Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento

**Efeitos comportamentais do canabidiol em um
modelo de psicose induzida por S(+)-ketamina
em ratos Wistar**

JANA BATISTA DE ROSS

Ribeirão Preto

2012

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento

**Efeitos comportamentais do canabidiol em um
modelo de psicose induzida por S(+)-ketamina
em ratos Wistar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, subárea Neurociências.

Aluna: Jana Batista De Ross

**Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Neves
Romcy-Pereira**

Ribeirão Preto

2012

De Ross, Jana Batista

Efeitos comportamentais do canabidiol em um modelo de psicose induzida por S(+)-ketamina em ratos Wistar. Ribeirão Preto, 2012.
81 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Subárea: Neurociências.

Orientador: Romcy-Pereira, Rodrigo Neves.

1. canabidiol; 2. esquizofrenia; 3. psicose; 4. S(+)-ketamina; 5. clozapina; 6. atividade locomotora; 7. Inibição pré-pulso; 8. interação social.

**Aos meus pais, pelo incrível suporte
em todos os momentos...
Ao Rafa, pela companhia e pelo apoio,
tão especiais...**

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador Rodrigo, pela motivação com a neurociência e pela orientação e ajuda no desenvolvimento desse trabalho;
- Ao Dr João por todo suporte necessário;
- Ao prof Jaime, prof Crippa e prof Zuardi, pelas ideias, pela ajuda com a interpretação dos resultados, e pela doação das drogas utilizadas nesse trabalho, especialmente o canabidiol;
- À técnica Renata, pelas infinitas ajudas;
- Aos colegas de laboratório, por deixarem o ambiente tão agradável, e pela ajuda em todos os momentos necessários, além das discussões científicas;
- Às minhas amigas especiais Ana, Mari, Fabi, Melina e Lara, pela companhia e compreensão;
- Aos cachorros Chico, Bartô e Fátima, por deixarem os dias mais leves com sua presença;
- Ao Rafa, por ser alguém infinitamente especial e um companheiro pra toda vida, obrigada por toda ajuda, compreensão nessa fase difícil, e apoio fundamental;
- Aos meus pais, pelo suporte emocional e financeiro nos momentos difíceis e por servirem de exemplo a ser seguido sempre;
- A CNPq e FAEPA, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A esquizofrenia é uma desordem neuropsiquiátrica de importância significativa para as pesquisas na área da saúde, porém, apesar de ser alvo de inúmeros estudos clínicos e básicos ainda são levantadas muitas dúvidas a respeito de sua etiologia, fisiopatologia e tratamento. Nos últimos anos, hipóteses que relacionam a esquizofrenia a alterações em sistemas neurotransmissores têm sido bem relevantes. Atualmente a hipótese glutamatérgica complementa a dopaminérgica, já que o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA induz sintomas do tipo psicóticos em indivíduos saudáveis e exacerba ou precipita sintomas da esquizofrenia em indivíduos portadores da doença, sugerindo que um estado hipofuncional desses receptores possa causar alterações secundárias em outros sistemas neurotransmissores e provocar tanto os sintomas positivos e negativos quanto os déficits cognitivos da doença. O canabidiol (CBD) é um composto derivado da *Cannabis sativa* que não apresenta os efeitos psicotomiméticos e os sintomas colaterais geralmente provocados pela utilização da planta e que são, em sua maioria, atribuídos ao delta-9-tetrahydrocannabinol (THC). Recentemente os estudos a respeito da participação do sistema endocanabinóide em diversos estados fisiológicos e, também em transtornos psiquiátricos, apontam o uso terapêutico de canabinóides como uma estratégia promissora para o controle e prevenção de alguns sintomas ligados a transtornos psicóticos. O perfil antipsicótico do CBD já foi comprovado em modelos experimentais e até em análises clínicas, indicando que esse composto é capaz de prevenir estados psicóticos transitórios, provocados tanto pelo THC quanto pela ketamina, em modelos de psicose induzida. O objetivo deste trabalho foi incrementar as informações já existentes sobre o perfil antipsicótico proposto para o CBD, porém, em três tipos de tarefas comportamentais em roedores, que representam três classes de sintomas do tipo psicóticos que se assemelham aos sintomas da esquizofrenia: atividade locomotora, inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto (PPI) e teste de interação social. No modelo utilizado, a S(+)-ketamina (KET) é eficaz na indução de comportamentos que representem sintomas do tipo psicóticos – provocou hiperlocomoção, déficit no filtro sensório-motor e prejuízo no comportamento social. Esses foram reduzidos quando realizado pré-tratamento com clozapina, com exceção do teste de interação social. Os efeitos do CBD são de acordo com o que é descrito na literatura, apresentando uma curva em U farmacológica característica e diferentes efeitos

de acordo com a dose empregada. A análise no monitor de atividades indica que o pré-tratamento com CBD na dose de 30 mg/kg previne a hiperlocomção induzida por KET, contrastando com o pré-tratamento com CBD na dose de 60 mg/kg, que provoca o aumento do comportamento exploratório após a administração de KET. No PPI, o CBD na dose de 30 mg/kg previne o déficit provocado pela administração de KET, demonstrando-se eficaz para o tratamento de prejuízos cognitivos que acompanham as psicoses; e aumenta o reflexo de sobressalto quando associado a KET. Porém, no teste de interação social, não foram detectadas diferenças significativas. Portanto, com esses resultados, demonstrou-se que o CBD pode ser realmente efetivo para o tratamento de determinados sintomas dos transtornos psicóticos, assim como indicado em alguns trabalhos já desenvolvidos.

