupo de animais estressados que recebeu tratamento com escitalopram em combinação com CBD apresentou uma latência significativamente menor em relação a todos os outros grupos de animais estressados (ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan; $F_{(6,73)}=2,832$, $p=0,016$) Com relação ao consumo de comida na *home-cage*, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos avaliados nesse protocolo (Figura 17).

Figura 17. Efeito da combinação de escitalopram com CBD ou URB597 nas respostas comportamentais no teste de *novelty-suppressed feeding* de animais submetidos ao protocolo de CUS. Animais controle (não-estressados, tratados com veículo) ou submetidos ao protocolo de CUS por 10 dias (tratados por 7 dias com veículo, escitalopram, CBD, URB597, Escitalopram+CBD ou Escitalopram+URB597) (n=9-14/grupo) foram testados quanto (A) a latência para consumo de alimento em um ambiente novo e (B) ao consumo de comida nas *home-cage* como uma medida controle. Valores expressos como Média $\pm$ EPM; (#) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo SDS Veículo+Veículo (ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan).

4.1.4. Os efeitos comportamentais da combinação de escitalopram e canabinóides não estão relacionadas a alterações locomotoras

Para verificar o efeito dos protocolos de estresse e tratamento sobre a atividade locomotora, foi avaliada a distância percorrida pelos animais no *open field*. No protocolo de SDS, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo não-estressado e o grupo SDS tratado apenas com veículo (teste t de amostras independentes; $t_{(16)}=1,437$, $p=0,170$). Também não foram observadas efeitos significativos de nenhum dos tratamentos (Tratamento 1: $F_{(1,47)}=0,026$, $p=0,873$; Tratamento 2: $F_{(2,47)}=2,991$, $p=0,060$) e não houve interação entre os tratamentos ($F_{(2,47)}=1,567$, $p=0,219$) (Figura 18A).

No protocolo de CUS, observou-se que os animais expostos ao CUS e tratados apenas com veículo percorreram uma distância significativamente maior no *open field* em comparação ao grupo controle (teste t de amostras independentes; $t_{(23)}=2,116$, $p=0,045$). Considerando apenas os grupos submetidos ao CUS, ANOVA de duas vias não indicou um efeito significativo dos fatores tratamento 1 ($F_{(1,61)}=0,015$, $p=0,904$) e do tratamento 2 ($F_{(2,61)}=1,259$, $p=0,291$) e não houve interação entre os tratamentos ($F_{(2,61)}=0,769$, $p=0,468$) (Figura 18B).

Figura 18. Efeito da combinação escitalopram com CBD ou URB597 na locomoção de animais estressados. Distância percorrida (m) em 5 minutos no *open field* por animais controle (não-estressados, tratados com veículo) ou submetidos aos protocolos de (A) SDS (n=8-10) ou (B) CUS (n=10-14) por 10 dias (tratados por 7 dias com veículo, escitalopram, CBD, URB597, Escitalopram+CBD ou Escitalopram+URB597). Dados representados como Média $\pm$ EPM; (*) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, não-estressado, do protocolo de CUS (teste t de amostras independentes).

4.2. Efeitos neuroplásticos

4.2.1. Efeitos sobre plasticidade sináptica: Expressão de proteínas vesiculares

Após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados, tiveram seus cérebros retirados e dissecados para separação do hipocampo e do córtex pré-frontal, os quais foram posteriormente processados para avaliar a expressão proteica através da técnica de *western blot*.

Quanto a expressão de proteínas da maquinaria vesicular no hipocampo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e o grupo de animais estressados tratados apenas com veículo (teste t de amostras independentes; Sinaptofisina: $t_{(3,532)}=0,206$, $p=0,847$; Sinaptotagmina: $t_{(6)}=1,826$, $p=0,118$; Sinapsina 1: $t_{(5)}=0,046$, $p=0,965$). De forma similar, no PFC não foram encontradas diferenças quanto a expressão de proteínas da maquinaria vesicular (teste t de amostras independentes; Sinaptofisina: $t_{(6)}=0,489$, $p=0,642$; Sinaptotagmina: $t_{(3,550)}=1,569$, $p=0,201$; Sinapsina 1: $t_{(3,683)}=0,287$, $p=0,790$) (Figuras 19-21).

No que se refere apenas a expressão hipocampal de sinaptofisina em animais estressados, ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do Tratamento 1 (Veículo ou Escitalopram; $F_{(1,17)}=14,681$, $p=0,001$) e do Tratamento 2 (Veículo, CBD ou URB597; $F_{(2,17)}=5,948$, $p=0,011$). Foi observada, ainda, uma interação significativa entre os tratamentos ($F_{(2,17)}=8,203$, $p=0,003$). Ademais, ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan indicou que animais tratados com a combinação de Escitalopram e URB597 apresentaram um maior nível de expressão de sinaptofisina no hipocampo em comparação ao observado nos demais grupos. A expressão de sinaptofisina foi, ainda, mais elevada no grupo que recebeu tratamento com a

combinação de Escitalopram e CBD em comparação aos grupos tratados com escitalopram e CBD sozinhos (ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan) (Figura 19A).

No PFC de animais estressados, ANOVA de duas vias indicou que, quanto a expressão de sinaptofisina, houve um efeito significativo tanto do tratamento 1 ($F_{(1,18)}=5,166$; $p=0,036$) quanto do tratamento 2 ($F_{(2,18)}=3,572$; $p=0,049$) e foi evidenciada uma interação significativa entre os tratamentos ($F_{(2,18)}=7,437$; $p=0,004$). O grupo tratado com a combinação de escitalopram e CBD apresentou uma expressão significativamente maior de sinaptofisina em comparação aos grupos que receberam apenas tratamento com veículo ou com escitalopram e CBD isoladamente (ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan) (Figura 19B).

Figura 19. Efeito da combinação escitalopram com CBD ou URB597 a expressão de sinaptofisina no hipocampo e córtex pré-frontal (PFC) de animais submetidos ao SDS. Expressão relativa, normalizada por alfa-tubulina, de sinaptofisina no hipocampo (A) e PFC (B) de camundongos submetidos ao SDS e tratados por 7 dias com as combinações de Veículo ou Escitalopram com Veículo, CBD ou URB597 (n=4). Dados representados como porcentagem relativa à média de expressão relativa do grupo controle. (#) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo SDS Veí/Veí (ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan).

Com relação a expressão relativa de sinaptotagmina em animais estressados, não foram encontrados efeitos significativos dos fatores tratamento 1 e tratamento 2 tanto nas amostras de hipocampo (Tratamento 1: $F_{(1,18)}=0,500$, $p=0,489$; Tratamento 2: $F_{(2,18)}=2,767$, $p=0,090$) quanto nas amostras de PFC (Tratamento 1: $F_{(1,18)}=0,006$, $p=0,937$; Tratamento 2: $F_{(2,18)}=1,512$, $p=0,247$). No entanto, no PFC, mas não no hipocampo, houve uma significativa interação entre os tratamentos ($F_{(2,18)}=3,866$, $p=0,040$), indicando que o efeito sobre a expressão de sinaptotagmina foi distinto dependendo da combinação de tratamentos (Figura 20A). ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan indicou que os grupos SDS tratados com URB597 ou com a combinação de escitalopram e CBD apresentaram uma expressão relativa de sinaptotagmina no hipocampo maior em comparação ao grupo SDS que recebeu tratamento apenas com veículo (Figura 20B).

Figura 20. Efeito da combinação escitalopram com CBD ou URB597 a expressão de sinaptotagmina no hipocampo e córtex pré-frontal (PFC) de animais submetidos ao SDS. Expressão relativa, normalizada por alfa-tubulina, de sinaptotagmina no hipocampo (A) e PFC (B) de camundongos submetidos ao SDS e tratados por 7 dias com as combinações de Veículo ou Escitalopram com Veículo, CBD ou URB597 (n=4). Dados representados como porcentagem relativa à média de expressão relativa do grupo controle. (#) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo SDS Veí/Veí (ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan).

No que se refere a expressão de sinapsina 1a/b no hipocampo de animais estressados, ANOVA de duas vias não indicou um efeito significativo do tratamento 1 ($F_{(1,15)}=0,657$, $p=0,430$) ou do tratamento 2 ($F_{(2,15)}=0,106$, $p=0,900$), mas revelou uma significativa interação entre os tratamentos ($F_{(2,15)}=3,942$, $p=0,042$), o que indica que a expressão relativa dessa proteína foi distinta dependendo da combinação de tratamentos. ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan não indicou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 21A).

No PFC, observou-se um efeito significativo tanto do tratamento 1 (ANOVA de duas vias; $F_{(1,18)}=4,477$, $p=0,049$) quanto do tratamento 2 ($F_{(2,18)}=4,763$, $p=0,022$), mas não houve interação entre os tratamentos ($F_{(2,18)}=1,629$, $p=0,224$). O grupo SDS que recebeu tratamento com a combinação de escitalopram e URB597 apresentou uma expressão relativa de sinapsina 1a/b significativamente maior do que os grupos SDS que receberam apenas veículo ou escitalopram e URB597 isoladamente (ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan) (Figura 21B).

4.2.2. Efeitos sobre plasticidade sináptica: PSD95, BDNF e β -Actina

A expressão relativa do marcador de estabilidade sináptica, PSD95, foi avaliada no hipocampo e PFC de animais submetidos ao SDS. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas com relação a expressão dessa proteína ao se comparar o grupo controle, não estressado, e o grupo SDS tratado apenas com veículo tanto nas amostras hipocâmpais (teste t de amostras independentes; $t_{(6)}=0,206$, $p=0,844$) quanto nas amostras de PFC ($t_{(6)}=0,314$, $p=0,764$) (Figura 20A-B).

Considerando apenas os grupos submetidos ao protocolo de SDS, ANOVA de duas vias mostrou que não houve um efeito significativo do fator tratamento 1 (Hipocampo: $F_{(1,18)}=3,981$, $p=0,061$; PFC: $F_{(1,18)}=1,439$, $p=0,246$), do fator tratamento 2 (Hipocampo: $F_{(2,18)}=2,461$, $p=0,114$; PFC: $F_{(2,18)}=1,188$, $p=0,328$) e da interação entre os fatores (Hipocampo: $F_{(2,18)}=0,258$, $p=0,775$; PFC: $F_{(2,18)}=0,982$, $p=0,394$). ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan também não indicou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento (Figura 22A-B).

Figura 22. Efeito da combinação escitalopram com CBD ou URB597 a expressão de PSD95 no hipocampo e córtex pré-frontal (PFC) de animais submetidos ao SDS. Expressão relativa, normalizada por alfa-tubulina, de PSD95 no hipocampo (A) e PFC (B) de camundongos submetidos ao SDS e tratados por 7 dias com as combinações de Veículo ou Escitalopram com Veículo, CBD ou URB597 (n=4). Dados representados como porcentagem relativa à média de expressão relativa do grupo controle.

Foi avaliada, ainda, a expressão relativa do fator neurotrófico BDNF. Tanto no hipocampo quanto no PFC, a expressão relativa de BDNF do grupo SDS tratado apenas com veículo não foi estatisticamente diferente da expressão encontrada para o grupo controle (teste t de amostras independentes; Hipocampo: $t_{(5)}=0,230$, $p=0,827$; PFC: $t_{(3,621)}=1,560$, $p=0,201$). Considerando apenas o grupo de animais submetidos ao SDS, o teste de Levene indicou que os dados de expressão relativa de BDNF no hipocampo não apresentaram homogeneidade de variâncias ($F_{(5,15)}=3,225$, $p=0,036$). A transformação logarítmica dos dados, entretanto, foi capaz de gerar homocedasticidade ($F_{(5,15)}=2,582$, $p=0,071$). A partir dos dados da transformação logarítmica, observou-se que não houve um efeito significativo dos fatores tratamento 1 (ANOVA de duas vias; $F_{(1,15)}=0,080$, $p=0,781$) e tratamento 2 ($F_{(2,15)}=0,723$, $p=0,501$), tampouco uma interação entre os fatores ($F_{(2,15)}=0,027$, $p=0,973$). ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan não indicou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos SDS (Figura 23A). No PFC, também não foi observado um efeito significativo de nenhum dos tratamentos (ANOVA de duas vias; Tratamento 1: $F_{(1,18)}=0,143$, $p=0,709$; Tratamento 2: $F_{(2,18)}=1,691$, $p=0,212$) e não houve interação entre os tratamentos ($F_{(2,18)}=0,437$, $p=0,653$). A comparação entre cada grupo individualmente também não indicou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 23B).

Figura 23. Efeito da combinação escitalopram com CBD ou URB597 a expressão de BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal (PFC) de animais submetidos ao SDS. Expressão relativa, normalizada por alfa-tubulina, de BDNF no hipocampo (A) e PFC (B) de camundongos submetidos ao SDS e tratados por 7 dias com as combinações de Veículo ou Escitalopram com Veículo, CBD ou URB597 (n=3-4). Dados representados como porcentagem relativa à média de expressão relativa do grupo controle.

A β -actina é uma proteína de citoesqueleto, particularmente importante para a morfologia neurítica, e teve sua expressão relativa avaliada para investigar um possível indício de alterações morfológicas. No hipocampo, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo de animais submetidos ao SDS e tratados apenas com veículo (teste t de amostras independentes; $t_{(6)}=1,688$, $p=0,142$). Considerando apenas os grupos submetidos ao SDS, ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo tanto do tratamento 1 ($F_{(1,18)}=7,973$, $p=0,011$) quanto do tratamento 2 ($F_{(2,18)}=7,033$, $p=0,006$). Não houve uma interação entre os tratamentos ($F_{(2,18)}=2,599$, $p=0,102$). Os grupos de camundongos estressados tratados com a combinação de escitalopram e CBD ou com a combinação de escitalopram e URB597 apresentaram uma expressão relativa de β -actina significativamente maior do que o grupo estressado que recebeu tratamento apenas com veículo (ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan; $F_{(5,18)}=5,447$, $p=0,003$) (Figura 24A).

No PFC, teste t de amostras independentes não revelou uma diferença significativa entre o grupo controle e o grupo estressado tratado apenas com veículo ($t_{(6)}=2,112$, $p=0,079$), ainda que a média do grupo SDS Veí+Veí tenha sido 64% dos valores encontrados no controle. Considerando apenas os dados dos grupos submetidos ao SDS, não foi observado um efeito significativo do fator tratamento 1 (ANOVA de duas vias; $F_{(1,18)}=0,083$, $p=0,777$), do fator tratamento 2 ($F_{(2,18)}=0,012$, $p=0,989$) e da interação entre os fatores ($F_{(2,18)}=0,851$, $p=0,444$). ANOVA de uma via seguida de teste de Duncan também não encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos de tratamento.

Figura 24. Efeito da combinação escitalopram com CBD ou URB597 a expressão de β -actina no hipocampo e córtex pré-frontal (PFC) de animais submetidos ao SDS. Expressão relativa, normalizada por alfa-tubulina, de β -actina no hipocampo (A) e PFC (B) de camundongos submetidos ao SDS e tratados por 7 dias com as combinações de Veículo ou Escitalopram com Veículo, CBD ou URB597 (n=4). Dados representados como porcentagem relativa à média de expressão relativa do grupo controle. (#) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo SDS Veí/Veí (ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan).

4.2.3. Efeitos sobre plasticidade sináptica: Espinhos dendríticos

Para continuar a investigar o efeito do estresse e das diferentes combinações de tratamento sobre manifestações de plasticidade sináptica, foi avaliado a densidade e a morfologia de espinhos dendríticos em dendritos secundários de neurônios granulares do giro dentado do hipocampo. Quanto a densidade de espinhos dendríticos (número de espinhos por micrômetro), não houve uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo SDS que recebeu tratamento apenas com veículo (teste t de amostras independentes; $t_{(8)}=0,582$, $p=0,577$). Considerando apenas os grupos submetidos ao SDS, ANOVA de duas vias indicou que não houve um efeito significativo do tratamento 1 ($F_{(1,21)}=0,003$, $p=0,954$) e do tratamento 2 ($F_{(2,21)}=0,152$, $p=0,860$) e não houve, ainda, interação entre os tratamentos ($F_{(2,21)}=1,387$, $p=0,272$). ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan não indicou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento (Figura 25B).