Palavras-chave: canabidiol, esquizofrenia, psicose, S(+)-ketamina, clozapina, atividade locomotora, inibição pré-pulso, interação social

ABSTRACT

Schizophrenia is a psychiatric disorder of significant importance for research in health care, however, despite being the target of numerous clinical and basic studies, there are still many doubts raised about its etiology, pathophysiology and treatment. In recent years, schizophrenia hypotheses that relate to changes in neurotransmitter systems have been very relevant. Currently, the glutamatergic hypothesis complements the dopaminergic, since blockade of NMDA glutamate receptors induces psychotic symptoms in healthy individuals and exacerbate them in patients with schizophrenia, suggesting that a hypofunctional state of these receptors may cause secondary changes in other neurotransmitter systems, leading to positive and negative symptoms and also to cognitive deficits of the disease. Cannabidiol (CBD) is a compound derived from *Cannabis sativa* that does not show neither the psychotomimetic effects nor side effect symptoms typically caused by the plant use, which are mostly attributed to delta-9-tetrahydrocannabinol (THC). Recently studies about the involvement of the endocannabinoid system in various physiological states and also in psychiatric disorders, suggest the therapeutic use of cannabinoids as a promising strategy for the prevention and control of some symptoms linked, for example, to anxiety, epilepsy and psychotic disorders. The antipsychotic profile of CBD has been confirmed in experimental

models and even in clinical trials, indicating that this compound is capable of preventing transient psychotic states caused both by THC and S (+)-ketamine (KET) in psychosis-induced models. The objective of this study was to enhance the existing information on the antipsychotic profile proposed for the CBD, however, three types of behavioral tasks were made for the analysis of three classes of psychotic-like symptoms in rodents, which are manifested through hyperlocomotion (positive symptoms), impairment in social interaction (negative symptoms) and a deficit in sensorimotor gating (cognitive deficits). The effects achieved with CBD are in accordance with the described in literature, a characteristic U-shaped curve and different pharmacological effects according to dose used. The analysis in the open field reveals that animals pretreated with CBD at a dose of 30 mg/kg shows a reduction in KET-induced hyperlocomotion, contrasting with the effects of CBD at a dose of 60 mg/kg, that enhances exploratory behavior after KET injection. In the PPI, the CBD at a dose of 30 mg/kg prevented the deficit caused by KET administration, showing effectiveness for the treatment of cognitive impairments that accompany psychosis; and enhances startle reflex when associated to KET. Therefore, with these results, it was demonstrated that CBD may be really effective for the treatment of certain symptoms of psychotic disorders, in accordance to some already developed studies.

Keywords: psychosis, NMDA antagonism, S(+)-ketamine, cannabidiol, locomotor activity, prepulse inhibition, social interaction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Mecanismos neurofisiológicos da esquizofrenia.....	9
1.1.1. Hipótese dopaminérgica.....	10
1.1.2. Hipótese glutamatérgica.....	11
1.2. Modelos farmacológicos para o estudo da psicose.....	12
1.2.1. Utilização da ketamina em modelos animais de psicose.....	13
1.3. Antipsicóticos.....	16
1.4. Sistema endocanabinóide e esquizofrenia.....	18
1.4.1. Canabinóides e psicose.....	19
1.4.2. Canabidiol e seu possível efeito antipsicótico.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVO GERAL	25
3.1. Objetivos específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. Animais	26
4.2. Drogas.....	26
4.3. Grupos	27
4.4. Análises comportamentais	28
4.5. Análise estatística	31
4.6. Paradigma experimental.....	32

5. RESULTADOS	33
5.1. Experimento 1	33
5.2. Experimento 2	49
5.3. Experimento 3	55
6. DISCUSSÃO	57
6.1. Efeitos comportamentais do canabidiol.....	57
6.2. Mecanismos de ação propostos para o canabidiol.....	61
6.3. Perfil antipsicótico proposto para o canabidiol	68
7. CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

A esquizofrenia refere-se a um agrupamento de desordens neuropsiquiátricas crônicas que afeta cerca de 1 % da população, podendo resultar em uma deterioração do indivíduo no âmbito pessoal, social e profissional (Andreasen, 1995). É geralmente caracterizada por manifestações clínicas clássicas como os chamados sintomas positivos (alucinações, delírios e desordens de pensamento), sintomas negativos (déficits na interação social, na expressão emocional e na motivação), além de déficits cognitivos (prejuízo na atenção, no aprendizado associativo e na memória de trabalho) (Saha et al., 2005). Não existem testes diagnósticos específicos para a esquizofrenia, nem marcadores biológicos que definam o início e a progressão da doença. O tratamento é sintomático e a fisiopatologia permanece controversa (Tamminga; Davis, 2007). Portanto, todos esses fatores apontam a necessidade de se investigar a fisiopatologia dessa doença mental tão complexa, buscando assim novos alvos terapêuticos e agentes farmacológicos eficazes.

Muitas categorias de doenças podem ser definidas por uma fisiopatologia molecular específica, o que não é o caso da esquizofrenia, cujo diagnóstico é definido através de representações comportamentais e do curso da doença. Dentre toda a sintomatologia, um dos componentes típicos da esquizofrenia é a psicose, alvo dos antipsicóticos atuais, cuja farmacologia envolve o antagonismo dopaminérgico ou de outras monoaminas (Leucht et al., 2009). Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV), a definição mais restrita de psicose inclui delírios e alucinações proeminentes, ocorrendo sem a compreensão de sua natureza patológica.

1.1. MECANISMOS NEUROFISIOLÓGICOS DA ESQUIZOFRENIA

Existem evidências de alterações em alguns sistemas de neurotransmissores na esquizofrenia, entre eles o dopaminérgico, glutamatérgico, GABAérgico, serotoninérgico e endocanabinóide (Meltzer et al., 2003; Stone et al., 2007; Leweke; Koethe, 2008). É difícil estabelecer quais são os papéis individuais de cada neurotransmissor na doença, visto que cada sistema é complexo e compreende mais de um tipo de receptor, atuando em regiões

frontais, límbicas, estriatais e talâmicas. Além disso, deve ser considerada a interação entre os neurotransmissores, passível da atuação de mecanismos compensatórios.

Considerando as alterações neuroquímicas que ocorrem na esquizofrenia, existem modelos baseados principalmente em dois neurotransmissores, a dopamina e o glutamato. De acordo com as primeiras teorias, os sintomas psicóticos são resultado de uma perturbação no balanço entre os sistemas dopaminérgico subcortical e cortical (Laviolette, 2007). Um estado hipofuncional do sistema dopaminérgico cortical pode ser responsável pelo desenvolvimento dos sintomas negativos, enquanto que os sintomas positivos podem ser atribuídos ao aumento da atividade dopaminérgica no sistema límbico (Knable; Weinberger, 1997). O sistema dopaminérgico cortical e o subcortical estão funcionalmente conectados através do sistema glutamatérgico (Sesack et al., 2003). Sendo assim, a inferência recente é que uma disfunção glutamatérgica deve ocorrer primariamente à disfunção dopaminérgica, podendo precipitar os sintomas psicóticos.

1.1.1. HIPÓTESE DOPAMINÉRGICA

Tradicionalmente, o foco da maioria dos modelos animais era reproduzir alterações ligadas ao sistema dopaminérgico, visto que antipsicóticos efetivos são antagonistas de receptores dopaminérgicos do tipo D2 e agonistas desse receptor, como a apomorfina, ou drogas que aumentam a liberação de dopamina, no caso a anfetamina, induzem sintomas que se assemelham a sintomas psicóticos (Kornetsky; Markowitz, 1978). A suspeita era de que os sintomas psicóticos surgiam devido a um estado cerebral hiperdopaminérgico, o que ganhou suporte através de modelos animais focados nas alterações comportamentais relacionadas a antagonistas e agonistas dopaminérgicos (Snyder, 1972).

A interconexão cortical e subcortical é evidente na neurotransmissão dopaminérgica. Portanto, regiões como córtex pré-frontal, núcleo *accumbens*, amígdala e área tegmentar ventral estão funcionalmente conectadas (Laviolette, 1997). A teoria dopaminérgica da esquizofrenia especula que ocorra uma hipodopaminergia nas vias mesocorticais e uma hiperdopaminergia nas vias corticolímbicas. Devido a isso, o estado hipoativado dos neurônios corticais seria responsável pelos sintomas negativos e pelos

déficits cognitivos. Em situações normais, esses neurônios corticais inibem os neurônios dopaminérgicos subcorticais. Evidências indicam que essa condição está prejudicada na esquizofrenia, resultando na atividade excessiva dos neurônios mesolímbicos, gerando os sintomas positivos (Laruelle et al., 1996). Assim, devido ao fato de que os antipsicóticos típicos atuam nos neurônios dopaminérgicos mesolímbicos, justifica-se a melhora apenas dos sintomas positivos após uso desses medicamentos (Davis et al., 1991).

1.1.2. HIPÓTESE GLUTAMATÉRGICA

A teoria glutamatérgica baseia-se na observação de que o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA é capaz de exacerbar sintomas psicóticos em pacientes esquizofrênicos e também de provocar efeitos psicotomiméticos em indivíduos saudáveis. Os efeitos induzidos assemelham-se aos sintomas positivos e negativos da esquizofrenia e podem ser acompanhados de alterações na percepção e de prejuízos cognitivos (Krystal et al., 1994; Lahti et al., 1995). Essa hipótese ganhou suporte através de estudos *post mortem* do encéfalo de pacientes com esquizofrenia que apresentavam uma variedade de mudanças no sistema glutamatérgico, tanto no metabolismo do neurotransmissor quanto na expressão de seus receptores. Essas alterações incluem uma menor expressão de receptores NMDA, indicando assim que, primariamente, possa existir uma disfunção da transmissão glutamatérgica na esquizofrenia (Jentsch; Roth, 1999).

Investigando essa disfunção, um estudo realizado por Moghaddam et al. (1997), utilizando microdiálise *in vivo* em roedores, constatou que o antagonismo de receptores NMDA provoca o aumento dos níveis de glutamato no compartimento extracelular do córtex pré-frontal medial, o que não é encontrado em situações fisiológicas normais. O aumento da liberação de glutamato pode ser uma reação compensatória ao bloqueio dos receptores NMDA. Doses psicotomiméticas de antagonistas NMDA podem favorecer o balanço de excitação sobre o de inibição, por meio da desinibição ou hiperatividade de neurônios glutamatérgicos piramidais no córtex pré-frontal, resultado de déficits na função GABAérgica.

A população celular GABAérgica que é mais disfuncional na esquizofrenia são as células em candelabro (*chandelier cells*). Essas células fazem sinapse com neurônios

glutamatérgicos exercendo inibição sobre esses terminais, portanto, déficits nessa população celular têm como consequência a liberação excessiva de glutamato e a neurotoxicidade mediada por esse neurotransmissor, já que nessa situação o glutamato liberado pelos terminais pré-sinápticos ativa receptores não-NMDA, como AMPA e kainato (Lewis et al., 1999). Essa observação indica, numa visão geral, que um aumento disfuncional da transmissão excitatória cortical possa ser o efeito sináptico comum das drogas que induzem sintomas do tipo psicóticos (Lewis, 2000).

Um corpo de evidências anatômicas e funcionais a respeito da interação entre o sistema glutamatérgico e os sistemas dopaminérgicos nigroestriatal e mesocorticolímbico, sugere que a desregulação de um deles pode alterar a neurotransmissão de outro. Da mesma maneira, existem dados que indicam que a interação entre a dopamina subcortical e a transmissão glutamatérgica cortical é importante em episódios psicóticos (Lavin et al., 2005). Nesse sentido, a redução na transmissão glutamatérgica, através da administração de antagonistas NMDA, reduz a influência inibitória do estriado sobre o tálamo, abrindo o filtro talâmico, levando a uma sobrecarga sensorial no córtex cerebral e, por consequência, a prejuízos cognitivos e sintomas psicóticos (Carlsson; Carlsson, 1990).