O grupo SDS que recebeu tratamento apenas com veículo não diferiu de maneira significativa do grupo controle não-estressado com relação a porcentagem de nenhuma das morfologias de espinhos dendríticos (teste t de amostras independentes; *Stubby*: $t_{(8)}=1,331$, $p=0,220$; *Thin*: $t_{(8)}=0,811$, $p=0,441$; *Filopodia*: $t_{(8)}=0,490$, $p=0,637$; *Mushroom*: $t_{(8)}=1,597$, $p=0,149$). No que se refere apenas aos grupos submetidos ao SDS, para todas as morfologias, com exceção de *stubby*, ANOVA de duas vias não indicou um efeito significativo de nem do tratamento 1 (*Thin*: $F_{(1,21)}=1,111$, $p=0,304$; *Filopodia*: $F_{(1,21)}=1,139$, $p=0,130$; *Mushroom*: $F_{(1,21)}=0,009$, $p=0,925$), nem do tratamento 2 (*Thin*: $F_{(2,21)}=2,255$, $p=0,304$; *Filopodia*: $F_{(2,21)}=0,625$, $p=0,545$; *Mushroom*: $F_{(2,21)}=1,556$, $p=0,234$), tampouco uma interação entre os tratamentos (*Thin*: $F_{(2,21)}=1,116$, $p=0,346$; *Filopodia*: $F_{(2,21)}=1,104$, $p=0,350$;

Mushroom: $F_{(2,21)}=0,065$, $p=0,938$). Com relação a porcentagem de espinhos com a morfologia *stubby*, entretanto, houve um efeito significativo do tratamento 1 (ANOVA de duas vias; $F_{(1,21)}=5,088$, $p=0,035$) e do tratamento 2 ($F_{(2,21)}=4,436$, $p=0,025$), mas não houve interação entre os tratamentos ($F_{(2,21)}=0,272$, $p=0,765$). ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan revelou que o grupo de animais submetidos ao SDS e tratados com escitalopram apresentaram uma porcentagem de espinhos com a morfologia *stubby* maior em comparação ao grupo SDS que recebeu tratamento com a combinação de escitalopram e CBD. Com relação a porcentagem das outras morfologias de espinhos dendríticos, ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan não indicou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento (Figura 25C).

Figura 25. Efeito da combinação escitalopram com CBD ou URB597 no número e morfologia de espinhos dendríticos de neurônios granulares do giro dentado do hipocampo de animais submetidos ao SDS. (A) Representação de um neurônio granular do giro dentado do hipocampo escaneado por microscopia confocal. O gradiente de cor indica a profundidade dos segmentos do neurônio no eixo Z. Na figura, há a indicação do corpo celular, dendrito primário e dendrito secundário, de onde foram quantificados (B) número de espinhos dendríticos por micrômetro e (C) porcentagem de espinhos dendríticos correspondente a cada morfologia (*stubby*, *thin*, *filopodia* ou *mushroom*) de camundongos submetidos ao SDS e tratados por 7 dias com as combinações de Veículo ou Escitalopram com Veículo, CBD ou URB597 (n=4-6). Dados representados como Média $\pm$ EPM.

DISCUSSÃO

5. Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que, enquanto a dose de 10 mg/kg de escitalopram alterou o comportamento de animais estressados apenas após 3 semanas de tratamento, a combinação dessa mesma dose de escitalopram com CBD foi capaz de afetar, nos testes de NSF e TST, as respostas de animais submetidos à protocolos de estresse repetido após 7 dias de tratamento. Portanto, a combinação desses fármacos foi capaz de atingir respostas tidas como preditivas de efeito do tipo-antidepressivo ou do tipo-ansiolítico em um intervalo de tempo menor do que o antidepressivo sozinho, indicando que a combinação com CBD foi capaz de, de certa forma, “acelerar” os efeitos comportamentais do escitalopram em camundongos estressados. A dose de CBD utilizada (7,5 mg/kg) foi 4 vezes menor do que a reportada em outros estudos como efetiva em modelos animais de estresse crônico (30 mg/kg) (CAMPOS et al., 2013b; FOGAÇA et al., 2018).

Em vista de sua alta seletividade para ligação ao transportador de 5-HT, escitalopram foi considerado, no começo dos anos 2000, como uma possibilidade de refinamento no tratamento de depressão e transtornos de ansiedade (CULPEPPER, 2002). Adicionalmente a sua ligação ao sítio ortostático do transportador, escitalopram atua em um sítio alostérico, modulando negativamente a sua própria dissociação do sítio ortostático (ZHONG; HADDJERI; SÁNCHEZ, 2012). Essas características provavelmente contribuem para a melhor aceitabilidade reportada por pacientes tratados com escitalopram em comparação a outros agentes antidepressivos (SANCHEZ; REINES; MONTGOMERY, 2014). Alguns estudos propõem, ainda, que escitalopram poderia ter efeito em um menor intervalo de tempo em comparação a outros antidepressivos (GOURION, 2008; KASPER et al., 2006; WADE; FRIIS ANDERSEN, 2006). Essa menor latência, entretanto, se reflete apenas em alguns dos

102

sintomas e a efetividade do escitalopram é, em geral, equivalente à de outros antidepressivos (CIPRIANI et al., 2018; NIERENBERG et al., 2007; WADE; FRIIS ANDERSEN, 2006). A combinação com canabinóides, abordagem investigada nesse estudo, pode aliar as vantagens do escitalopram (como sua alta tolerabilidade) a possibilidade de otimização da sua ação.

Semelhante a outros antidepressivos, em modelos animais baseados na exposição ao estresse crônico, escitalopram gera efeitos comportamentais após tratamento prolongado. Burstein e colaboradores (2017) expuseram camundongos a 4 semanas de CUS e reportaram que o tratamento por 3 semanas com escitalopram (15 mg/kg) reverteu o estado do tipo-anedônico de animais estressados. Isso está em consonância com o que foi observado no presente estudo. Em animais submetidos a 3 semanas de CUS, o tratamento concomitante com escitalopram na dose de 10 mg/kg protegeu das consequências comportamentais do estresse. Enquanto nos camundongos estressados tratados apenas com veículo houve um aumento do tempo de imobilidade no TST, nos animais que foram submetidos ao mesmo protocolo de estresse, mas que receberam tratamento com escitalopram, essa alteração comportamental não foi observada. Embora nos resultados descritos no presente estudo o tratamento com escitalopram em animais expostos ao CUS não tenha alterado de modo significativo a resposta dos animais estressados, com o aumento do número amostral, em estudo conduzido por Aguiar e colaboradores (dados não publicados), foi encontrado um efeito significativo do tratamento com escitalopram em reduzir a latência para consumo de alimento de animais estressados no NSF.

Após 7 dias, por outro lado, o tratamento com a dose de 10 mg/kg de escitalopram não alterou significativamente as respostas dos animais estressados e, nos animais controle, o tratamento gerou um fenótipo oposto ao que é tido como

103

preditivo de um efeito do tipo-antidepressivo: os animais tratados com escitalopram apresentaram um aumento do tempo de imobilidade e uma redução da latência para o primeiro episódio de imobilidade. Um efeito semelhante foi relatado por Shoeb e colaboradores (2013) em ratos testados no teste do nado forçado e tratados com o ISRS fluoxetina. Em camundongos, as doses de 14 e 22mg/kg de fluoxetina geraram um aumento da imobilidade no teste de nado forçado após 4 semanas de tratamento (KOBAYASHI; IKEDA; SUZUKI, 2011). Existe a possibilidade de que, por terem sido testados, nesse protocolo, 48 horas depois da última administração de escitalopram, o grupo controle tenha manifestado alterações comportamentais em resposta a descontinuação do tratamento. Bosker e colaboradores (2010) reportaram alterações comportamentais em ratos após 48 horas da descontinuação do tratamento prolongado com citalopram. Além disso, Morelli e colaboradores (2011) relataram que o tratamento por 4 semanas com fluoxetina gerou alterações em parâmetros locomotores. A resposta locomotora dos animais não foi avaliada nesse protocolo, mas não se pode descartar a possibilidade de que o tratamento com escitalopram possa ter gerado alterações locomotoras que poderiam potencialmente interferir com o comportamento avaliado no TST. É necessário, no entanto, um estudo mais detalhado para melhor caracterizar essa resposta de animais naïve ao tratamento por 7 dias com escitalopram.

Ao se avaliar o efeito da combinação de drogas, usualmente objetiva-se caracterizar fenômenos de sinergismo, adição ou antagonismo (TALLARIDA, 2011). As estratégias para investigação desses fenômenos podem ser baseadas no efeito ou baseadas na dose-efeito (FOUCQUIER; GUEDJ, 2015). Estratégias baseadas na dose-efeito partem do princípio de que o efeito aditivo de duas drogas depende das curvas dose-efeito de cada uma dessas drogas individualmente. Assumindo uma

razão de potência constante, é possível prever a aditividade, ou seja, é possível assumir as doses de cada uma das drogas que, ao combinadas, gerariam um efeito X correspondente a adição dos efeitos de cada droga individualmente (ZHAO; AU; WIENTJES, 2010). A partir disso, se as doses necessárias para gerar um efeito X forem menores do que o que seria esperado em um fenômeno de adição, caracteriza-se um efeito sinérgico (FOUCQUIER; GUEDJ, 2015). Por outro lado, as estratégias baseadas em efeito não permitem uma caracterização tão clara de fenômenos de sinergismo ou adição e se baseiam na comparação do efeito da combinação das drogas com os efeitos de cada droga individualmente (FOUCQUIER; GUEDJ, 2015). Estratégias baseadas em efeito incluem o modelo de independência de Bliss (que assume que as drogas atuam de modo independente em sítios de ação distintos), a aditividade de resposta (que parte de um efeito esperado resultante da soma dos efeitos de cada droga individualmente), a abordagem do *highest combination agent* (que avalia se há superioridade no efeito da combinação em relação ao efeito das drogas individualmente) e a de combinação sub-efetiva (que se baseia no uso de doses sub-efetivas de ambas as drogas) (FOUCQUIER; GUEDJ, 2015). A estratégia utilizada nesse estudo foi a de combinação sub-efetiva, utilizando doses que não afetaram significativamente as respostas de animais estressados (com exceção do URB597, como será discutido posteriormente) e comparando o efeito da combinação a resposta de um grupo não tratado (ou tratado apenas com veículo). Em estudos pré-clínicos utilizando modelos animais, especialmente avaliando respostas comportamentais, a caracterização detalhada de fenômenos de interação farmacológica é dificultada pela limitação de tempo, pelo reduzido tamanho da amostra avaliada e pela variabilidade de resposta (CHOU, 2010). Dessa forma, apesar de a estratégia empregada no presente estudo não fornecer informações mais

precisas sobre a natureza do fenômeno de interação (adição ou sinergismo), é uma abordagem adequada para a proposta e para a metodologia empregada e está de acordo com uma vasta literatura no campo de psicofarmacologia que se vale da mesma estratégia para avaliar a ação combinada de diferentes compostos (BÉTRY et al., 2015; BROWN et al., 2011; CHRISTENSEN et al., 2012; HUANG et al., 2013; LIU et al., 2013; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ et al., 2014).

Os efeitos comportamentais da combinação de antidepressivos e canabinóides já foram avaliados em protocolos agudos. Adamczyk e colaboradores (2008) investigaram o efeito da combinação de imipramina ou citalopram com drogas que facilitam a função do sistema endocanabinóide (AM404 – inibidor da captação de endocabinóides – , URB597 ou CP55,940 – agonista CB1). Os resultados indicaram que a combinação com AM404, com URB597 ou com CP55,940 potencializou o efeito da imipramina de reduzir o tempo de imobilidade de ratos no teste do nado forçado. AM404 foi também capaz de potencializar a ação do ISRS citalopram. Outro estudo mostrou que o agonista CB1 ACEA (araquinoil-2-cloroetilamida) em combinação com fluoxetina produziu uma resposta preditiva de efeito do tipo-antidepressivo no teste do nado forçado (RUTKOWSKA; JACHIMCZUK, 2004). De maneira interessante, a combinação de sertralina ou citalopram com o antagonista CB1 SR141716A ou com o agonista inverso CB1 AM251 também gerou uma resposta preditiva de um efeito do tipo-antidepressivo no TST (TAKAHASHI et al., 2008). O presente estudo é o primeiro, entretanto, a evidenciar que, em modelos de estresse crônico, a combinação de um antidepressivo com o canabinóide CBD é capaz de gerar respostas comportamentais em um intervalo de tempo menor do que o requerido para a observação dos efeitos do antidepressivo sozinho.

Existem diferenças entre protocolos de estresse crônico homotípico (ou seja, protocolos baseados na exposição diária ao mesmo estímulo estressor, como o SDS) e de estresse crônico heterotípico (ou seja, protocolos baseados na exposição a diferentes estímulos estressores a cada dia, como o CUS) (COSTA-FERREIRA et al., 2016; KOPP; WICK; HERMAN, 2013). A principal diferença entre esses protocolos de estresse é a adaptabilidade. A exposição a estímulos homotípicos diariamente pode levar a um fenômeno de habituação, com redução da ativação do eixo HPA (GIROTTI et al., 2006). Por outro lado, alterações somáticas e neuroendócrinas parecem ser mais proeminentes após exposição a estímulos heterotípicos (DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015). Apesar dessa diferença, a combinação de escitalopram e CBD alterou as respostas comportamentais tanto de animais submetidos ao CUS quanto de animais submetidos ao SDS, indicando que o efeito do tratamento foi reproduzível em diferentes modelos de estresse crônico.

O presente estudo evidenciou, todavia, uma diferença entre os protocolos de SDS e CUS quanto a responsividade ao tratamento com URB597, inibidor da enzima FAAH. Em animais submetidos ao SDS, o tratamento por 7 dias com URB597, na dose de 0,1 mg/kg, foi capaz de reduzir significativamente a resposta de hipofagia induzida por neofobia no teste de NSF. No entanto, em camundongos submetidos ao protocolo de CUS, a mesma dose de URB597 não foi capaz de alterar significativamente a resposta de animais estressados após 7 dias de tratamento. Essa discrepância dos efeitos do URB597 pode estar relacionada a diferença entre os efeitos de estresses homo ou heterotípicos no que diz respeito a sinalização endocanabinóide. Hill e colaboradores (2010) mostraram que ratos submetidos ao estresse repetido de restrição por 9 dias apresentaram níveis de AEA significativamente reduzidos no hipocampo e PFC. Essa redução nos níveis de AEA

é, inclusive, importante para o fenômeno de habituação do eixo HPA (HILL et al., 2010; PATEL; HILLARD, 2008). Em protocolos de estresse heterotípico, entretanto, estudos indicam que não há uma alteração dos níveis de AEA nessas mesmas regiões cerebrais (BORTOLATO et al., 2007; LOMAZZO et al., 2015). Em vista disso, a inibição farmacológica da degradação da AEA pode ter tido um efeito mais marcante em um contexto em que há uma redução dos níveis de AEA (estresse homotípico) em comparação ao protocolo de estresse heterotípico.

Algumas respostas comportamentais não diferiram significativamente entre os animais controle, não-estressados, e os animais submetidos ao estresse, seja no protocolo de SDS ou no protocolo de CUS. Isso pode estar relacionado ao fenômeno de resiliência, ou seja, a capacidade de adaptação das respostas somáticas e comportamentais frente a exposição ao estresse (RUSSO et al., 2012). Entretanto, existe uma grande dificuldade em se definir, em modelos animais, o que poderia ser tido como resiliência. Em protocolos de SDS, uma das estratégias comumente utilizadas é o uso do teste de interação social (HAMMELS et al., 2015; HODES et al., 2014; HUANG et al., 2016; QU et al., 2018; WOOK KOO et al., 2016). O modelo modificado de SDS utilizado no presente estudo, entretanto, se baseia mais na desestruturação da hierarquia social previamente estabelecida pelos camundongos residentes e não tanto na subordinação ao invasor gerada por protocolos convencionais de SDS. Além disso, o uso de um único parâmetro comportamental (nesse caso, de evasão social) para definir a susceptibilidade a um modelo de estresse pode ser uma supersimplificação do complexo fenômeno de resiliência, principalmente considerando a subjetividade dos critérios de definição e as limitações inerentes ao próprio teste comportamental de ser capaz de ter sensibilidade o suficiente para distinguir os grupos de resposta de uma maneira confiável. A

caracterização de animais como susceptíveis ou resilientes deve passar por um processo cuidadoso de padronização de critérios a partir de um *screening* comportamental que permita a caracterização clara do perfil de resposta dos animais após a exposição ao estresse. Há de se considerar, ainda, que analisar toda a população amostral em protocolos de estresse, sem separar resilientes e susceptíveis, reproduz de forma mais fidedigna o que acontece na população. Afinal, virtualmente todos são expostos a estressores, de maior ou menor intensidade, ao longo da sua vida, mas nem todos desenvolvem sintomas característicos de transtornos psiquiátricos associados ao estresse.