Portanto, é importante citar que a hipofunção de receptores NMDA pode induzir um estado hiperfuncional da transmissão dopaminérgica. Como consequência há a diminuição do tônus dopaminérgico cortical, que gera os sintomas negativos, e o aumento do tônus dopaminérgico subcortical, que acarreta os sintomas positivos (Deutsch et al., 2001). Entretanto, não se sabe ao certo se os efeitos do antagonismo NMDA sobre a neurotransmissão glutamatérgica cortical se estendem realmente à neurotransmissão dopaminérgica em estruturas subcorticais, mas trata-se de uma hipótese plausível visto que o sistema glutamatérgico age sobre outros sistemas neurotransmissores, controlando a liberação destes.

1.2. MODELOS FARMACOLÓGICOS PARA O ESTUDO DA PSICOSE

Os modelos animais são ferramentas extremamente importantes para a compreensão e tratamento de desordens neuropsiquiátricas e têm, como principal compromisso, representar fenômenos humanos complexos de forma mais simples e

acessível. Essa definição carrega consigo a insuficiência previsível de modelos animais em reproduzir, significativamente, estados subjetivos da esquizofrenia que são amplamente complexos e envolvem elevadas funções cerebrais, como percepção e cognição. Considerando essas dificuldades e o fato de que a esquizofrenia é resultado de etiologias heterogêneas encadeadas por fatores genéticos e ambientais, um modelo animal para o estudo da esquizofrenia pode atingir relativo sucesso ao reproduzir sintomas do tipo psicótico, fornecendo informações farmacológicas e, permitindo assim, a execução de testes sobre a eficácia e os efeitos colaterais de drogas com perfil antipsicótico (Kilts, 2001).

Essa limitação conduz o estudo da esquizofrenia a modelos experimentais distintos, analisando desse modo, traços que representem diferentes abordagens para o entendimento fisiopatológico da doença (Seong et al., 2002). Portanto, em modelos animais, é possível investigar três classes de sintomas já definidos anteriormente: sintomas positivos, sintomas negativos e alterações cognitivas, baseando-se na compreensão separada e ao mesmo tempo integrada, de cada uma delas. Uma das abordagens mais estudadas é a farmacológica. A abordagem farmacológica é baseada no efeito de substâncias psicotomiméticas, tais como anfetamina e antagonistas de receptores de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), sendo que esses últimos reproduzem tanto os sintomas positivos e negativos quanto os déficits cognitivos. Como exemplo de droga tem-se a ketamina (KET), que provoca sintomas do tipo psicótico em indivíduos saudáveis e exacerba ou precipita esses sintomas em indivíduos com esquizofrenia (Javitt; Zukin, 1991).

1.2.1. UTILIZAÇÃO DA KETAMINA EM MODELOS ANIMAIS DE PSICOSE

A primeira descrição do uso de antagonistas NMDA em humanos para indução de sintomas do tipo psicóticos foi em 1959, com a fenciclidina, substância utilizada originalmente como anestésico dissociativo e posteriormente como droga de abuso (Luby et al., 1959). Outra substância candidata à modelagem da esquizofrenia foi a ketamina (KET), sintetizada em 1962 e introduzida no mercado como agente anestésico em 1970 (White et al., 1974). Seu uso provoca pesadelos, despersonalização, desrealização e mudanças na emotividade, complicações comuns em sua utilização como agente anestésico (Coppel et al., 1973), restringindo seu uso atualmente a intervenções cirúrgicas em animais.

Há algumas similaridades fenotípicas entre a psicose e os efeitos de doses subanestésicas de KET, incluindo sua capacidade de produzir uma disfunção transitória nas redes neurais. A KET induz uma psicose dissociativa em voluntários normais (Krystal et al., 1994) e também altera o fluxo sanguíneo cerebral de maneira similar à detectada durante um episódio agudo de esquizofrenia, com fluxo cortical aumentado e límbico reduzido (Lahti et al., 1995). Essa classe de drogas possui a característica de gerar em animais experimentais uma série de reações comportamentais, incluindo déficits sensoriais e cognitivos, que remetem aos sintomas da esquizofrenia em humanos (Javitt; Zukin, 1991; Krystal et al., 1994; Malhotra et al., 1997; Newcomer et al., 1999). Em roedores, doses subanestésicas agudas de KET provoca hiperlocomoção, comportamentos estereotipados, déficits cognitivos e no filtro sensorio-motor e redução da interação social (Verma; Moghaddam, 1996).

Evidências sugerem que a interação entre a dopamina subcortical e a transmissão glutamatérgica cortical também é importante em episódios psicóticos (Lavin et al., 2005). Portanto, é importante considerar que a hipofunção de receptores NMDA pode induzir um estado hiperfuncional da transmissão dopaminérgica. Outros mecanismos pelos quais a KET produz seus efeitos comportamentais podem ser também atribuídos ao bloqueio de receptores NMDA localizados nos neurônios GABAérgicos inibitórios de regiões límbicas e subcorticais, aumentando a atividade nessas regiões (Duncan et al., 1998).

É mencionado na literatura que os efeitos cognitivos e comportamentais da KET podem ser atribuídos à estimulação de receptores D2, mais do que ao bloqueio de receptores NMDA (Kapur; Seeman, 2001). A exemplo disso pode-se citar os efeitos estimulantes dos antagonistas NMDA sobre a locomoção, indicativos da influência sobre a transmissão dopaminérgica (Carlsson; Carlsson, 1990). O tratamento agudo com antagonistas NMDA em modelos experimentais aumenta a liberação de dopamina no estriado, núcleo *accumbens* e córtex pré-frontal (Moghaddam et al., 1997; Mathe et al., 1998; Sitges et al., 2000), e aumenta a taxa de disparos de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo (Muraş et al., 1993). Isso significa que os efeitos psicotomiméticos da KET podem ocorrer em resposta a uma interrupção no controle glutamatérgico da função dopaminérgica (Kegeles et al., 2000).

Essa ação sobre a locomoção pode ser diminuída através da administração sistêmica de antagonistas de receptores dopaminérgicos do tipo D2 (Corbett et al., 1995), porém nem todos os efeitos cognitivos e comportamentais da KET são atribuídos a seus efeitos sobre

esses receptores, sugerindo que mecanismos independentes de dopamina também contribuem, ao menos em parte, para os efeitos dessa droga (Krystal et al., 1999). Como exemplo disso, a KET produz efeitos de sedação e euforia que remetem à intoxicação por etanol (Krystal et al., 1998a;b) e não são típicos de sintomas psicóticos.

Outro comportamento relevante a ser investigado no estudo da esquizofrenia em modelos animais é o reflexo de sobressalto, uma resposta incondicionada a um estímulo sonoro intenso e inesperado, que pode ser classificado como um mecanismo de defesa (Koch, 1999). É observado em todos os mamíferos e, em ratos, pode ser mensurado através de uma gaiola acoplada a um estabilímetro, pois o estímulo desencadeia uma resposta motora de contração muscular por todo corpo do animal, quando o som lhe é apresentado. Este reflexo é incondicionado, mas pode ser modulado de muitas formas, entre elas a inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto (PPI, do inglês *prepulse inhibition*), que consiste na diminuição do reflexo de sobressalto quando este é precedido por um estímulo sensorial irrelevante, no caso acústico. Esse estímulo de mesma natureza, porém mais fraco, é capaz então de modular uma resposta motora, se apresentado em intervalos de tempo e intensidades adequados para a espécie em questão (Swerdlow; Geyer, 1998).

Pacientes esquizofrênicos, assim como ocorre em algumas outras doenças mentais, apresentam um déficit no processamento de informações cognitivas e sensoriais, que pode ser representado pela diminuição no PPI, revelando que o indivíduo possui uma deficiência em selecionar quais informações são relevantes (Swerdlow; Geyer, 1998). O PPI é reduzido ou eliminado em ratos após administração sistêmica de antagonistas de receptores NMDA (Mansbach; Geyer, 1989) e em humanos sadios há uma diminuição neste parâmetro após injeção de KET (Karper et al., 1994). No entanto, os mecanismos pelos quais antagonistas de receptores NMDA podem produzir déficits no PPI não é bem elucidado.

A interação social é um comportamento normal que ocorre quando um animal investiga e se comunica com outro animal através de sinais físicos. Esse comportamento pode ser medido colocando-se dois ratos no campo aberto e observando-se e quantificando-se o tempo de interação entre a dupla e os eventos como perseguir, montar e cheirar. Uma redução no comportamento social pode ocorrer em estados de ansiedade (File; Hyde, 1978) e mais recentemente passou a ser também aceita como representativa de sintomas negativos da esquizofrenia, visto que pode ser induzida por antagonistas NMDA (Rung et al.,

2005). Entretanto, os mecanismos envolvidos nesse comportamento não são bem esclarecidos.

1.3. ANTIPSICÓTICOS

Estudos com antagonistas NMDA ilustram uma tentativa da neurociência translacional em testar hipóteses relacionadas à neurobiologia e tratamento da esquizofrenia. Duas características fisiopatológicas associadas a essa doença podem ser reproduzidas através da administração de antagonistas de receptores NMDA: o distúrbio da conectividade cortical e a desinibição da atividade glutamatérgica. Portanto, deve ser considerada a possibilidade de que agentes que, em modelos animais consigam atenuar esses dois componentes da resposta a antagonistas de receptores NMDA, possam exercer papéis complementares no tratamento da esquizofrenia (Krystal et al., 2003).

Nas duas últimas décadas, a eficácia da farmacoterapia para essa desordem se sustentou em dois fundamentos principais: a atenuação substancial, mas incompleta, da função de receptores dopaminérgicos do tipo D2, combinada com o bloqueio ou o agonismo inverso da função de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ (Kapur et al., 1999). Além de efeitos colaterais importantes associados ao uso crônico de antipsicóticos, as drogas disponíveis hoje no mercado ainda apresentam pouco impacto sobre os déficits cognitivos e emocionais da esquizofrenia (Gardner et al., 2005).

Quando se trata de antipsicóticos efetivos empregados na clínica, os típicos, sendo o haloperidol o fármaco padrão, possuem alta afinidade pelos receptores D2, porém induzem efeitos colaterais motores, como o chamado parkinsonismo, pois bloqueiam também estes receptores localizados no estriado, região responsável pelo controle motor. Os antipsicóticos atípicos, dentre os quais a clozapina (CZP) é a droga mais utilizada, são terapeuticamente efetivos em doses que induzem pouco ou nenhum efeito colateral motor, já que bloqueiam receptores D₄ principalmente. Além disso, inibem os movimentos estereotipados e a hiperlocomoção induzida por agonistas dopaminérgicos em doses menores do que aquelas que por si só causam também catalepsia em animais de laboratório (Gardner et al., 2005).

Até o presente momento, a clozapina parece ser a droga mais eficaz para o controle dos sintomas negativos e dos déficits cognitivos da esquizofrenia (Raja, 2011). Em

contrapartida, sabe-se pouco sobre seu mecanismo de ação, o que fez a droga tornar-se foco de muitas pesquisas atuais. Foi demonstrado por Hiroi e Graybiel (1996) que o haloperidol induz a expressão da proteína Fos – marcador de ativação neuronal - no estriado, ao contrário da clozapina, o que justifica a produção de efeitos colaterais extrapiramidais pelo haloperidol. O córtex pré-frontal exibe expressão de Fos em resposta à clozapina, mas não em resposta ao haloperidol (Deutch; Duman, 1996), o que indica a eficácia da clozapina em atenuar os sintomas negativos e déficits cognitivos.