Há a possibilidade, ainda, de que os protocolos de estresse não tenham funcionado. A falha de encontrar alterações comportamentais geradas por estresse também foi reportada em outros estudos (BAEK; PARK; HAN, 2015; BRACHMAN et al., 2016) ou só foram observadas após um maior tempo de exposição ao estresse (JUNG et al., 2014; MATUSZEWICH et al., 2007). Em uma revisão recente, Willner (2017) avaliou e discutiu a confiabilidade e reprodutibilidade do modelo de estresse crônico moderado em laboratórios que utilizaram o modelo entre 2010 e 2015. Dos 3 laboratórios que reportaram dificuldades em observar alterações comportamentais frente a exposição ao estresse, 2 empregavam protocolos de estresse com 2 semanas ou menos de duração (WILLNER, 2017). Os 10 dias de estresse empregados no presente estudo podem, dessa forma, não terem sido suficientes para induzir alterações comportamentais significativas. Além disso, a linhagem de camundongos C57Bl6 já se mostrou menos sensível tanto aos efeitos comportamentais do CUS (DUCOTTET; BELZUNG, 2004) quanto aos efeitos comportamentais do SDS (RAZZOLI et al., 2011a, 2011b). De qualquer forma, a não observação de diferenças estatisticamente significativas entre os animais controle e os animais submetidos ao

estresse não invalida as respostas comportamentais ao tratamento observadas no presente estudo.

Estudos propõem que o efeito de fármacos antidepressivos poderia estar relacionado a promoção de resiliência. Bagot e colaboradores (2017) mostraram que o tratamento com o antidepressivo tricíclico imipramina ou com cetamina, um anestésico que produz um efeito antidepressivo rápido, alterou o padrão de expressão gênica de animais susceptíveis aos efeitos comportamentais do estresse, gerando um padrão de expressão gênica semelhante ao observado em camundongos resilientes. Se a indução de resiliência é um fator relevante para os efeitos comportamentais encontrados no presente estudo frente a combinação de escitalopram e CBD permanece por ser investigado.

No que se refere aos comportamentos avaliados no teste de NSF, a resposta dos animais controle não diferiu de maneira significativa dos animais submetidos ao modelo de SDS. Observando a dispersão dos dados do grupo controle, entretanto, percebe-se a existência de duas populações: a maior população (n=9) com uma latência para comer no novo ambiente abaixo dos 300 segundos e uma população menor (n=4) que atingiu a latência limite do teste (600 segundos). De modo semelhante, no protocolo de CUS, a dispersão do grupo de animais não estressados indica 3 populações de resposta: uma população maior com uma latência abaixo dos 300 segundos (n=9), uma população com uma latência intermediária (entre 300 e 400 segundos, n=3) e uma população que atingiu a latência limite do teste (600 segundos, n=2). A mesma caracterização de populações de resposta poderia ser feita em alguns dos outros grupos dos dois protocolos. É interessante notar, todavia, que a combinação de escitalopram e CBD pareceu causar uma relativa homogeneidade das respostas. No protocolo de SDS, apenas 2 animais tratados com a combinação

110

desses fármacos apresentaram uma latência acima de 300 segundos e, no protocolo de CUS, todos os animais tratados com escitalopram combinado ao CBD comeram em tempo menor do que 300 segundos. A variabilidade entre as respostas dentro do mesmo grupo pode ser resultado de uma série de fatores, incluindo fatores operacionais que podem afetar a resposta a testes comportamentais (barulhos abruptos durante o teste, cheiros, etc), fatores ambientais (condições de *housing* no biotério) e fatores intrínsecos aos animais (susceptibilidade basal a estímulos estressores agudos, respostas defensivas basais, fatores genéticos, etc). Com relação ao protocolo de SDS um ponto importante a ser considerado é que os animais estressados tratados apenas com veículo apresentaram um consumo de comida na *home-cage* significativamente maior em comparação aos animais não estressados, o que pode indicar que os animais expostos ao estresse estavam com mais fome e, portanto, teriam um maior estímulo para comer no teste de NSF do que os animais do grupo controle. Resultados semelhantes foram reportados por Brachman e colaboradores (2016), que encontraram que a exposição a duas semanas de SDS não alterou significativamente a latência para consumo de alimento no novo ambiente no teste de NSF, mas que, por outro lado, os animais expostos ao SDS comeram mais na *home-cage* e apresentaram uma perda de peso mais acentuada durante as 12h de jejum que precederam o NSF do que os animais não expostos ao estresse. Os autores sugeriram que essas respostas podem indicar alterações metabólicas geradas pelo SDS em camundongos (BRACHMAN et al., 2016).

O TST foi utilizado para avaliar as estratégias de enfrentamento adotadas pelos camundongos ao serem expostos a um estresse agudo. Os animais estressados tratados apenas com veículo, seja no modelo de SDS ou no modelo de CUS, apresentaram uma menor latência para manifestar o primeiro episódio de imobilidade

em comparação aos animais não estressados, mostrando que a exposição ao estresse facilitou a manifestação de estratégias passivas de enfrentamento durante a exposição a um estressor agudo. No protocolo de SDS, o tratamento com a combinação de escitalopram e CBD foi capaz de aumentar essa latência, sugerindo que a combinação foi capaz de induzir uma resposta preditiva de um efeito do tipo-antidepressivo no TST. A imobilidade total, entretanto, não foi diferente entre nenhum dos grupos testados do protocolo de SDS. Uma estratégia adotada para refinar a análise no TST é a avaliação do decurso temporal da resposta de imobilidade, discernindo o tempo de imobilidade dos animais a cada minuto do teste (O'REILLY et al., 2006). Nessa abordagem, foi observado que durante o primeiro e quarto minutos de teste os animais submetidos ao SDS e tratados com veículo apresentaram uma maior imobilidade em relação ao grupo controle. Isso indica que a exposição ao estresse alterou as estratégias de enfrentamento adotadas pelos animais. A análise da curva cumulativa de imobilidade ao longo dos 6 minutos de teste revela, ainda, que os animais estressados tratados com a combinação de escitalopram e CBD apresentaram um decurso temporal mais próximo do decurso observado no grupo controle em comparação aos outros grupos de animais estressados. Já no modelo de CUS, foi encontrado que o estresse foi capaz de aumentar significativamente a imobilidade total, mas não houve uma diferença significativa entre os grupos de tratamento. Entretanto, a análise cumulativa de imobilidade ao longo dos 6 minutos de teste mostrou que o padrão da curva do grupo estressado tratado com a combinação de escitalopram e CBD apresenta um deslocamento nos últimos 2 minutos do teste. No quinto minuto de teste, foi observado que os animais do grupo estressado tratado com a combinação de escitalopram e CBD apresentaram uma resposta de imobilidade significativamente menor, indicando que a combinação

desses fármacos alterou a dinâmica comportamental no que diz respeito a adoção de estratégias de enfrentamento no TST.

O tratamento por 7 dias com a combinação de escitalopram e URB597 não alterou significativamente as respostas comportamentais avaliadas no presente estudo em nenhum dos protocolos de estresse. No protocolo de SDS, URB597 sozinho gerou uma redução da latência para consumo de alimento de animais submetidos ao SDS no NSF, mas a combinação dessa droga com escitalopram não alterou significativamente a resposta de animais estressados. Em contrapartida, o grupo de animais que receberam tratamento apenas com o antidepressivo apresentou uma ampla dispersão de dados e uma média maior do que a do grupo estressado tratado apenas com veículo, ainda que não tenha atingido significância estatística. Essa maior dispersão pode ter se refletido nos dados do grupo de animais que receberam o tratamento com escitalopram em combinação com URB597 e contribuído para que os dados desse grupo não tenham sido estatisticamente diferentes do grupo estressado tratado com veículo. De qualquer maneira, essa observação está em consonância com o resultado encontrado por Adamczyk e colaboradores (2008), que descreveram, em um protocolo agudo, que o URB597 não foi capaz de potencializar o efeito do ISRS citalopram no teste de nado forçado. Ainda assim, uma investigação do potencial da combinação de escitalopram e URB597 em modelos de estresse crônico poderia ser complementada pela avaliação do efeito da combinação após um maior tempo de tratamento (14 dias, por exemplo).

Um dos mecanismos propostos para o CBD é a facilitação da sinalização mediada pelo endocanabinóide AEA (LEWEKE et al., 2012). Campos e colaboradores (2013b) reportaram que a superexpressão da enzima FAAH impediu o efeito pró-proliferativo do CBD em cultura de progenitores neurais hipocampais, fomentando um

papel da AEA nas ações do CBD. Além disso, os autores sugerem que o tratamento repetido (14 dias) com esse fitocanabinoide promoveu o aumento dos níveis de AEA, mas não 2-AG, no hipocampo (CAMPOS et al., 2013b). O CBD pode facilitar a ação da AEA por reduzir a degradação do endocanabinóide ao competir pela ligação a proteínas ligadoras de ácidos graxos, que são carreadoras intracelulares que conduzem a AEA até a enzima FAAH para degradação (ELMES et al., 2015). Desse modo, esse mecanismo proposto para a ação do CBD é semelhante a atividade resultante da inibição da degradação de AEA exercida pelo URB597. Considerando os resultados encontrados no presente estudo, entretanto, a facilitação da sinalização mediada por AEA parece não ser suficiente para explicar as respostas comportamentais encontradas, já que, apesar de a combinação de escitalopram com CBD ter tido efeito nos dois modelos de estresse, a combinação de escitalopram com URB597 não gerou o mesmo resultado.

Além de afetar a disponibilidade de AEA, outros mecanismos são atribuídos ao CBD, os quais podem estar relacionados aos efeitos observados frente a combinação do fitocanabinóide com escitalopram. Russo e colaboradores (2005) descreveram o CBD como um agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}. Em modelos animais, esse receptor parece estar envolvido em diversos efeitos comportamentais do CBD. A administração aguda do fitocanabinóide na dose de 30 mg/kg em camundongos naïve gerou uma redução do tempo de imobilidade no teste do nado forçado e esse efeito foi bloqueado pelo antagonista 5-HT_{1A}, WAY100635 (ZANELATI et al., 2010). Esse mesmo antagonista atenuou o efeito do CBD de reduzir a resposta do tipo-ansiosgênica gerada pela exposição ao predador (CAMPOS; FERREIRA; GUIMARÃES, 2012). Fogaça e colaboradores (2014) indicaram, ainda, que a administração de CBD na porção pré-lobulocaudal do PFC gerou uma resposta preditiva de

um efeito do tipo-ansiolítico em ratos expostos a um estresse de restrição agudo, mas esse efeito foi bloqueado pelo antagonista 5-HT_{1A}.

Os receptores 5-HT_{1A} também são considerados relevantes no que se refere a ação do escitalopram (WANG et al., 2016). Ceglia e colaboradores (2004) propuseram que o tratamento por 13 dias com escitalopram gerou uma dessensibilização de receptores 5-HT_{1A} que contribuiu para a indução de um aumento do conteúdo de 5-HT extracelular no PFC. Em pacientes diagnosticados com transtorno de ansiedade social ou transtorno de pânico o tratamento por no mínimo 12 semanas com escitalopram induziu uma significativa redução do *binding* de [C¹¹]WAY100635 a receptores 5-HT_{1A} no hipocampo (SPINDELEGGER et al., 2009). Esses resultados evidenciam um efeito do escitalopram sobre a função de receptores 5-HT_{1A} e são condizentes com a proposta de Blier e de Montigny (1994) de que a dessensibilização desses receptores contribuiria para a efetividade de antidepressivos. Em vista dessas evidências em suporte a hipótese de Blier e de Montigny, associar a ação de inibição da recaptação de 5-HT a uma atuação direta em receptores 5-HT_{1A} tem sido apontada como uma potencial alternativa para aumentar a efetividade e reduzir a latência para observação de uma melhora clínica frente ao tratamento com antidepressivos (Celada, Bortolozzi and Artigas, 2013; Artigas, Bortolozzi and Celada, 2017). Vilazodona é um antidepressivo que apresenta uma ação dual: atua tanto como um inibidor da recaptação de 5-HT quanto como um agonista 5-HT_{1A}. Estudos indicam que tal agente teria um melhor perfil de efeitos colaterais e seria efetivo na prática clínica após uma semana de tratamento (KHAN, 2009; PIERZ; THASE, 2014). Ademais, o agonista parcial de receptores 5-HT_{1A}, buspirona, já é utilizado na clínica como tratamento adjunto para pacientes que não responderam ao tratamento com o antidepressivo sozinho (BAROWSKY; SCHWARTZ, 2006; DIMITRIOU; DIMITRIOU,

1998; MORET, 2005). Considerando esse cenário, é possível que os efeitos resultantes da combinação de escitalopram e CBD estejam relacionados a potencial ação do CBD como agonista 5-HT_{1A}, facilitando a ação do escitalopram de modular a função do sistema serotoninérgico e gerando, assim, efeitos comportamentais após 7 dias de tratamento.

Outro receptor serotoninérgico potencialmente envolvido nos efeitos observados no presente estudo é o 5-HT₃. Bétry e colaboradores (2015) mostraram que o antagonista 5-HT₃ ondansetrona potencializou o efeito comportamental do ISRS paroxetina no teste do nado forçado após um tratamento agudo. Propõe-se que o bloqueio de receptores 5-HT₃ presentes em interneurônios GABAérgicos corticais reduziria o tônus inibitório exercido pelo GABA em neurônios piramidais que se projetam para estruturas mesencefálicas, incluindo núcleos monoaminérgicos, como o núcleo dorsal da rafe e o *locus coeruleus*. Com isso, os neurônios piramidais do PFC regulam a atividade de neurônios serotoninérgicos que se projetam para os próprios neurônios piramidais corticais, o que contribuiria para o aumento da sinalização mediada por 5-HT no PFC (ARTIGAS; ANALIA BORTOLOZZI; PAU CELADA, 2017). Uma vez que CBD já foi descrito como um modulador alostérico negativo de receptores 5-HT₃ (YANG et al., 2010), é possível que esses receptores também participem nos efeitos encontrados no presente estudo .

Os efeitos da combinação de escitalopram e canabidiol também podem estar relacionados a efeitos paralelos dos dois fármacos em diferentes sistemas (como o próprio sistema endocanabinóide, o dopaminérgico, o GABAérgico e o glutamatérgico) (BAKAS et al., 2017; BJORKHOLM et al., 2015; GOBIRA et al., 2015; HOLM et al., 2011; LINGE et al., 2016; RENARD et al., 2017; SHALABY; KAMAL, 2009; ZHANG et al., 2015), em outros processos (como mecanismos neuroimunes ou processos

metabólicos) (BENATTI et al., 2018; DE FILIPPIS et al., 2011; KOZELA et al., 2011; MARTÍN-MORENO et al., 2011; MUSSELMAN et al., 2013; VALLÉE et al., 2017) e vias de sinalização (GIACOPPO et al., 2017; GOBIRA et al., 2015; RENARD et al., 2017; SEO et al., 2017; VALLÉE et al., 2017; ZHOU et al., 2016). Dentre as vias de sinalização afetadas tanto por escitalopram quanto por CBD, como as mediadas por mTOR e Wnt, muitas delas convergem para o controle de síntese proteica e proliferação celular, processos essenciais para a manifestação de fenômenos neuroplásticos, especialmente de plasticidade sináptica (BUDNIK; SALINAS, 2011; DWYER; DUMAN, 2013; IGNÁCIO et al., 2016; LI et al., 2010; LIU et al., 2013; MAGUSCHAK; RESSLER, 2012; TANG, 2014).

Paralelamente aos efeitos comportamentais da combinação de escitalopram e canabinóides, o padrão de expressão de marcadores moleculares de respostas neuroplásticas no hipocampo e no PFC de animais submetidos ao SDS também foi distinto dependendo das combinações de tratamento. Dentre as proteínas avaliadas, a glicoproteína sinaptofisina constitui uma das mais abundantes proteínas presentes na membrana vesicular (TAKAMORI et al., 2006). Sua presença exclusiva em vesículas sinápticas a torna um importante marcador de terminais pré-sinápticos (KWON; CHAPMAN, 2011). No presente estudo, foi observado que tanto no hipocampo quanto no PFC nenhum dos agentes isoladamente alterou significativamente a expressão relativa da glicoproteína. No hipocampo, a expressão de sinaptofisina foi encontrada significativamente aumentada nos camundongos estressados tratados com a combinação de escitalopram e URB597 e os níveis de sinaptofisina foram maiores frente ao tratamento com escitalopram e CBD em combinação em comparação aos grupos que receberam esses fármacos isoladamente. No PFC, a combinação de escitalopram e CBD também gerou um

aumento dos níveis dessa glicoproteína vesicular. Considerando que a sinaptofisina é um marcador indireto de densidade sináptica (DITYATEV; EL-HUSSEINI, 2006; MATOSIN et al., 2016), é possível que essa alteração na expressão relativa de sinaptofisina indique que animais que receberam tratamento com a combinação de escitalopram e CBD apresentaram uma maior densidade de contatos sinápticos tanto no hipocampo quanto no PFC.