Tanto os antipsicóticos típicos quanto os atípicos reduzem a resposta locomotora produzida por antagonistas de receptores NMDA indicando, dessa forma, um envolvimento do componente dopaminérgico nesse comportamento (Corbett et al., 1995). Entretanto, existem diferenças quanto aos efeitos da administração aguda de neurolépticos típicos e atípicos, sobretudo a respeito do comportamento social e do filtro sensorio-motor. Em ratos, agonistas dopaminérgicos diretos ou indiretos (Rigdon; Viik, 1991) são capazes de provocar prejuízos no PPI. O déficit no PPI causado por antagonistas NMDA, como descrito na literatura, só é revertido por antipsicóticos atípicos, como a clozapina (Bakshi et al., 1994). Antagonistas NMDA também são capazes de reduzir o tempo que os animais gastam em interação social com um parceiro. Nesses animais, apenas o tratamento com clozapina consegue reverter o déficit causado ao comportamento social (Corbett et al., 1995; Sams-Dodd, 1997).

Sabe-se que os déficits cognitivos estão entre os determinantes mais importantes da debilidade funcional de pacientes esquizofrênicos (Green et al., 2000). Portanto, mesmo com os avanços no tratamento da doença, a esquizofrenia continua tendo um impacto severo e necessita de novos compostos terapêuticos. A eficácia clínica da clozapina (CZP), antipsicótico que demonstra os melhores benefícios sobre os sintomas negativos (Brar et al., 1997) e sobre a função cognitiva (McGurk et al., 1999), com poucos efeitos colaterais extrapiramidais, trouxe consigo a investigação do papel do sistema serotoninérgico na esquizofrenia, abrindo espaço para novas pesquisas na área, em busca de fármacos com alvos em dois ou mais sistemas neurotransmissores, entre eles o próprio sistema serotoninérgico e o endocanabinóide.

1.4. SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E ESQUIZOFRENIA

Existem muitas linhas de evidência que suportam a associação entre alterações no sistema eCB e a patogênese da esquizofrenia. O sistema endocanabinóide (eCB) é constituído por uma família de moléculas de sinalização lipídica (endocanabinóides), seus receptores-alvo e as enzimas associadas envolvidas na sua síntese, transporte e degradação (Piomelli, 2003; Di Marzo, 2008). O receptor canabinóide do tipo 1 (CB1) é o subtipo mais expresso no sistema nervoso central (SNC) e localiza-se próximo ou nos terminais pré-sinápticos (Chevaleyre et al., 2006). A ativação de receptores CB1 inibe a liberação de neurotransmissores por meio da modulação de canais de Ca^{2+} ou K^+ e da inibição da adenilato-ciclase (Maccarrone et al., 2007; Di Marzo, 2008).

A ativação do terminal pós-sináptico leva à produção de endocanabinóides que se espalham em uma direção retrógrada sobre a membrana pós-sináptica e são liberados na fenda. A partir de então, ligam-se a receptores CB1 pré-sinápticos, de maneira a atenuar a liberação de neurotransmissores pelo terminal axônico (Freund et al., 2003; Chevaleyre et al., 2006). No SNC, portanto, a principal tarefa fisiológica do sistema endocanabinóide é a mediação da sinalização sináptica retrógrada (Alger, 2002; Hashimoto et al., 2007), controlando assim o excesso de atividade pré-sináptica em situações de desequilíbrio da excitabilidade neuronal (Lutz, 2004) e mantendo a homeostase de processos emocionais e cognitivos (Moreira; Lutz, 2008).

Estudos clínicos demonstraram o aumento da expressão de receptores CB1 no córtex pré-frontal dorsolateral (Dean et al., 2001) e no córtex cingulado anterior (Zavitsanou et al., 2004) em pacientes com esquizofrenia. Estudos genéticos têm indicado que variações no gene *CNR1*, que codifica o receptor CB1, estão diretamente relacionadas tanto a uma maior vulnerabilidade ao desenvolvimento da esquizofrenia (Ujike; Morita, 2004) quanto com a eficácia terapêutica dos antipsicóticos (Hamdani et al., 2008).

Quanto aos estudos com animais, foi constatado que a administração de fenciclidina a camundongos *knockout* para o receptor CB1 não provocou os efeitos do tipo psicóticos (Haller et al., 2005). Em outro estudo, a administração crônica de fenciclidina provocou um aumento da densidade de receptores CB1 e também alterou a funcionalidade desse receptor em áreas implicadas na esquizofrenia, como córtex pré-frontal, hipocampo e substância negra. Esses dados permitiram aos autores especular que alterações no sistema eCB podem

ter participação nos sintomas da esquizofrenia relacionados à transmissão glutamatérgica (Vigano et al., 2009). Em relação à transmissão dopaminérgica, os mecanismos de interação também não bem compreendidos, porém já foi constatado que o delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) pode agir como um agonista dopaminérgico nas projeções para o prosencéfalo medial (Gardner et al., 1988; Gardner; Lowinson, 1991) e, como já descrito anteriormente, o aumento da atividade dopaminérgica nessas vias é responsável pela geração dos sintomas psicóticos na esquizofrenia.

1.4.1. CANABINÓIDES E PSICOSE

O interesse sobre a *Cannabis sativa* - psicotrópico cujo agente mais ativo, o THC, foi isolado, identificado e caracterizado na década de 60 (Mechoulam; Shvo, 1963) - aumentou após serem descritos os receptores canabinóides no cérebro, bem como pelo posterior isolamento e identificação de canabinóides endógenos (Martin et al., 1999). Há controvérsias quanto ao uso terapêutico da *Cannabis sativa* devido a seus efeitos psicotomiméticos adversos e seu potencial para causar prejuízos cognitivos (Fletcher; Honey, 2006). Entretanto, a planta contém numerosos canabinóides que podem modular os efeitos do THC e também possuir diversos outros efeitos, levando à intensa investigação do potencial terapêutico de outros compostos não psicoativos (Russo; Guy, 2006; Pertwee, 2008; Izzo et al., 2009).