A proteína vesicular sinaptotagmina atua como um sensor de cálcio essencial para a rápida exocitose de neurotransmissores evocada por cálcio (BROSE et al., 1992; FERNÁNDEZ-CHACÓN et al., 2001; GEPPERT et al., 1994; SÜDHOF, 2013). No presente estudo, os níveis dessa proteína foram encontrados significativamente elevados no hipocampo de animais submetidos ao SDS tratados com URB597 isoladamente ou com a combinação de escitalopram e CBD. Entretanto, uma limitação dessa análise molecular é que não foram avaliados os níveis de sinaptotagmina em sua forma fosforilada. A fosforilação dessa proteína pode modular sua interação com o complexo SNARE, facilitando o ancoramento de vesículas sinápticas e, conseqüentemente, favorecendo a liberação de neurotransmissores (HILFIKER et al., 2001; POPOLI et al., 2001; VERONA et al., 2001). Sinaptotagmina é alvo de diversas quinases, incluindo proteína quinase C (PKC) e cálcio-calmodulina quinase II (CaMKII) (DE JONG et al., 2016; HILFIKER et al., 2001; POPOLI, 1993). Tanto PKC e CaMKII já foram apontadas como alvo da ação de antidepressivos. A combinação aguda do antidepressivo imipramina e do antidepressivo de ação rápida cetamina em ratos gerou um aumento da fosforilação de PKC no PFC (RÉUS et al., 2011). Seo e colaboradores (2014) descreveram que escitalopram gerou um aumento da arborização dendrítica de neurônios hipocámpais de uma maneira dependente de CaMKII. Ademais, o tratamento crônico com ISRS gerou um aumento da

autofosforilação de CaMKII apenas a nível pré-sináptico no hipocampo (POPOLI et al., 1995). Isso pode implicar que efeitos de ISRS sobre a plasticidade sináptica podem estar relacionados a ação de CaMKII sobre a proteína sinaptotagmina, induzindo sua fosforilação e aumentando a liberação de neurotransmissores (LOTRICH; POLLOCK, 2005). De fato, Popoli e colaboradores (1997) descreveram que o tratamento crônico com antidepressivos gerou um aumento da fosforilação de sinaptotagmina mediada por CaMKII no hipocampo de ratos.

Outra proteína vesicular avaliada foi a sinapsina 1a/b. Sinapsinas tem uma importante atuação no controle da reserva e do recrutamento de vesículas em virtude da sua propriedade de interação tanto com a membrana fosfolipídica de vesículas quanto com o citoesqueleto de actina (SONG; AUGUSTINE, 2015). Nos animais que foram submetidos ao modelo de SDS e tratados com a combinação de escitalopram e URB597 o presente estudo encontrou uma elevada expressão de sinapsina 1a/b no PFC. Assim como no caso da sinaptotagmina, todavia, para melhor caracterizar o efeito das abordagens experimentais empregadas no presente estudo sobre a função dessa proteína seria necessário avaliar, também, a razão entre essa proteína na sua forma fosforilada em relação a sua expressão total. Sinapsinas são fosfoproteínas alvo de diversas quinases, incluindo proteína quinase A (PKA), CaMKII e *Extracellular signal-regulated kinase* (Erk), dentre outras (BONANOMI et al., 2005; CESCA et al., 2010). A manutenção das vesículas na zona ativa no terminal pré-sináptico depende da interação de sinapsinas com as vesículas e com o citoesqueleto, mas, dependendo do estado de fosforilação da proteína, mudanças conformacionais alteram a afinidade de ligação e favorecem a liberação das vesículas para exocitose (BONANOMI et al., 2005; BYKHOVSKAIA, 2011; CESCA et al., 2010).

As alterações na expressão de proteínas da maquinaria vesicular de liberação de neurotransmissores indicam que as combinações de tratamento geraram efeitos significativos no que se refere a plasticidade sináptica, especialmente a nível pré-sináptico. Adicionalmente, o presente estudo encontrou um aumento da expressão de β -actina no hipocampo de camundongos expostos ao SDS e tratados com as combinações de escitalopram e CBD ou de escitalopram e URB597. Considerando o papel do citoesqueleto de actina no controle e manifestação de fenômenos de plasticidade sináptica (FIFKOVÁ; DELAY, 1982; SCHUBERT; DOTTI, 2007; SPENCE; SODERLING, 2015), o aumento da expressão de β -actina no hipocampo frente a combinação de escitalopram e canabinóides pode estar relacionado a efeitos neuroplásticos dependentes de alterações no citoesqueleto.

O citoesqueleto de actina é particularmente relevante para o controle dinâmico de espinhos dendríticos, protuberâncias presentes nos dendritos que são importantes para a compartimentalização de contatos sinápticos (BOSCH et al., 2014; BOSCH; HAYASHI, 2012; CARLISLE; KENNEDY, 2005; LAI; IP, 2013; LEI et al., 2016; MATSUZAKI et al., 2004). Assim, neurônios granulares do giro denteado do hipocampo foram avaliados quanto ao número e a morfologia de espinhos dendríticos. Não foram observados efeitos significativos, entretanto, nem do estresse nem dos tratamentos quanto ao número de espinhos nos dendritos secundários dos neurônios granulares. Com relação a morfologia, ainda que não tenha sido observada uma diferença estatística significativa, os animais estressados que receberam tratamento apenas com veículo apresentaram uma maior porcentagem de espinhos com a morfologia *stubby* e uma menor porcentagem de espinhos com a morfologia *mushroom* e esse padrão parece ter sido inverso nos animais controle e nos animais estressados tratados com a combinação de escitalopram e CBD. Esse padrão distinto

é relevante em razão da diferença na proporção pescoço:cabeça observada na morfologia desses espinhos dendríticos. Espinhos com a morfologia *stubby* apresentam, em geral, um volume de cabeça reduzido e não possuem um pescoço definido. Espinhos com a morfologia *mushroom*, por outro lado, apresentam um volume de cabeça maior e um pescoço definido (ARELLANO et al., 2007; HERING; SHENG, 2001; ROCHEFORT; KONNERTH, 2012). Existe uma correlação positiva entre o volume da cabeça de espinhos dendríticos e a força do contato sináptico. O pescoço, por sua vez, é essencial para a compartimentalização da sinalização mediada por Ca^{2+} nas diferentes sinapses (ARELLANO et al., 2007; EBRAHIMI; OKABE, 2014; HERING; SHENG, 2001; ROCHEFORT; KONNERTH, 2012). Dessa forma, esse padrão distinto na proporção entre espinhos *stubby* e *mushroom* pode indicar consequências funcionais relevantes no que se refere a força e dinâmica de contatos sinápticos.

O giro denteado é considerado o “portão de entrada” do circuito tri-sináptico do hipocampo, recebendo projeções do córtex entorrinal através da via perforante (HSU, 2007; KROOK-MAGNUSON et al., 2015; LOPEZ-ROJAS; HEINE; KREUTZ, 2016). Fogaça e colaboradores (2018) reportaram que em camundongos expostos a 14 dias de CUS o tratamento com a dose de 30 mg/kg de CBD preveniu a redução do número de espinhos dendríticos em ramos secundários e terciários dos dendritos de neurônios granulares do giro denteado do hipocampo gerada pelo estresse. Apesar dessas e outras evidências sugerindo um importante papel do giro denteado em resposta a estresse e ao efeito de psicofármacos (BOLDRINI et al., 2013; SAMUELS et al., 2015), Bessa e colaboradores (2008), semelhante ao reportado no presente estudo, não encontrou um efeito significativo do estresse e do tratamento crônico com diferentes antidepressivos no que se refere ao número de espinhos dendríticos de neurônios

granulares maduros. Esse estudo apontou, contudo, que ratos submetidos a 6 semanas de estresse crônico moderado apresentaram uma redução do número de espinhos dendríticos em neurônios piramidais da região CA3 do hipocampo e das camadas II/III do PFC, o que foi revertido pelo tratamento crônico com antidepressivos. Nesse sentido, a avaliação do número de espinhos dendríticos em outras regiões do hipocampo e no PFC poderia fornecer novas evidências sobre consequências neuroplásticas dos protocolos empregados no presente estudo e, embora não tenha havido tempo hábil para que esses dados sejam incluídos no presente estudo, pretende-se fazer essas análises no futuro, uma vez que as lâminas já estão disponíveis para análise.

Embora os resultados encontrados sejam puramente correlacionais, é possível que as alterações neuroplásticas geradas pela combinação de escitalopram e CBD contribuam para os efeitos comportamentais observados. Uma direta relação causal entre respostas neuroplásticas e comportamentais de psicofármacos já foi proposta em alguns estudos. Li e colaboradores (2010) reportaram que a ação antidepressiva rápida da cetamina foi prevenida pela inibição da sinaptogênese dependente de mTOR no PFC de ratos. Santarelli e colaboradores (2003) demonstraram que a exposição do hipocampo a irradiação gerou um significativo prejuízo no processo de neurogênese na camada subgranular do giro denteado e que esse prejuízo na neurogênese impediu os efeitos comportamentais da administração crônica do antidepressivo fluoxetina tanto em animais não-estressados quanto em animais submetidos ao CUS. Bessa e colaboradores (2008), por sua vez, propuseram que os efeitos comportamentais de antidepressivos em um modelo animal de estresse crônico não seriam prejudicados pela redução da neurogênese hipocampal, mas estariam relacionados ao remodelamento sináptico no hipocampo e PFC. Para

canabinóides essa relação entre neuroplasticidade e comportamento também já foi evidenciada, uma vez que efeito do tipo-ansiolítico do CBD em camundongos cronicamente estressados testados no teste de NSF não foi observado em animais que foram submetidos a supressão do fenômeno de neurogênese hipocampal (CAMPOS et al., 2013b).

O que normalmente se observa em estudos avaliando o efeito do tratamento crônico com antidepressivos é que a janela temporal para indução de alterações neuroplásticas é condizente com o tempo necessário para observação dos efeitos comportamentais (BESSA et al., 2008; MALBERG et al., 2000; SANTARELLI et al., 2003). Agentes com propriedades antidepressivas de ação rápida, como a cetamina, outros antagonistas de receptores NMDA de glutamato e escopolamina, induzem efeitos comportamentais e efeitos neuroplásticos, especialmente sinaptogênese, após um curto intervalo de tempo (LI et al., 2010; LIU et al., 2013; VOLETI et al., 2013). Fármacos pertencentes à classe dos ISRS, por outro lado, geram efeitos neuroplásticos apenas após tratamento por 2 semanas ou mais. Varea e colaboradores (2007) reportaram que o tratamento crônico com fluoxetina aumentou a densidade de imunomarcagem para sinaptofisina no córtex pré-frontal medial após 2 semanas de tratamento e resultados semelhantes foram reportados por Rapp e colaboradores (2004). O tratamento com escitalopram por 4 semanas em ratos submetidos ao estresse crônico produziu respostas preditivas de um efeito do tipo-antidepressivo e, paralelamente, gerou alterações de morfologia sináptica no hipocampo e um aumento dos níveis hipocampais de sinaptofisina e sinapsina 1 (LI et al., 2015). Efeitos neuroplásticos do CBD em uma dose efetiva em alterar respostas comportamentais (30mg/kg) foram reportadas, também, após 2 semanas de tratamento em camundongos estressados (CAMPOS et al., 2013b; FOGAÇA et al.,

2018). Bambico e Belzung (2012) propuseram que o efeito de antidepressivos pode estar relacionado a dinâmica de efeitos pró-sinaptogênicos e pró-neurogênicos. A curto prazo a ação antidepressiva induzida por agentes como a cetamina estaria relacionado a um efeito rápido de indução de sinaptogênese, especialmente no PFC, o que envolveria vias de sinalização que modulam a plasticidade sináptica, como vias dependentes de mTOR. Por outro lado, em um processo mais lento, a indução de neurogênese hipocampal poderia contribuir para a manutenção do efeito antidepressivo. Antidepressivos clássicos, como os ISRS, afetariam a sinaptogênese de maneira mais lenta e favoreceriam, também, o processo mais lento de neurogênese hipocampal, fazendo com que a janela temporal para observação dos efeitos seja mais longa (BAMBICO; BELZUNG, 2012). Nesse sentido, o aumento de sinaptofisina no PFC induzido pela combinação de escitalopram e CBD, aliada a observação de alteração da expressão de outras proteínas da maquinaria vesicular, pode indicar que a combinação dos fármacos foi capaz de gerar um efeito pró-sinaptogênico em um intervalo de tempo reduzido em comparação ao que é normalmente necessário para observação do efeito do antidepressivo sozinho. Esse fenômeno pode ter contribuído, assim, para a indução de efeitos comportamentais mesmo após apenas 7 dias de tratamento com a combinação em animais estressados. O presente estudo não avaliou neurogênese hipocampal, mas, dado o efeito tanto de antidepressivos quanto de CBD nesse processo, é possível que o tratamento com a combinação de escitalopram e CBD altere fenômeno de neurogênese hipocampal.

Aspectos farmacocinéticos também devem ser considerados ao se avaliar o efeito de combinação de fármacos. Em camundongos, a concentração plasmática e cerebral de escitalopram atinge o pico dentro de 1 hora após a sua administração

(BUNDGAARD; ENEBERG; SÁNCHEZ, 2016). No presente estudo, a administração de canabinóides foi realizada sempre no mínimo 1 hora depois da administração de escitalopram, ou seja, espera-se que, no momento do tratamento com CBD ou URB597, o pico de concentração plasmática do antidepressivo já tenha sido atingido. Com relação a outros parâmetros farmacocinéticos, embora CBD tenha sido descrito como um inibidor da isoforma CYP3A4 da enzima CYP450 (YAMAORI et al., 2011), uma das isoformas responsáveis pelo metabolismo de escitalopram (HÖSCHL; ŠVESTKA, 2008), também outras isoformas, incluindo CYP2C19 e CYP2D6, são capazes de metabolizar esse fármaco e possivelmente compensar a inibição da ação de CYP3A4. Nesse sentido, Gutierrez e colaboradores (2003) descreveram que o inibidor da isoforma CYP3A4 ritonavir não alterou de maneira significativa a farmacocinética de escitalopram em humanos. Ademais, a descrição de escitalopram como um fraco inibidor de CYP2D6 (HÖSCHL; ŠVESTKA, 2008), uma das isoformas responsáveis pelo metabolismo de CBD, Jiang e colaboradores (2011) descreveram outras 6 isoformas de CYP450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5) que metabolizam CBD. Sendo assim, é improvável que escitalopram e CBD tenham alterado as suas taxas metabólicas basais. Entretanto, para melhor caracterizar o perfil de interação farmacocinética dos fármacos estudados, seria necessária uma avaliação cuidadosa das concentrações plasmática e tecidual dos fármacos, bem como de suas taxas de absorção, eliminação e ligação a proteínas plasmáticas.

A combinação de fármacos para otimização do tratamento é uma abordagem usualmente adotada na clínica em pacientes com transtornos psiquiátricos não responsivos a abordagem clássica de tratamento com um único fármaco (BAROWSKY; SCHWARTZ, 2006; MORET, 2005). A combinação de fármacos é uma

abordagem interessante para redução de efeitos colaterais por redução das doses utilizadas e otimização do tratamento, especialmente no caso de pacientes não-responsivos (CHOU, 2010). Os resultados apresentados no presente estudo apontam a combinação com canabinóides, especialmente CBD, como uma alternativa para a otimização do tratamento com o antidepressivo escitalopram. Ainda deve ser testado, entretanto, se a combinação com canabinóides poderia gerar efeitos semelhantes com outros fármacos antidepressivos.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

Os resultados encontrados no presente estudo indicaram que, em camundongos estressados, a combinação de escitalopram e CBD foi capaz de gerar respostas tidas como preditivas de efeitos do tipo-antidepressivo e do tipo-ansiolítico após apenas uma semana de tratamento. Paralelamente aos efeitos comportamentais, análises moleculares forneceram indícios de que o tratamento com a combinação de escitalopram e CBD foi capaz de gerar alterações de plasticidade sináptica. A pertinência dessas observações é destacada pelo fato de que antidepressivos, isoladamente, são capazes de alterar significativamente respostas comportamentais e neuroplásticas de animais estressados apenas após tratamento prolongado, por 2 semanas ou mais.