Dentre os componentes da *Cannabis*, o canabidiol (CBD), que pode constituir mais de 40 % do extrato da planta, é aquele que apresenta o maior potencial terapêutico (Mechoulam, 1999), sem apresentar os efeitos fisiológicos adversos típicos da utilização da *Cannabis* (Zuardi et al., 1982) e nem efeitos colaterais, mesmo quando administrado em altas doses (Battacharyya et al., 2009). Além do mais, exibe uma toxicidade muito baixa em humanos e em animais de laboratório (Rosenkrantz et al., 1981).

Entretanto, evidências crescentes indicam que existe uma relação próxima entre o consumo de *Cannabis* e o aumento do risco de se desenvolver depressão, transtornos de ansiedade, sintomas psicóticos e até esquizofrenia (Parolaro et al., 2010). O desenvolvimento de esquizofrenia pode estar associado a anormalidades funcionais nos receptores canabinóides. Esses receptores são o alvo farmacológico de compostos da *Cannabis*, especialmente o THC, composto que, quando administrado por via intravenosa,

pode produzir efeitos do tipo psicóticos e ansiogênicos (D'Souza et al., 2004; 2008). Além disso, sinais clínicos do consumo crônico de *Cannabis* assemelham-se aos sintomas negativos da esquizofrenia (Kupfer et al., 1973). De acordo com esses efeitos, algumas das regiões cerebrais com maior expressão de receptores CB1 incluem hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal, hipotálamo e gânglios da base (Macky, 2005), o que justifica a indução de efeitos como déficit motor, amnésia e mudanças no humor e ansiedade, após utilização de *Cannabis*.

Na década de 80, um estudo investigando a possível interação entre o CBD e o THC em voluntários saudáveis descobriu que o CBD pode inibir os efeitos indesejáveis do THC que são semelhantes a sintomas psicóticos (Zuardi et al., 1982). Interessantemente, no mesmo ano, foi observado que pacientes admitidos em um hospital psiquiátrico da África do Sul após a utilização de uma variedade de *Cannabis* desprovida de CBD, apresentaram uma frequência muito maior de episódios psicóticos agudos, em comparação a outros países (Rottanburg et al., 1982). Essas evidências aumentaram o interesse dos pesquisadores, levando à investigação do possível efeito antipsicótico do CBD.

1.4.2. CANABIDIOL E SEU POSSÍVEL EFEITO ANTIPSICÓTICO

Na década de 80, um estudo investigando a possível interação entre o CBD e o THC em voluntários saudáveis descobriu que o CBD pode inibir os efeitos indesejáveis do THC que são semelhantes a sintomas psicóticos (Zuardi et al., 1982). Interessantemente, no mesmo ano, foi observado que pacientes admitidos em um hospital psiquiátrico da África do Sul após a utilização de uma variedade de *Cannabis* desprovida de CBD, apresentaram uma frequência muito maior de episódios psicóticos agudos, em comparação a outros países (Rottanburg et al., 1982). Essas evidências aumentaram o interesse dos pesquisadores, levando à investigação do possível efeito antipsicótico do CBD.

Como sugerido por Morgan et al. (2010), o CBD é um composto capaz de atenuar os efeitos psicotomiméticos induzidos pelo THC, podendo proteger o indivíduo que faz uso de *Cannabis* de seus efeitos cognitivos prejudiciais. Nesse estudo, indivíduos que utilizavam *Cannabis* que continha maior quantidade de CBD não apresentavam prejuízo na memória, em contraste àqueles indivíduos que utilizavam a planta com baixos níveis de CBD, que

apresentaram um pior desempenho, quanto à memória, nos testes cognitivos e questionários aplicados. Em estudo anterior, desenvolvido por Di Forti et al. (2009), foram investigados indivíduos em primeiro surto psicótico e constatou-se que estes tinham feito uso de *Cannabis* potente, com alta concentração de THC e baixa de CBD, por um longo período de tempo.

Nessa mesma linha, foram também realizados estudos utilizando modelos experimentais que demonstraram que o CBD tem a habilidade de reduzir ansiedade e sintomas psicotomiméticos assim como distorções cognitivas associadas a psicose, induzidas por THC (Battacharyya et al, 2009; Leweke et al., 2000). Na esquizofrenia, mudanças funcionais em vias que processam informações visuais e auditivas têm sido incluídas à fisiopatologia das alucinações (Oertel et al., 2007; Allen et al., 2008). Um estudo com ressonância magnética funcional verificou os efeitos do THC e do CBD sobre o processamento de dessas informações (Winton-Brown et al., 2011). A ingestão de THC provocou a ativação de áreas relacionadas a desordens psicóticas enquanto que, na maioria das regiões, os efeitos do CBD foram o oposto, corroborando seu papel antipsicótico proposto anteriormente (Zuardi et al., 2006).

A partir de um modelo baseado na neurotransmissão dopaminérgica, demonstrou-se que o CBD (15-60 mg/kg), assim como o haloperidol, reduz o comportamento estereotipado induzido por apomorfina em ratos, de uma maneira dose-dependente (Zuardi et al., 1991), porém sem o CBD induzir catalepsia – efeito colateral motor observado em roedores. Outro estudo, realizado por Moreira e Guimarães (2005), comparou a habilidade do CBD, em relação a do haloperidol e da clozapina, de prevenir a hiperlocomoção em camundongos induzida por anfetamina e ketamina. O pré-tratamento CBD (15 – 60 mg/kg) inibe a hiperlocomoção induzida tanto por anfetamina quanto por ketamina de forma dose-dependente, estendendo, portanto, seus efeitos antipsicóticos também a um modelo baseado na neurotransmissão glutamatérgica.

Um estudo realizado por Long et al. (2006) revelou que o CBD (1,5 ou 15 mg/kg) é capaz de reverter o prejuízo no PPI induzido por MK-801 (outro antagonista de receptores NMDA) em camundongos, com efeito semelhante ao da clozapina. Outro estudo utilizando o MK-801 demonstrou, em ratos, que o CBD na dose de 30 mg/kg consegue reverter parcialmente o prejuízo na interação social (Gururajan et al., 2011). Tais evidências sugerem que o CBD possui um mecanismo de ação próximo ao dos antipsicóticos atípicos, que atuam

em mais de um neurotransmissor que não a dopamina somente, mas também a serotonina, por exemplo (Duncan et al., 2006). Tanto o CBD quanto a clozapina, em contraste ao haloperidol, induzem a expressão de Fos em estruturas mesolímbicas e mesocorticais, mas não no estriado, justificando assim a ausência de efeitos colaterais motores (Guimarães et al., 2004).