Desse modo, os dados apresentados evidenciam que a combinação com CBD pode ser uma alternativa para otimizar a ação do antidepressivo escitalopram, reduzindo a latência para observação dos efeitos comportamentais em modelos animais de estresse crônico. Essa otimização pode estar relacionada a facilitação de fenômenos neuroplásticos, especialmente de plasticidade sináptica, no hipocampo e PFC de camundongos estressados. A generalidade dessa resposta com outros antidepressivos permanece por ser testada.

REFERÊNCIAS

7. Referências

- ADAMCZYK, P. et al. Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, n. 2, p. 217–228, 2008.
- ADAMS, R.; HUNT, M. Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marijuana Extract of Minnesota Wild Hemp. I. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, n. 1, p. 196–200, 1940.
- AIGNER, M. et al. World federation of societies of biological psychiatry (WFSBP) guidelines for the pharmacological treatment of eating disorders. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 12, n. 6, p. 400–443, 2011.
- ARELLANO, J. I. et al. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. **Frontiers in neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 131–43, nov. 2007.
- ARTIGAS, F.; ANALIA BORTOLOZZI; PAU CELADA. Can we increase speed and efficacy of antidepressant treatments? Part I: General aspects and monoamine-based strategies. **European Neuropsychopharmacology**, 22 nov. 2017.
- ASO, E. et al. BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. **Journal of neurochemistry**, v. 105, n. 2, p. 565–572, abr. 2008.
- AXELROD, J. The Uptake and Release of Catecholamines and the Effect of Drugs. **Progress in Brain Research**, v. 8, p. 81–89, 1 jan. 1964.
- AXELROD, J. Noradrenaline: fate and control of its biosynthesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 173, n. 997, p. 598–606, 1971.

AXELROD, J.; HERTTING, G.; POTTER, L. Effect of Drugs on the Uptake and Release of 3H-Norepinephrine in the Rat Heart. **Nature**, v. 194, n. 4825, p. 297–297, 21 abr. 1962.

AXELROD, J.; WHITBY, L. G.; HERTTING, G. Effect of Psychotropic Drugs on the Uptake of H3-Norepinephrine by Tissues. **Science**, v. 133, n. 3450, p. 383–384, 10 fev. 1961.

BAEK, I.-S.; PARK, J.-Y.; HAN, P.-L. Chronic Antidepressant Treatment in Normal Mice Induces Anxiety and Impairs Stress-coping Ability. **Experimental neurobiology**, v. 24, n. 2, p. 156–68, jun. 2015.

BAGOT, R. C. et al. Ketamine and Imipramine Reverse Transcriptional Signatures of Susceptibility and Induce Resilience-Specific Gene Expression Profiles. **Biological Psychiatry**, v. 81, n. 4, p. 285–295, 2017.

BAKAS, T. et al. The direct actions of cannabidiol and 2-arachidonoyl glycerol at GABAA receptors. **Pharmacological Research**, v. 119, p. 358–370, 1 maio 2017.

BAMBICO, F. R. et al. The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 modulates serotonin-dependent emotional behaviour, and serotonin1A and serotonin2A/C activity in the hippocampus. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 3, p. 578–590, mar. 2016.

BAMBICO, F. R.; BELZUNG, C. Novel Insights into Depression and Antidepressants: A Synergy Between Synaptogenesis and Neurogenesis? In: **Neurogenesis and Neural Plasticity**. [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 243–291.

BANDELOW, B. et al. Guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders, obsessive-compulsive disorder and posttraumatic stress disorder in

primary care. **International Journal of Psychiatry in Clinical Practice**, v. 16, n. 2, p. 77–84, 2012.

BARDEN, N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, v. 29, n. 3, p. 185–93, maio 2004.

BAROWSKY, J.; SCHWARTZ, T. L. An Evidence-Based Approach to Augmentation and Combination Strategies for: Treatment-Resistant Depression. **Psychiatry (Edgmont (Pa. : Township))**, v. 3, n. 7, p. 42–61, jul. 2006.

BATELAAN, N. M. et al. Risk of relapse after antidepressant discontinuation in anxiety disorders, obsessive-compulsive disorder, and post-traumatic stress disorder: systematic review and meta-analysis of relapse prevention trials. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 358, p. j3927, 2017.

BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C. F.; FREY, B. N. Preclinical and Clinical Evidence of Antioxidant Effects of Antidepressant Agents: Implications for the Pathophysiology of Major Depressive Disorder. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1–13, 27 maio 2012.

BENATTI, C. et al. Molecular changes associated with escitalopram response in a stress-based model of depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 87, p. 74–82, 1 jan. 2018.

BENEDEK, D. M. et al. Guideline Watch (March 2009): Practice Guideline for the Treatment of Patients with Acute Stress Disorder and Posttraumatic Stress Disorder. **FOCUS**, v. 7, n. 2, p. 204–213, 1 jan. 2009.

BESSA, J. M. et al. The mood-improving actions of antidepressants do not depend

on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. **Mol Psychiatry**, v. 14, n. 8, p. 764–773, 4 nov. 2008.

BÉTRY, C. et al. A 5-HT₃receptor antagonist potentiates the behavioral, neurochemical and electrophysiological actions of an SSRI antidepressant. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 131, p. 136–142, 2015.

BIERNACKI, M. et al. Crosstalk between liver antioxidant and the endocannabinoid systems after chronic administration of the FAAH inhibitor, URB597, to hypertensive rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 301, p. 31–41, 15 jun. 2016.

BIONDI, M.; PICARDI, A. Increased probability of remaining in remission from panic disorder with agoraphobia after drug treatment in patients who received concurrent cognitive- behavioural therapy: A follow-up study. **Psychotherapy and Psychosomatics**, v. 72, n. 1, p. 34–42, 2003.

BISOGNO, T. et al. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. **The Journal of Cell Biology**, v. 163, n. 3, p. 463–468, 10 nov. 2003.

BJORKHOLM, C. et al. Adjunctive Treatment with Asenapine Augments the Escitalopram-Induced Effects on Monoaminergic Outflow and Glutamatergic Neurotransmission in the Medial Prefrontal Cortex of the Rat. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 3, p. pyu068-pyu068, 11 fev. 2015.

BJÖRKHOLM, C.; MONTEGGIA, L. M. BDNF – a key transducer of antidepressant effects. **Neuropharmacology**, v. 102, p. 72–79, 1 mar. 2016.

BLANCO, C.; ANTIA, S. X.; LIEBOWITZ, M. R. Pharmacotherapy of social anxiety disorder. **Biological Psychiatry**, v. 51, n. 1, p. 109–120, 2002.

BLIER, P.; DE MONTIGNY, C. Current advances and trends in the treatment of depression. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 7, p. 220–226, 1 jul. 1994.

BOLDRINI, M. et al. Hippocampal Granule Neuron Number and Dentate Gyrus Volume in Antidepressant-Treated and Untreated Major Depression.

Neuropsychopharmacology, v. 38, n. 6, p. 1068–1077, 7 maio 2013.

BONANOMI, D. et al. Phosphorylation of synapsin I by cAMP-dependent protein kinase controls synaptic vesicle dynamics in developing neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 32, p. 7299–308, 10 ago. 2005.

BONNE, O. et al. Reduced posterior hippocampal volume in posttraumatic stress disorder. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 69, n. 7, p. 1087–91, jul. 2008.

BORGES, R. S.; DA SILVA, A. B. F. Cannabidiol as an Antioxidant. In: **Handbook of Cannabis and Related Pathologies**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. e122–e130.

BORTOLATO, M. et al. Antidepressant-like Activity of the Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitor URB597 in a Rat Model of Chronic Mild Stress. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 10, p. 1103–1110, 2007.

BOSCH, M. et al. Structural and Molecular Remodeling of Dendritic Spine Substructures during Long-Term Potentiation. **Neuron**, v. 82, n. 2, p. 444–459, 16 abr. 2014.

BOSCH, M.; HAYASHI, Y. Structural plasticity of dendritic spines. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 22, n. 3, p. 383–388, 1 jun. 2012.

BOSKER, F. J. et al. Biochemical and behavioral effects of long-term citalopram

administration and discontinuation in rats: Role of serotonin synthesis.

Neurochemistry International, v. 57, n. 8, p. 948–957, 1 dez. 2010.

BRACHMAN, R. A. et al. Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-like Behavior. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 9, p. 776–786, 1 maio 2016.

BROSE, N. et al. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. **Science**, v. 256, n. 5059, p. 1021–5, 15 maio 1992.

BROWN, R. W. et al. Eszopiclone facilitation of the antidepressant efficacy of fluoxetine using a social defeat stress model. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 4, p. 648–658, 2011.

BROWN, W. J. et al. A review of sleep disturbance in children and adolescents with anxiety. **Journal of Sleep Research**, 2017.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; DAVIS, S.; LAROCHE, S. Brain Plasticity Mechanisms and Memory: A Party of Four. **The Neuroscientist**, v. 13, n. 5, p. 492–505, 29 out. 2007.

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

BUDNIK, V.; SALINAS, P. C. Wnt signaling during synaptic development and plasticity. **Current opinion in neurobiology**, v. 21, n. 1, p. 151–9, fev. 2011.

BUNDGAARD, C.; ENEBERG, E.; SÁNCHEZ, C. P-glycoprotein differentially affects escitalopram, levomilnacipran, vilazodone and vortioxetine transport at the mouse blood–brain barrier in vivo. **Neuropharmacology**, v. 103, p. 104–111, 1 abr. 2016.

BUNNEY, W. E.; DAVIS, J. M. Norepinephrine in Depressive Reactions. **Archives of**
135

General Psychiatry, v. 13, n. 6, p. 483, 1 dez. 1965.

BURSTEIN, O. et al. Escitalopram and NHT normalized stress-induced anhedonia and molecular neuroadaptations in a mouse model of depression. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0188043, 15 nov. 2017.

BYKHOVSKAIA, M. Synapsin regulation of vesicle organization and functional pools.

Seminars in Cell & Developmental Biology, v. 22, n. 4, p. 387–392, 1 jun. 2011.

CAJAL, S. R. Y. The Croonian Lecture: La Fine Structure des Centres Nerveux.

Proceedings of the Royal Society of London, v. 55, n. 331–335, p. 444–468, 1 jan. 1894.

CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. suppl 2, p. S101–S111, 2013a.

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

CAMPOS, A. C. et al. Cannabidiol increases survival and promotes rescue of cognitive function in a murine model of cerebral malaria. **Neuroscience**, v. 289, p. 166–180, 19 mar. 2015.

CAMPOS, A. C. et al. Cannabinoids as Regulators of Neural Development and Adult Neurogenesis. In: [s.l.] Humana Press, Cham, 2017. p. 117–136.

CAMPOS, A. C.; FERREIRA, F. R.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol blocks long-lasting behavioral consequences of predator threat stress: possible involvement of 5HT1A receptors. **Journal of psychiatric research**, v. 46, n. 11, p. 1501–10, 1 nov.

2012.

CARLINI, E. A. et al. Cannabidiol and Cannabis sativa extract protect mice and rats against convulsive agents. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 25, n. 8, p. 664–665, 1973.

CARLISLE, H. J.; KENNEDY, M. B. Spine architecture and synaptic plasticity. **Trends in Neurosciences**, v. 28, n. 4, p. 182–187, 1 abr. 2005.

CASTRÉN, E.; KOJIMA, M. Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments. **Neurobiology of Disease**, v. 97, p. 119–126, 1 jan. 2017.

CEGLIA, I. et al. Effects of chronic treatment with escitalopram or citalopram on extracellular 5-HT in the prefrontal cortex of rats: role of 5-HT_{1A} receptors. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 3, p. 469–78, jun. 2004.

CELADA, P.; BORTOLOZZI, A.; ARTIGAS, F. Serotonin 5-HT_{1A} Receptors as Targets for Agents to Treat Psychiatric Disorders: Rationale and Current Status of Research. **CNS Drugs**, v. 27, n. 9, p. 703–716, 12 set. 2013.

CERQUEIRA, J. J. et al. The Prefrontal Cortex as a Key Target of the Maladaptive Response to Stress. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2781–2787, 2007.

CESCA, F. et al. The synapsins: Key actors of synapse function and plasticity. **Progress in Neurobiology**, v. 91, n. 4, p. 313–348, 1 ago. 2010.

CHANG, C.-C. et al. Effects of antidepressant treatment on total antioxidant capacity and free radical levels in patients with major depressive disorder. **Psychiatry Research**, v. 230, n. 2, p. 575–580, 15 dez. 2015.

CHEN, Y. et al. Rapid Loss of Dendritic Spines after Stress Involves Derangement of

Spine Dynamics by Corticotropin-Releasing Hormone. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 11, p. 2903–2911, 2008.

CHENG, A.; HOU, Y.; MATTSON, M. P. Mitochondria and neuroplasticity. **ASN neuro**, v. 2, n. 5, p. e00045, 4 out. 2010.

CHICCA, A. et al. Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 41, p. 34660–34682, 2012.

CHOU, T.-C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. **Cancer Research**, v. 70, n. 2, p. 440–446, 15 jan. 2010.

CHRISTENSEN, A. V, FJALLAND, B., PEDERSEN, V., DANNESKIOLD-SAMSØE, P., & SVENDSEN, O. Pharmacology of a new phthalane (Lu 10-171), with specific 5-HT uptake inhibiting properties. **European Journal of Pharmacology**, v. 41, n. 2, p. 153–162, 1977.

CHRISTENSEN, T. et al. Synergistic antidepressant-like action of gaboxadol and escitalopram. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 10, p. 751–760, 2012.

CIPRIANI, A. et al. Comparative efficacy and acceptability of 12 new-generation antidepressants: a multiple-treatments meta-analysis. **The Lancet**, v. 373, n. 9665, p. 746–758, 28 fev. 2009.

CIPRIANI, A. et al. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. **The Lancet**, fev. 2018.

COOK, S. C.; WELLMAN, C. L. Chronic stress alters dendritic morphology in rat

medial prefrontal cortex. **Journal of Neurobiology**, v. 60, n. 2, p. 236–248, 2004.

COPPEN, A. The Biochemistry of Affective Disorders. **The British Journal of Psychiatry**, v. 113, n. 504, p. 1237–1264, 1 nov. 1967.

COSTA-FERREIRA, W. et al. Involvement of Type 1 Angiotensin II Receptor (AT1) in Cardiovascular Changes Induced by Chronic Emotional Stress: Comparison between Homotypic and Heterotypic Stressors. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 262, 2016.

COUTO, F. S. DO et al. Escitalopram improves memory deficits induced by maternal separation in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 695, n. 1–3, p. 71–75, 2012.

CRAVATT, B. F. et al. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. **Nature**, v. 384, n. 6604, p. 83–87, 7 nov. 1996.

CULPEPPER, L. Escitalopram: A New SSRI for the Treatment of Depression in Primary Care. **Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry**, v. 4, n. 6, p. 209–214, dez. 2002.

CZÉH, B. et al. Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. **Biological Psychiatry**, v. 52, n. 11, p. 1057–1065, 2002.

D'SA, C.; DUMAN, R. S. Antidepressants and neuroplasticity. **Bipolar Disorders**, v. 4, n. 3, p. 183–194, 2002.

DAVIDSON, J. R. The long-term treatment of panic disorder. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 59 Suppl 8, p. 17-21–3, 1998.

DAVIDSON, J. R. T. Remission in post-traumatic stress disorder (PTSD): Effects of

139

sertraline as assessed by the Davidson Trauma Scale, Clinical Global Impressions and the Clinician-Administered PTSD scale. **International Clinical**

Psychopharmacology, v. 19, n. 2, p. 85–87, 2004.

DAVIS, L. L. et al. Long-Term Pharmacotherapy for Post-Traumatic Stress Disorder.

CNS Drugs, v. 20, n. 6, p. 465–476, 2006.

DE FILIPPIS, D. et al. Cannabidiol Reduces Intestinal Inflammation through the Control of Neuroimmune Axis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e28159, 6 dez. 2011.

DE JONG, A. P. H. et al. Phosphorylation of synaptotagmin-1 controls a post-priming step in PKC-dependent presynaptic plasticity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 18, p. 5095–100, 3 maio 2016.

DEVANE, W. A et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 10, p. 1946–1949, 1992.

DEVANE, W. A. et al. Determination Rat Brain and Characterization of a Cannabinoid Receptor in. **Molecular Pharmacology**, v. 34, n. 5, p. 605–613, 1988.

DIMITRIOU, E. C.; DIMITRIOU, C. E. Buspirone Augmentation of Antidepressant Therapy. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 18, n. 6, p. 465–469, 1 dez. 1998.

DITYATEV, A.; EL-HUSSEINI, A. **Molecular mechanisms of synaptogenesis**. [s.l.] Springer US, 2006.

DOMSCHKE, K. et al. Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: Impact on antidepressant treatment response and emotion processing in Major Depression. **European Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 10, p. 751–759, 1 out. 2008.

DUARTE, J. O.; PLANETA, C. S.; CRESTANI, C. C. Immediate and long-term effects of psychological stress during adolescence in cardiovascular function: Comparison of homotypic vs heterotypic stress regimens. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 40, p. 52–59, 1 fev. 2015.

DUCOTTET, C.; BELZUNG, C. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 3, p. 417–426, maio 2004.

DULAWA, S. C. et al. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 7, p. 1321–1330, 2004.

DUMAN, R. S. Role of Neurotrophic Factors in the Etiology and Treatment of Mood Disorders. **NeuroMolecular Medicine**, v. 5, n. 1, p. 011–026, 2004.

DUMAN, R. S. et al. Synaptic plasticity and depression: New insights from stress and rapid-acting antidepressants. **Nature Medicine**, v. 22, n. 3, p. 238–249, 2016.

DUMAN, R. S.; HENINGER, G. R.; NESTLER, E. J. A Molecular and Cellular Theory of Depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 54, n. 7, p. 597–606, 1997.

DUMAN, R. S.; LI, N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1601, p. 2475–2484, 2012.

DUMAN, R. S.; MALBERG, J.; THOME, J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. **Biological psychiatry**, v. 46, n. 9, p. 1181–91, 1 nov. 1999.

DWYER, J. M.; DUMAN, R. S. Activation of mammalian target of rapamycin and

synaptogenesis: role in the actions of rapid-acting antidepressants. **Biological psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1189–98, 15 jun. 2013.

EBRAHIMI, S.; OKABE, S. Structural dynamics of dendritic spines: Molecular composition, geometry and functional regulation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1838, n. 10, p. 2391–2398, 1 out. 2014.

EL MANSARI, M. et al. Effects of acute and long-term administration of escitalopram and citalopram on serotonin neurotransmission: An in vivo electrophysiological study in rat brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 7, p. 1269–1277, 2005.

EL MANSARI, M. et al. Allosteric modulation of the effect of escitalopram, paroxetine and fluoxetine: In-vitro and in-vivo studies. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 10, n. 1, p. 31–40, 2007.

ELMES, M. W. et al. Fatty acid-binding proteins (FABPs) are intracellular carriers for Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 14, p. 8711–21, 3 abr. 2015.

ESPOSITO, G. et al. Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.

ETKIN, A. et al. Disrupted amygdalar subregion functional connectivity and evidence of a compensatory network in generalized anxiety disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 66, n. 12, p. 1361–1372, 2009.

FASS, D. M. et al. Epigenetic mechanisms in mood disorders: Targeting neuroplasticity. **Neuroscience**, v. 264, p. 112–130, 4 abr. 2014.

FERNÁNDEZ-CHACÓN, R. et al. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of

release probability. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 41–49, 1 mar. 2001.

FIFKOVÁ, E.; DELAY, R. J. Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. **The Journal of cell biology**, v. 95, n. 1, p. 345–50, 1 out. 1982.

FINEBERG, N. A. et al. Sustained response versus relapse: The pharmacotherapeutic goal for obsessive-compulsive disorder. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 22, n. 6, p. 313–322, 2007.

FISH, E. W. Anxiolytic-Like Effects of Escitalopram, Citalopram, and R-Citalopram in Maternally Separated Mouse Pups. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, n. 2, p. 474–480, 2003.

FOGAÇA, M. V. et al. Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: Involvement of 5HT1A receptors and previous stressful experience. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 3, p. 410–419, 2014.

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

FOUCQUIER, J.; GUEDJ, M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 3, n. 3, p. e00149, 1 jun. 2015.

FOY, M. R. et al. Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus. **Behavioral and Neural Biology**, v. 48, n. 1, p. 138–149, 1987.

FRIDE, E. et al. Differential response to acute and repeated stress in cannabinoid

CB1 receptor knockout newborn and adult mice. **Behavioural Pharmacology**, v. 16, n. 5–6, 2005.

GAŁECKI, P.; MOSSAKOWSKA-WÓJCIK, J.; TALAROWSKA, M. The anti-inflammatory mechanism of antidepressants – SSRIs, SNRIs. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 80, n. January 2017, p. 291–294, 2018.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. et al. Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB2 receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 7, p. 1773–1784, 1 ago. 2010.

GASSEN, N. C. et al. Association of FKBP51 with Priming of Autophagy Pathways and Mediation of Antidepressant Treatment Response: Evidence in Cells, Mice, and Humans. **PLoS Medicine**, v. 11, n. 11, p. e1001755, 11 nov. 2014.

GELENBERG, A. J. et al. Practice Guideline for the Treatment of Patients With Major Depressive Disorder. **American Psychiatric Association**, 2010.

GEPPERT, M. et al. Synaptotagmin I: A major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 717–727, nov. 1994.

GIACOPPO, S. et al. Target regulation of PI3K/Akt/mTOR pathway by cannabidiol in treatment of experimental multiple sclerosis. **Fitoterapia**, v. 116, p. 77–84, 2017.

GILBERTSON, M. W. et al. Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 1242–1247, 15 nov. 2002.

GIROTTI, M. et al. Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain.

Neuroscience, v. 138, n. 4, p. 1067–1081, 1 jan. 2006.

GLOWINSKI, J.; AXELROD, J. Inhibition of Uptake of Tritiated-noradrenaline in the Intact Rat Brain by Imipramine and Structurally Related Compounds. **Nature**, v. 204, n. 4965, p. 1318–1319, 26 dez. 1964.

GOBBI, G. et al. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 51, p. 18620–5, 20 dez. 2005.

GOBIRA, P. H. et al. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, inhibits cocaine-induced seizures in mice: Possible role of the mTOR pathway and reduction in glutamate release. **NeuroToxicology**, v. 50, p. 116–121, 2015.

GOLDEN, S. A. et al. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature Protocols**, v. 6, n. 8, p. 1183–1191, 2011.

GOLDSTEIN, D. J. et al. Long-term fluoxetine treatment of bulimia nervosa. Fluoxetine Bulimia Nervosa Research Group. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 166, n. 5, p. 660–666, 1995.

GOTTSCHALK, M. G. et al. Fluoxetine, not donepezil, reverses anhedonia, cognitive dysfunctions and hippocampal proteome changes during repeated social defeat exposure. **European Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 195–210, 2018.

GOULD, E. et al. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **The Journal of neuroscience**, v. 17, n. 7, p. 2492–8, 1 abr. 1997.

GOURION, D. [Antidepressants and their onset of action: a major clinical,

methodological and pronostical issue]. **L'Encephale**, v. 34, n. 1, p. 73–81, jan. 2008.

GRABIEC, U.; DEHGHANI, F. N-Arachidonoyl Dopamine: A Novel Endocannabinoid and Endovanilloid with Widespread Physiological and Pharmacological Activities.

Cannabis and cannabinoid research, v. 2, n. 1, p. 183–196, 2017.

GUIMARÃES, F. S. et al. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze.

Psychopharmacology, v. 100, n. 4, p. 558–9, 1990.

GUTIERREZ, M. M.; ROSENBERG, J.; ABRAMOWITZ, W. An evaluation of the potential for pharmacokinetic interaction between escitalopram and the cytochrome P450 3A4 inhibitor ritonavir. **Clinical Therapeutics**, v. 25, n. 4, p. 1200–1210, 1 abr. 2003.

HAHN, A. et al. Reduced resting-state functional connectivity between amygdala and orbitofrontal cortex in social anxiety disorder. **NeuroImage**, v. 56, n. 3, p. 881–889, 2011.

HAINS, A. B. et al. Inhibition of protein kinase C signaling protects prefrontal cortex dendritic spines and cognition from the effects of chronic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 42, p. 17957–17962, 20 out. 2009.

HAJSZAN, T.; MACLUSKY, N. J.; LERANTH, C. Short-term treatment with the antidepressant fluoxetine triggers pyramidal dendritic spine synapse formation in rat hippocampus. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 5, p. 1299–1303, mar. 2005.

HAMMELS, C. et al. Differential susceptibility to chronic social defeat stress relates to the number of Dnmt3a-immunoreactive neurons in the hippocampal dentate gyrus.

Psychoneuroendocrinology, v. 51, p. 547–556, 1 jan. 2015.

HAMPSON, A. J. et al. Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 14, p. 8268–73, 7 jul. 1998.

HASHIKAWA, N. et al. Time Course of Behavioral Alteration and mRNA Levels of Neurotrophic Factor Following Stress Exposure in Mouse. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 35, n. 6, p. 807–817, 2015.

HEIMANN, A. S. et al. Hemopressin is an inverse agonist of CB1 cannabinoid receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 51, p. 20588–93, 18 dez. 2007.

HEINE, V. M. et al. Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 131–144, 2004.

HENDERSON, C. et al. Mental health-related stigma in health care and mental health-care settings. **The Lancet Psychiatry**, v. 1, n. 6, p. 467–482, 2014.

HERING, H.; SHENG, M. DENDRITIC SPINES: STRUCTURE, DYNAMICS AND REGULATION. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 12, p. 880–888, 1 dez. 2001.

HERTTING, G.; AXELROD, J. Fate of Tritiated Noradrenaline at the Sympathetic Nerve-Endings. **Nature**, v. 192, n. 4798, p. 172–173, 14 out. 1961.

HILFIKER, S. et al. Regulation of Synaptotagmin I Phosphorylation by Multiple Protein Kinases. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, n. 3, p. 921–932, 25 dez. 2001.

HILL, M. N. et al. Involvement of the Endocannabinoid System in the Ability of Long-Term Tricyclic Antidepressant Treatment to Suppress Stress-Induced Activation of

the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 12, p. 2591–2599, 10 dez. 2006.

HILL, M. N. et al. Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 8, p. 1257–1262, 1 set. 2009.

HILL, M. N. et al. Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 20, p. 9406–11, 18 maio 2010.

HODES, G. E. et al. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 45, p. 16136–41, 11 nov. 2014.

HODES, G. E. et al. Neuroimmune mechanisms of depression. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1386–1393, 2015.

HOLM, M. M. et al. Hippocampal GABAergic dysfunction in a rat chronic mild stress model of depression. **Hippocampus**, v. 21, n. 4, p. 422–433, 1 abr. 2011.

HÖSCHL, C.; ŠVESTKA, J. Escitalopram for the treatment of major depression and anxiety disorders. **Expert Rev. Neurotherapeutics**, v. 8, n. 4, p. 537–552, 2008.

HOSSEINZADEH, M. et al. Cannabidiol Post-Treatment Alleviates Rat Epileptic-Related Behaviors and Activates Hippocampal Cell Autophagy Pathway Along with Antioxidant Defense in Chronic Phase of Pilocarpine-Induced Seizure. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 58, n. 4, p. 432–440, 6 abr. 2016.

HSU, D. The dentate gyrus as a filter or gate: a look back and a look ahead.

Progress in Brain Research, v. 163, p. 601–613, 1 jan. 2007.

HUANG, G.-B. et al. Effect of chronic social defeat stress on behaviors and dopamine receptor in adult mice. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 66, p. 73–79, 2016.

HUANG, W. et al. Piperine potentiates the antidepressant-like effect of trans-resveratrol: Involvement of monoaminergic system. **Metabolic Brain Disease**, v. 28, n. 4, p. 585–595, 2013.

HYTTEL, J. Neurochemical characterization of a new potent and selective serotonin uptake inhibitor: Lu 10-171. **Psychopharmacology**, v. 51, n. 3, p. 225–233, 1977.

HYTTEL, J. et al. The pharmacological effect of citalopram resides in the (S)-(+)-enantiomer. **Journal of Neural Transmission - General Section**, v. 88, n. 2, p. 157–160, 1992.

IGNÁCIO, Z. M. et al. New perspectives on the involvement of mTOR in depression as well as in the action of antidepressant drugs. **British Journal of Clinical Pharmacology**, p. 1280–1290, 2016.

JANARDHAN REDDY, Y. C. et al. Clinical practice guidelines for Obsessive-Compulsive Disorder. **Indian journal of psychiatry**, v. 59, n. Suppl 1, p. S74–S90, jan. 2017.

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

JAYATISSA, M. N. et al. The number of granule cells in rat hippocampus is reduced after chronic mild stress and re-established after chronic escitalopram treatment.

Neuropharmacology, v. 54, n. 3, p. 530–541, 2008.

JIANG, R. et al. Identification of cytochrome P450 enzymes responsible for metabolism of cannabidiol by human liver microsomes. **Life Sciences**, v. 89, n. 5–6, p. 165–170, 1 ago. 2011.

JUHASZ, G. et al. CNR1 Gene is Associated with High Neuroticism and Low Agreeableness and Interacts with Recent Negative Life Events to Predict Current Depressive Symptoms. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 8, p. 2019–2027, 25 jul. 2009.

JUNG, Y.-H. et al. Strain differences in the chronic mild stress animal model of depression and anxiety in mice. **Biomolecules & therapeutics**, v. 22, n. 5, p. 453–9, set. 2014.

KARNIOL, I. G. et al. Cannabidiol interferes with the effects of delta 9 - tetrahydrocannabinol in man. **European journal of pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 172–7, set. 1974.

KASPER, S. et al. Onset of action of escitalopram compared with other antidepressants: results of a pooled analysis. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 105–110, 1 mar. 2006.

KHAN, A. Vilazodone, a novel dual-acting serotonergic antidepressant for managing major depression. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 18, n. 11, p. 1753–1764, 21 nov. 2009.

KIM, J. J.; FOY, M. R.; THOMPSON, R. F. Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 10, p.

4750–3, 14 maio 1996.

KIM, M. J. et al. Anxiety Dissociates dorsal and ventral medial prefrontal cortex functional connectivity with the amygdala at rest. **Cerebral Cortex**, v. 21, n. 7, p. 1667–1673, 2011.

KOBAYASHI, K.; IKEDA, Y.; SUZUKI, H. Behavioral destabilization induced by the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. **Molecular brain**, v. 4, p. 12, 16 mar. 2011.

KOHLER, O. et al. Inflammation in Depression and the Potential for Anti-Inflammatory Treatment. **Current neuropharmacology**, v. 14, n. 7, p. 732–42, 2016.

KOPP, B. L.; WICK, D.; HERMAN, J. P. Differential effects of homotypic vs. heterotypic chronic stress regimens on microglial activation in the prefrontal cortex. **Physiology & behavior**, v. 122, p. 246–52, 2 out. 2013.

KORAN, L. M.; SIMPSON, H. B. Guideline watch (March 2013): Practice guideline for the treatment of patients with obsessive-compulsive disorder. **APA Practice Guidelines**, n. March, p. 1–22, 2013.

KOZELA, E. et al. Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice. **British journal of pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1507–19, ago. 2011.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. Animal models of depression: molecular perspectives. **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 7, p. 121–47, 2011.

KROOK-MAGNUSON, E. et al. *In vivo* evaluation of the dentate gate theory in epilepsy. **The Journal of Physiology**, v. 593, n. 10, p. 2379–2388, 15 maio 2015.

KUHN, R. The treatment of depressive states with G22355 (Imipramine

hydrochloride). **American Journal of Psychiatry**, v. 115, n. 5, p. 459–464, nov. 1958.

KWON, S. E.; CHAPMAN, E. R. Synaptophysin Regulates the Kinetics of Synaptic Vesicle Endocytosis in Central Neurons. **Neuron**, v. 70, n. 5, p. 847–854, 9 jun. 2011.

LAI, K.-O.; IP, N. Y. Structural plasticity of dendritic spines: The underlying mechanisms and its dysregulation in brain disorders. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 12, p. 2257–2263, 1 dez. 2013.

LAIFENFELD, D. et al. Antidepressants and prolonged stress in rats modulate CAM-L1, laminin, and pCREB, implicated in neuronal plasticity. **Neurobiology of Disease**, v. 20, n. 2, p. 432–441, nov. 2005.

LASALVIA, A. et al. Global pattern of experienced and anticipated discrimination reported by people with major depressive disorder: A cross-sectional survey. **The Lancet**, v. 381, n. 9860, p. 55–62, 2013.

LEHMANN, H. **The Impact of the Psychopharmacological Revolution on Psychiatry**. [s.l.: s.n.].

LEI, W. et al. Actin cytoskeleton in dendritic spine development and plasticity. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 39, p. 86–92, 1 ago. 2016.

LENZE, E. J. et al. Elevated cortisol in older adults with generalized anxiety disorder is reduced by treatment: A placebo-controlled evaluation of escitalopram. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 19, n. 5, p. 482–490, 2011.

LEWEKE, F. et al. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates

psychotic symptoms of schizophrenia. **Translational Psychiatry**, v. 2, 2012.

LI, N. et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v. 329, n. 5994, p. 959–64, 20 ago. 2010.

LI, X.-L. et al. Changed Synaptic Plasticity in Neural Circuits of Depressive-Like and Escitalopram-Treated Rats. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 10, p. pyv046, 21 abr. 2015.

LINGE, R. et al. Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT_{1A} receptors. **Neuropharmacology**, v. 103, p. 16–26, 1 abr. 2016.

LIU, R. et al. Citalopram alleviates chronic stress induced depression-like behaviors in rats by activating GSK3 β signaling in dorsal hippocampus. **Brain Research**, v. 1467, p. 10–17, 2012.

LIU, R. J. et al. GSK-3 inhibition potentiates the synaptogenic and antidepressant-like effects of subthreshold doses of ketamine. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 11, p. 2268–2277, 2013.

LOMAZZO, E. et al. Therapeutic potential of inhibitors of endocannabinoid degradation for the treatment of stress-related hyperalgesia in an animal model of chronic pain. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 2, p. 488–501, jan. 2015.

LOMAZZO, E. et al. Chronic stress leads to epigenetic dysregulation in the neuropeptide-Y and cannabinoid CB₁ receptor genes in the mouse cingulate cortex. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 301–313, 1 fev. 2017.

LOOMER, H. P.; SAUNDERS, J. C.; KLINE, N. S. A clinical and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer. **Psychiatric research reports**, v. 8,

p. 129–41, dez. 1957.

LOPEZ-MUNOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic Neurotransmission: The History of the Discovery of Antidepressants from 1950s Until Today. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 14, p. 1563–1586, 2009.

LOPEZ-ROJAS, J.; HEINE, M.; KREUTZ, M. R. Plasticity of intrinsic excitability in mature granule cells of the dentate gyrus. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–12, 2016.

LOTRICH, F. E.; POLLOCK, B. G. Candidate genes for antidepressant response to selective serotonin reuptake inhibitors. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 1, n. 1, p. 17–35, mar. 2005.

LU, Y. et al. Chronic administration of fluoxetine and pro-inflammatory cytokine change in a rat model of depression. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–14, 2017.

MAGARIÑOS, A. M. et al. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. **The Journal of neuroscience**, v. 16, n. 10, p. 3534–40, 15 maio 1996.

MAGARIÑOS, A. M.; MCEWEN, B. S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: Involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. **Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 89–98, 1995.

MAGEN, I. et al. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT_{1A} receptor activation. **British journal of pharmacology**, v. 159, n. 4, p. 950–7, fev. 2010.

MAGUSCHAK, K. A.; RESSLER, K. J. A role for WNT/ β -catenin signaling in the neural mechanisms of behavior. **Journal of neuroimmune pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 763–73, dez. 2012.

MALBERG, J. E. et al. Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 24, 2000.

MARCHESI, C. Pharmacological management of panic disorder. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 4, n. 1 A, p. 93–106, 2008.

MARSHALL, R. D. et al. A controlled trial of paroxetine for chronic PTSD, dissociation, and interpersonal problems in mostly minority adults. **Depression and Anxiety**, v. 24, n. 2, p. 77–84, 2007.

MARTÍN-MORENO, A. M. et al. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. **Molecular pharmacology**, v. 79, n. 6, p. 964–73, 1 jun. 2011.

MASSART, R.; MONGEAU, R.; LANFUMEY, L. Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1601, p. 2485–2494, 2012.

MATO, S. et al. Long-term fluoxetine treatment modulates cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in the rat prefrontal cortex through 5-hydroxytryptamine 1A receptor-dependent mechanisms. **Molecular pharmacology**, v. 77, n. 3, p. 424–34, 1 mar. 2010.

MATOSIN, N. et al. Molecular evidence of synaptic pathology in the CA1 region in schizophrenia. **npj Schizophrenia**, v. 2, n. 1, p. 16022, 29 nov. 2016.

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

MATSUZAKI, M. et al. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic

spines. **Nature**, v. 429, n. 6993, p. 761–766, 17 jun. 2004.

MATTSON, M. P. et al. Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 63–80, 11 jan. 2018.

MATUSZEWICH, L. et al. The delayed effects of chronic unpredictable stress on anxiety measures. **Physiology & behavior**, v. 90, n. 4, p. 674–81, 16 mar. 2007.

MAZURE, C. M. Life stressors as risk factors in depression. **Clinical Psychology: Science and Practice**, v. 5, n. 3, p. 291–313, 1998.

MCEWEN, B. S. Stress, Adaptation, and Disease: Allostasis and Allostatic Load. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, n. 1, p. 33–44, 1 maio 1998.

MCEWEN, B. S. Stress and hippocampal plasticity. **Annual Review of Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 105–122, mar. 1999.

MCEWEN, B. S. Effects of adverse experiences for brain structure and function. **Biological Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 721–731, 15 out. 2000a.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, v. 886, n. 1–2, p. 172–189, 15 dez. 2000b.

MCEWEN, B. S. The Brain on Stress: Toward an Integrative Approach to Brain, Body, and Behavior. **Perspectives on Psychological Science**, v. 8, n. 6, p. 673–675, 2013.

MCEWEN, B. S. et al. Mechanisms of stress in the brain. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1353–1363, 2015.

MCEWEN, B. S. Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress. **Chronic**

stress (Thousand Oaks, Calif.), v. 1, 2017.

MCEWEN, B. S.; GIANAROS, P. J. Stress- and Allostasis-Induced Brain Plasticity.

Annual Review of Medicine, v. 62, n. 1, p. 431–445, 18 fev. 2011.

MCEWEN, B. S.; GRAY, J. D.; NASCA, C. Recognizing resilience: Learning from the effects of stress on the brain. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 1–11, 16 jan. 2015.

MCEWEN, B. S.; MORRISON, J. H. The Brain on Stress: Vulnerability and Plasticity of the Prefrontal Cortex over the Life Course. **Neuron**, v. 79, n. 1, p. 16–29, 2013.

MCEWEN, B. S.; WINGFIELD, J. C. What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. **Hormones and behavior**, v. 57, n. 2, p. 105–11, fev. 2010.

MCLAUGHLIN, R. J. et al. Prefrontal cortical anandamide signaling coordinates coping responses to stress through a serotonergic pathway. **European**

Neuropsychopharmacology, v. 22, n. 9, p. 664–671, 2012.

MECHOULAM, R. et al. Chemical basis of hashish activity. **Science**, v. 169, n. 945, p. 611–612, 1970.

MECHOULAM, R. et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 83–90, 1995.

MECHOULAM, R.; SHVO, Y. Hashish—I. The structure of cannabidiol. **Tetrahedron**, v. 19, n. 12, p. 2073–2078, 1963.

MENKE, A.; BINDER, E. B. Epigenetic alterations in depression and antidepressant treatment. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 395–404, 2014.

MNIE-FILALI, O. et al. R-citalopram prevents the neuronal adaptive changes induced

by escitalopram. **NeuroReport**, v. 18, n. 15, p. 1553–1556, 2007.

MOCKING, R. J. T. et al. DHEAS and cortisol/DHEAS-ratio in recurrent depression: State, or trait predicting 10-year recurrence? **Psychoneuroendocrinology**, v. 59, p. 91–101, 2015.

MORELLI, E. et al. Chronic 5-HT transporter blockade reduces DA signaling to elicit basal ganglia dysfunction. **The Journal of neuroscience**, v. 31, n. 44, p. 15742–50, 2 nov. 2011.

MORET, C. Combination/augmentation strategies for improving the treatment of depression. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 1, n. 4, p. 301–9, dez. 2005.

MORI, M. A. et al. Cannabidiol reduces neuroinflammation and promotes neuroplasticity and functional recovery after brain ischemia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 75, p. 94–105, 2017.

MØRK, A.; KREILGAARD, M.; SÁNCHEZ, C. The R-enantiomer of citalopram counteracts escitalopram-induced increase in extracellular 5-HT in the frontal cortex of freely moving rats. **Neuropharmacology**, v. 45, n. 2, p. 167–173, 2003.

MÜLLER, H. K. et al. Differential expression of synaptic proteins after chronic restraint stress in rat prefrontal cortex and hippocampus. **Brain Research**, v. 1385, p. 26–37, 2011.

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

MURPHY, N. et al. The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 exerts anti-inflammatory effects in hippocampus of aged rats and restores an age-related deficit

in long-term potentiation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, p. 1–11, 2012.

MUSAZZI, L. et al. The action of antidepressants on the glutamate system: Regulation of glutamate release and glutamate receptors. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1180–1188, 2013.

MUSSELMAN, D. et al. The impact of escitalopram on IL-2-induced neuroendocrine, immune, and behavioral changes in patients with malignant melanoma: preliminary findings. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 10, p. 1921–8, set. 2013.

MUTLU, O. et al. Effects of fluoxetine, tianeptine and olanzapine on unpredictable chronic mild stress-induced depression-like behavior in mice. **Life Sciences**, v. 91, n. 25–26, p. 1252–1262, 2012.

NABISSI, M. et al. Cannabidiol stimulates Aml-1a-dependent glial differentiation and inhibits glioma stem-like cells proliferation by inducing autophagy in a TRPV2-dependent manner. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 8, p. 1855–1869, 15 out. 2015.

NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Endocannabinoids Mediate Neuron-Astrocyte Communication. **Neuron**, v. 57, n. 6, p. 883–893, 2008.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161–1169, 27 out. 2010.

NIERENBERG, A. A. et al. Duloxetine versus escitalopram and placebo in the treatment of patients with major depressive disorder: onset of antidepressant action, a non-inferiority study. **Current Medical Research and Opinion**, v. 23, n. 2, p. 401–416, 23 fev. 2007.

NIETO-GONZALEZ, J. L. et al. Presynaptic plasticity as a hallmark of rat stress

susceptibility and antidepressant response. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119993, 2015.

NORMANN, C. et al. Antidepressants Rescue Stress-Induced Disruption of Synaptic Plasticity via Serotonin Transporter-Independent Inhibition of L-Type Calcium Channels. **Biological Psychiatry**, p. 1–10, 2017.

O'REILLY, K. C. et al. Chronic Administration of 13-Cis-Retinoic Acid Increases Depression-Related Behavior in Mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 9, p. 1919–1927, 4 set. 2006.

OHASHI, S. et al. Changes in synaptic plasticity in the rat hippocampo-medial prefrontal cortex pathway induced by repeated treatments with fluvoxamine. **Brain Research**, v. 949, n. 1–2, p. 131–138, 2002.

PARK, S. W. et al. Differential effects of antidepressant drugs on mTOR signalling in rat hippocampal neurons. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 11, p. 1831–1846, 5 nov. 2014.

PATEL, S.; HILLARD, C. J. Adaptations in endocannabinoid signaling in response to repeated homotypic stress: a novel mechanism for stress habituation. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2821–2829, 1 jun. 2008.

PELIÇÃO, R. et al. URB597 inhibits oxidative stress induced by alcohol bingeing in the prefrontal cortex of adolescent rats. **Neuroscience Letters**, v. 624, p. 17–22, 15 jun. 2016.

PELLISSOLO, A.; MOUKHEIBER, A. Open-label treatment with escitalopram in patients with social anxiety disorder and fear of blushing. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 33, n. 5, p. 695–698, 2013.

PHAM, K. et al. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 4, p. 879–886, 2003.

PIERZ, K. A.; THASE, M. E. A review of vilazodone, serotonin, and major depressive disorder. **The primary care companion for CNS disorders**, v. 16, n. 1, 2014.

PITTENGER, C.; BLOCH, M. H. Pharmacological treatment of obsessive-compulsive disorder. **The Psychiatric clinics of North America**, v. 37, n. 3, p. 375–91, 2014.

PLETSCHER, A.; SHORE, P. A.; BRODIE, B. B. Serotonin as a mediator of reserpine action in brain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 116, n. 1, 1956.

POPOLI, M. Synaptotagmin is endogenously phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin protein kinase II in synaptic vesicles. **FEBS Letters**, v. 317, n. 1–2, p. 85–88, 8 fev. 1993.

POPOLI, M. et al. Presynaptic Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II: Autophosphorylation and Activity Increase in the Hippocampus after Long-term Blockade of Serotonin Reuptake. **Molecular pharmacology**, v. 48, n. 4, p. 623–629, 1995.

POPOLI, M. et al. Long-term blockade of serotonin reuptake affects synaptotagmin phosphorylation in the hippocampus. **Molecular pharmacology**, v. 51, n. 1, p. 19–26, 1 jan. 1997.

POPOLI, M. et al. Second Messenger-Regulated Protein Kinases in the Brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, n. 1, p. 21–33, 25 dez. 2001.

PRATER, K. E. et al. Aberrant amygdala-frontal cortex connectivity during perception

of fearful faces and at rest in generalized social anxiety disorder. **Depression and Anxiety**, v. 30, n. 3, p. 234–241, 2013.

PULL, C. B.; DAMSA, C. Pharmacotherapy of panic disorder. [References]. v. 4, n. 4, p. 779–795, 2008.

QU, Y. et al. Regional differences in dendritic spine density confer resilience to chronic social defeat stress. **Acta Neuropsychiatrica**, 2018.

RADLEY, J. J. et al. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 16, n. 3, p. 313–320, 2006.

RAMACHANDRAIH, C. T. et al. Antidepressants: From MAOIs to SSRIs and more. **Indian journal of psychiatry**, v. 53, n. 2, p. 180–2, abr. 2011.

RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, G. et al. Melatonin synergizes with citalopram to induce antidepressant-like behavior and to promote hippocampal neurogenesis in adult mice. **Journal of Pineal Research**, v. 56, n. 4, p. 450–461, 1 maio 2014.

RAMSAY, D. S.; WOODS, S. C. Clarifying the roles of homeostasis and allostasis in physiological regulation. **Psychological review**, v. 121, n. 2, p. 225–47, abr. 2014.

RAPP, S. et al. Differential regulation of synaptic vesicle proteins by antidepressant drugs. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 4, n. 2, p. 110–113, 6 abr. 2004.

RAUCH, S. A. M. et al. Biological and Symptom Changes in Posttraumatic Stress Disorder Treatment: a Randomized Clinical Trial. **Depression and Anxiety**, v. 32, n. 3, p. 204–212, 2015.

RAZZOLI, M. et al. Strain-specific outcomes of repeated social defeat and chronic fluoxetine treatment in the mouse. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 3, p. 566–576, 1 jan. 2011a.

RAZZOLI, M. et al. Different susceptibility to social defeat stress of BalbC and C57BL6/J mice. **Behavioural Brain Research**, v. 216, n. 1, p. 100–108, 1 jan. 2011b.

RENARD, J. et al. Neuronal and molecular effects of cannabidiol on the mesolimbic dopamine system: Implications for novel schizophrenia treatments. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 75, p. 157–165, 1 abr. 2017.

RESSTEL, L. B. M. et al. 5-HT_{1A} receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, n. 1, p. 181–188, 2009.

RÉUS, G. Z. et al. Ketamine plus imipramine treatment induces antidepressant-like behavior and increases CREB and BDNF protein levels and PKA and PKC phosphorylation in rat brain. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 1, p. 166–171, 1 ago. 2011.

RICKELS, K. et al. Remission of generalized anxiety disorder: a review of the paroxetine clinical trials database. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 67, n. 1, p. 41–7, jan. 2006.

ROCHEFORT, N. L.; KONNERTH, A. Dendritic spines: from structure to in vivo function. **EMBO reports**, v. 13, n. 8, p. 699–708, ago. 2012.

ROMERO, L. M.; DICKENS, M. J.; CYR, N. E. The reactive scope model — A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. **Hormones and Behavior**, v. 55, p. 375–389, 2009.

RUSSO, E. B. et al. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. **Neurochemical Research**, v. 30, n. 8, p. 1037–1043, 2005.

RUSSO, S. J. et al. Neurobiology of resilience. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 1475–1484, 14 nov. 2012.

RUTKOWSKA, M.; JACHIMCZUK, O. Antidepressant - Like properties of acea (arachidonyl-2-chloroethylamide), the selective agonist of CB1 receptors. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 61, n. 2, p. 165–167, 2004.

SAMUELS, B. A. et al. 5-HT_{1A} receptors on mature dentate gyrus granule cells are critical for the antidepressant response. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 11, p. 1606–1616, 21 nov. 2015.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: An emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 63–77, 2012.

SANCHEZ, C.; REINES, E. H.; MONTGOMERY, S. A. A comparative review of escitalopram, paroxetine, and sertraline: Are they all alike? **International clinical psychopharmacology**, v. 29, n. 4, p. 185–96, jul. 2014.

SANTARELLI, L. et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805–9, 8 ago. 2003.

SANTOS, N. A. G. et al. The neuroprotection of cannabidiol against MPP⁺-induced toxicity in PC12 cells involves trkA receptors, upregulation of axonal and synaptic proteins, neuriteogenesis, and might be relevant to Parkinson's disease. **Toxicology in Vitro**, v. 30, n. 1, p. 231–240, 2015.

SCHAEFER, N. et al. The malleable brain: plasticity of neural circuits and behavior - a review from students to students. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, n. 6, p. 790–811, 1 set. 2017.

SCHATZBERG, A. F.; NEMEROFF, C. B. **The American Psychiatric Publishing textbook of psychopharmacology**. [s.l.] American Psychiatric Pub, 2009.

SCHIAVON, A. P. et al. Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 27–34, 2016.

SCHILDKRAUT, J. J. the Catecholamine Hypothesis of Affective Disorders: a Review of Supporting Evidence. **American Journal of Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509–522, 1965.

SCHLESS, A. P. et al. The role of stress as a precipitating factor of psychiatric illness. **British Journal of Psychiatry**, v. 130, n. 1, p. 19–22, 1977.

SCHNEIER, F. R. Pharmacotherapy of social anxiety disorder. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 12, n. 4, p. 615–625, 18 mar. 2011.

SCHUBERT, V.; DOTTI, C. G. Transmitting on actin: synaptic control of dendritic architecture. **Journal of cell science**, v. 120, n. Pt 2, p. 205–12, 15 jan. 2007.

SCHULTE-HERBRÜGGEN, O. et al. Effects of escitalopram on the regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor protein levels in a rat model of chronic stress. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 11, p. 2551–2560, 2009.

SEO, M. K. et al. Effects of antidepressant drugs on synaptic protein levels and dendritic outgrowth in hippocampal neuronal cultures. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 222–233, 1 abr. 2014.

SEO, M. K. et al. Effects of escitalopram and paroxetine on mTORC1 signaling in the

rat hippocampus under chronic restraint stress. **BMC Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 39, 26 dez. 2017.

SHALABY, A.; KAMAL, S. Effect of Escitalopram on GABA level and anti-oxidant markers in prefrontal cortex and nucleus accumbens of chronic mild stress-exposed albino rats. **International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology**, v. 1, n. 2, p. 154–161, 20 jun. 2009.

SHAW, D. M.; CAMPS, F. E.; ECCLESTON, E. G. 5-Hydroxytryptamine in the hind-brain of depressive suicides. **Br J Psychiatry**, v. 113, n. 505, p. 1407–1411, 1967.

SHELINE, Y. I.; GADO, M. H.; KRAEMER, H. C. Untreated depression and hippocampal volume loss 34. **Am.J Psychiatry**, v. 160, n. 0002–953X (Print), p. 1516–1518, 2003.

SHOEB, A. et al. Evaluation of antidepressant activity of vanillin in mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 45, n. 2, p. 141, 2013.

SHORE, P. A. et al. Role of Brain Serotonin in Reserpine Action. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 66, n. 3, p. 609–617, 1957.

SHORS, T. J.; DRYVER, E. Effect of stress and long-term potentiation (LTP) on subsequent LTP and the theta burst response in the dentate gyrus. **Brain research**, v. 666, n. 2, p. 232–8, 15 dez. 1994.

SHORS, T. J.; SERVATIUS, R. J. Stress-induced sensitization and facilitated learning require NMDA receptor activation. **Neuroreport**, v. 6, n. 4, p. 677–80, 7 mar. 1995.

SHOSHAN, N. et al. Cannabinoids prevent the differential long-term effects of exposure to severe stress on hippocampal- and amygdala-dependent memory and

plasticity. **Hippocampus**, jul. 2017.

SMAGA, I. et al. Antidepressants and Changes in Concentration of Endocannabinoids and N-Acylethanolamines in Rat Brain Structures. **Neurotoxicity Research**, v. 26, n. 2, p. 190–206, 21 ago. 2014.

SMAGA, I. et al. Changes in the cannabinoids receptors in rats following treatment with antidepressants. **NeuroToxicology**, v. 63, p. 13–20, 1 dez. 2017.

SONG, S.-H.; AUGUSTINE, G. J. Synapsin Isoforms and Synaptic Vesicle Trafficking. **Molecules and cells**, v. 38, n. 11, p. 936–40, nov. 2015.

SONG, Y.; ZHANG, J.; CHEN, C. Fine-tuning of synaptic upscaling at excitatory synapses by endocannabinoid signaling is mediated via the CB1 receptor. **Scientific Reports**, v. 5, p. 16257, 6 nov. 2015.

SPENCE, E. F.; SODERLING, S. H. Actin Out: Regulation of the Synaptic Cytoskeleton. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 48, p. 28613–22, 27 nov. 2015.

SPINDELEGGGER, C. et al. Influence of escitalopram treatment on 5-HT_{1A} receptor binding in limbic regions in patients with anxiety disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 11, p. 1040–1050, 25 nov. 2009.

STEIN, D. J. et al. Efficacy of Sertraline in Posttraumatic Stress Disorder Secondary to Interpersonal Trauma or Childhood Abuse. **Annals of Clinical Psychiatry**, v. 18, n. 4, p. 243–249, 1 set. 2006.

STEIN, D. J. et al. Efficacy of sertraline in posttraumatic stress disorders secondary to interpersonal trauma or childhood abuse. **Annals of Clinical Psychiatry**, v. 18, n. 4, p. 243–249, 2015.

STEINER, M. A. et al. Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 8, p. 196, 7 ago. 2007.

STELLA, N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. **Glia**, v. 58, n. 9, p. 1017–1030, 2010.

STERU, L. et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367–370, 1985.

SU, S. H. et al. Cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 and fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 may protect against cognitive impairment in rats of chronic cerebral hypoperfusion via PI3K/AKT signaling. **Behavioural Brain Research**, v. 313, p. 334–344, 2016.

SÜDHOF, T. C. A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. **Nature Medicine**, v. 19, n. 10, p. 1227–1231, 1 out. 2013.

SWITON, K. et al. Molecular neurobiology of mTOR. **Neuroscience**, v. 341, p. 112–153, 26 jan. 2017.

TAKAHASHI, E. et al. Additive subthreshold dose effects of cannabinoid CB1 receptor antagonist and selective serotonin reuptake inhibitor in antidepressant behavioral tests. **European Journal of Pharmacology**, v. 589, n. 1–3, p. 149–156, 28 jul. 2008.

TAKAMORI, S. et al. Molecular anatomy of a trafficking organelle. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 831–46, 17 nov. 2006.

TALLARIDA, R. J. Quantitative methods for assessing drug synergism. **Genes & cancer**, v. 2, n. 11, p. 1003–8, nov. 2011.

TANG, S.-J. Synaptic Activity-Regulated Wnt Signaling in Synaptic Plasticity, Glial Function and Chronic Pain. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 13, n. 5, p. 737–744, 18 jul. 2014.

TARDITO, D. et al. Signaling pathways regulating gene expression, neuroplasticity, and neurotrophic mechanisms in the action of antidepressants: a critical overview. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 1, p. 115–34, 1 mar. 2006.

THAKARE, V. N. et al. Therapeutic potential of silymarin in chronic unpredictable mild stress induced depressive-like behavior in mice. **Journal of Psychopharmacology**, p. 26988111774266, 2017.

THASE, M. E.; ENTSUAH, A. R.; RUDOLPH, R. L. Remission rates during treatment with venlafaxine or selective serotonin reuptake inhibitors. 1999.

THOME, J. et al. Stress differentially regulates synaptophysin and synaptotagmin expression in hippocampus. **Biological Psychiatry**, v. 50, n. 10, p. 809–812, 2001.

THOMPSON, S. M. et al. An excitatory synapse hypothesis of depression. **Trends in Neurosciences**, v. 38, n. 5, p. 279–294, 2015.

TODD, S. M. et al. Interactions between cannabidiol and Δ^9 -THC following acute and repeated dosing: Rebound hyperactivity, sensorimotor gating and epigenetic and neuroadaptive changes in the mesolimbic pathway. **European Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 2, p. 132–145, 1 fev. 2017.

UMATHE, S. N.; MANNA, S. S. S.; JAIN, N. S. Involvement of endocannabinoids in antidepressant and anti-compulsive effect of fluoxetine in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 223, n. 1, p. 125–134, 30 set. 2011.

VALLÉE, A. et al. Effects of cannabidiol interactions with Wnt/ β -catenin pathway and

PPAR γ on oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 49, n. 10, p. 853–866, out. 2017.

VAN BOXELAERE, M. et al. Unpredictable chronic mild stress differentially impairs social and contextual discrimination learning in two inbred mouse strains. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–22, 2017.

VAN DER STELT, M. et al. Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca²⁺ influx via TRPV1 channels. **EMBO Journal**, v. 24, n. 17, p. 3026–3037, 2005.

VAN ROOIJ, S. J. H. et al. Smaller hippocampal volume as a vulnerability factor for the persistence of post-traumatic stress disorder. **Psychological Medicine**, v. 45, n. 13, p. 2737–2746, 2015.

VAREA, E. et al. Chronic antidepressant treatment induces contrasting patterns of synaptophysin and PSA-NCAM expression in different regions of the adult rat telencephalon. **European Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 8, p. 546–557, 1 jul. 2007.

VEER, I. M. Whole brain resting-state analysis reveals decreased functional connectivity in major depression. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 4, n. September, p. 1–10, 2010.

VERONA, M. et al. Changes of Synaptotagmin Interaction with t-SNARE Proteins In Vitro After Calcium/Calmodulin-Dependent Phosphorylation. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, n. 1, p. 209–221, 25 dez. 2001.

VIALOU, V. et al. **Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action**. [s.l: s.n.]. v. 53

VIGO, D.; THORNICROFT, G.; ATUN, R. Estimating the true global burden of mental illness. **The Lancet Psychiatry**, v. 3, n. 2, p. 171–178, 1 fev. 2016.

VINOD, K. Y. et al. Dysfunction in fatty acid amide hydrolase is associated with depressive-like behavior in Wistar Kyoto rats. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36743, 2012.

VOLETI, B. et al. Scopolamine Rapidly Increases Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Signaling, Synaptogenesis, and Antidepressant Behavioral Responses. **Biological Psychiatry**, v. 74, n. 10, p. 742–749, 15 nov. 2013.

WADE, A.; FRIIS ANDERSEN, H. The onset of effect for escitalopram and its relevance for the clinical management of depression. **Current Medical Research and Opinion**, v. 22, n. 11, p. 2101–2110, 22 nov. 2006.

WAGNER, K. V. et al. Differences in FKBP51 regulation following chronic social defeat stress correlate with individual stress sensitivity: Influence of paroxetine treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 13, p. 2797–2808, 2012.

WANG, D. et al. URB597 improves cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion by inhibiting mTOR-dependent autophagy. **Neuroscience**, v. 344, p. 293–304, 6 mar. 2017.

WANG, Y.-J. et al. Escitalopram attenuates β -amyloid-induced tau hyperphosphorylation in primary hippocampal neurons through the 5-HT_{1A} receptor mediated Akt/GSK-3 β pathway. **Oncotarget**, v. 7, n. 12, p. 13328–13339, 22 mar. 2016.

WATANABE, Y.; GOULD, E.; MCEWEN, B. S. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Brain Research**, v. 588, n. 2, p. 341–345, 1992.

WEI, J. et al. Histone Modification of Nedd4 Ubiquitin Ligase Controls the Loss of AMPA Receptors and Cognitive Impairment Induced by Repeated Stress. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 7, p. 2119–2130, 2016.

WILLNER, P. et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, n. 3, p. 358–364, 1987.

WILLNER, P. Reliability of the chronic mild stress model of depression: A user survey. **Neurobiology of Stress**, v. 6, p. 68–77, 1 fev. 2017.

WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: A realistic animal model of depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 16, n. 4, p. 525–534, 1992.

WOLF, S. A. et al. Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis. **Cell Communication and Signaling : CCS**, v. 8, p. 12, 17 jun. 2010.

WONG, D. T. et al. A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. **Life sciences**, v. 15, n. 3, p. 471–9, 1 ago. 1974.

WOOK KOO, J. et al. Essential Role of Mesolimbic Brain-Derived Neurotrophic Factor in Chronic Social Stress–Induced Depressive Behaviors. **Biological Psychiatry**, v. 80, n. 6, p. 469–478, 15 set. 2016.

XIAO, L. et al. Comparison of residual depressive symptoms and functional impairment between fully and partially remitted patients with major depressive disorder: a multicenter study. **Psychiatry research**, v. 261, n. August 2017, p. 547–

553, 2018.

XU, H.; STEVEN RICHARDSON, J.; LI, X.-M. Dose-Related Effects of Chronic Antidepressants on Neuroprotective Proteins BDNF, Bcl-2 and Cu/Zn-SOD in Rat Hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 53–62, 16 jan. 2003.

YAGER, J. et al. Guideline watch (august 2012): practice guideline for the treatment of patients with eating disorders, 3rd edition. **Focus**, v. 12, n. August, p. 18, 2012.

YAMAORI, S. et al. Potent inhibition of human cytochrome P450 3A isoforms by cannabidiol: Role of phenolic hydroxyl groups in the resorcinol moiety. **Life Sciences**, v. 88, n. 15–16, p. 730–736, 11 abr. 2011.

YANG, K.-H. et al. The nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol inhibits 5-hydroxytryptamine_{3A} receptor-mediated currents in *Xenopus laevis* oocytes. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 333, n. 2, p. 547–54, 1 maio 2010.

YOUNG, L. T. Neuroprotective effects of antidepressant and mood stabilizing drugs. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, v. 27, n. 1, p. 8–9, jan. 2002.

YUEN, E. Y.; WEI, J.; YAN, Z. Molecular and Epigenetic Mechanisms for the Complex Effects of Stress on Synaptic Physiology and Cognitive Functions. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 2017, p. 948–955, 2017.

ZANELATI, T. V et al. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT_{1A} receptors. **British journal of pharmacology**, v. 159, n. 1, p. 122–8, jan. 2010.

ZELLER, E. A.; BARSKY, J. In vivo Inhibition of Liver and Brain Monoamine Oxidase

by 1-Isonicotinyl-2-Isopropyl Hydrazine. **Experimental Biology and Medicine**, v. 81, n. 2, p. 459–461, 1 nov. 1952.

ZENG, L. L. et al. Identifying major depression using whole-brain functional connectivity: A multivariate pattern analysis. **Brain**, v. 135, n. 5, p. 1498–1507, 2012.

ZHANG, J. et al. Disrupted brain connectivity networks in drug-naive, first-episode major depressive disorder. **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 4, p. 334–342, 2011.

ZHANG, Y. et al. Dopamine Receptor D2 and Associated microRNAs Are Involved in Stress Susceptibility and Resistance to Escitalopram Treatment. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 8, p. pyv025-pyv025, 5 jun. 2015.

ZHAO, H. et al. Anti-depressant-like effects of Jieyu chufan capsules in a mouse model of unpredictable chronic mild stress. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, n. 2, p. 1086–1094, 2017.

ZHAO, L.; AU, J. L.-S.; WIENTJES, M. G. Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 2, p. 241–9, 1 jan. 2010.

ZHONG, H.; HADDJERI, N.; SÁNCHEZ, C. Escitalopram, an antidepressant with an allosteric effect at the serotonin transporter—a review of current understanding of its mechanism of action. **Psychopharmacology**, v. 219, n. 1, p. 1–13, 8 jan. 2012.

ZHOU, W.-J. et al. The antidepressant roles of Wnt2 and Wnt3 in stress-induced depression-like behaviors. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 9, p. e892, 13 set. 2016.

ZOHAR, I. et al. Sex dependent reduction by prenatal stress of the expression of 5HT1A receptors in the prefrontal cortex and CRF type 2 receptors in the raphe

nucleus in rats: Reversal by citalopram. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 9, p. 1643–1653, 2015.

ZSCHOCKE, J. et al. Antidepressant Drugs Diversely Affect Autophagy Pathways in Astrocytes and Neurons—Dissociation from Cholesterol Homeostasis.

Neuropsychopharmacology, v. 36, n. 8, p. 1754–1768, 20 jul. 2011.

ZU, X. et al. Antidepressant-like Effect of Bacopaside I in Mice Exposed to Chronic Unpredictable Mild Stress by Modulating the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis Function and Activating BDNF Signaling Pathway. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 11, p. 3233–3244, 2017.

ZUARDI, A. W. et al. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. **Psychopharmacology**, 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**, v. 104, n. 2, p. 260–4, 1991.