Além dos experimentos realizados em roedores, o perfil antipsicótico do CBD já foi avaliado em pacientes com esquizofrenia. Os pacientes acometidos com essa doença apresentam dificuldade em perceber uma imagem ilusória no teste da inversão da percepção de profundidade binocular. Nesse modelo, o CBD diminuiu o prejuízo no relato de imagens ilusórias produzido pela nabilona, um canabinóide sintético análogo ao THC (Leweke et al., 2000). Utilizando doses subanestésicas de KET em voluntários saudáveis, foi verificado, através da aplicação de uma escala que avalia sintomas dissociativos e seus fatores, que o CBD atenua o fator despersonalização, sintoma provocado pela ketamina, reforçando a hipótese da aplicação antipsicótica do CBD (Bosi et al., 2003).

Apesar do aumento no número de pesquisas sobre o potencial terapêutico do CBD em muitas doenças, incluindo transtornos neuropsiquiátricos, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação desse composto que, ao contrário do THC, apresenta baixa afinidade pelos receptores canabinóides CB1 e CB2 (Pertwee, 1997). Investigações recentes procuram descobrir se o CBD interage com proteínas do sistema endocanabinóide que não os receptores CB1/CB2, como a FAAH (do inglês, *fatty acid amide hydrolase*) (Cravatt et al., 1996), enzima intracelular responsável pela hidrólise do ligante endocanabinóide anandamida; e a AMT (do inglês, *anandamide membrane transporter*) (Di Marzo et al., 1994), enzima que facilita o transporte da anandamida pela membrana celular e, consequentemente, sua degradação intracelular.

Foi descoberto que o CBD inibe a hidrólise da anandamida através da inibição dessas duas enzimas (Watanabe et al., 1996, Rakhshan et al., 2000), possivelmente aumentando o tônus endocanabinóide. A anandamida é produzida sob demanda, de maneira Ca^{2+} -dependente (DI MARZO et al., 1994), e atua como um mensageiro retrógrado no controle da liberação de neurotransmissores pelo terminal pré-sináptico (Katona et al., 1999). Sabe-se que o CBD reduz os níveis intracelulares de Ca^{2+} em condições de alta excitabilidade neuronal ou atividade epileptiforme (Ryan et al., 2009). Além disso, o CBD tem sido proposto como um agonista de receptores 5-HT_{1A} (RUSSO et al., 2005), característica que medeia

suas propriedades ansiolíticas e antidepressivas (Campos; Guimarães, 2008; Zanelati et al., 2010).

Portanto, existem poucos dados a respeito do efeito antipsicótico do CBD tanto em roedores quanto em humanos, e esses dados ainda são pouco consistentes. O interesse por esse composto é crescente, assim como por outros canabinóides com foco sobre o sistema eCB, já que esse sistema parece relacionar-se com outros sistemas neurotransmissores importantes, fato relevante no controle das funções fisiológicas e na fisiopatologia dos transtornos neuropsiquiátricos. Visto que os mecanismos de ação do CBD são pouco compreendidos, esforços são necessários para elucidar ao menos parte desses mecanismos, para que a eficácia terapêutica desse composto possa ser explorada de fato.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar do conhecimento acumulado sobre os mecanismos fisiológicos da esquizofrenia através da utilização de modelos animais e ensaios clínicos, esse grande corpo teórico-prático ainda não repercutiu em novas estratégias terapêuticas reais para esse transtorno neuropsiquiátrico. O canabidiol, cujos efeitos sobre os sintomas da esquizofrenia ainda foram pouco estudados, aparece como um candidato promissor para o desenvolvimento de novos tratamentos, indicando também que estudos baseados na ativação do sistema endocanabinóide podem atingir sucesso. A atuação do CBD, semelhante aos antipsicóticos atípicos, suscita questões sobre sua eficácia em melhorar tanto os sintomas positivos e negativos, quanto os déficits cognitivos relacionados à esquizofrenia e transtornos psicóticos. Desse modo, com o presente trabalho, decidimos investigar os efeitos do canabidiol sobre diferentes comportamentos observados no modelo de psicose gerada farmacologicamente pelo bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos comportamentais de diferentes concentrações de canabidiol sobre os efeitos induzidos tratamento agudo com S(+)-ketamina em ratos adultos jovens, em três tarefas comportamentais (atividade locomotora, inibição pré-pulso e interação social) e comparar estes efeitos com os do fármaco antipsicótico padrão clozapina.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Avaliar os efeitos comportamentais da administração aguda de S(+)-ketamina (30 mg/kg) quantificando: a distância percorrida e a frequência em pé, o reflexo de sobressalto e a inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto, e o tempo gasto em interação social;
- (ii) Avaliar os efeitos comportamentais da administração aguda de canabidiol em diferentes concentrações quantificando: a distância percorrida e a frequência em pé, o reflexo de sobressalto e a inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto, e o tempo gasto em interação social;
- (iii) Avaliar os efeitos comportamentais da administração aguda de clozapina quantificando: a distância percorrida e a frequência em pé, o reflexo de sobressalto e a inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto, e o tempo gasto em interação social;
- (iv) Verificar quais são as mudanças comportamentais, nos mesmos parâmetros, quando é realizado pré-tratamento agudo com canabidiol, em diferentes concentrações, antes da administração de S(+)-ketamina;
- (v) Verificar quais são as mudanças comportamentais, nos mesmos parâmetros, quando é realizado pré-tratamento agudo com clozapina, em diferentes concentrações, antes da administração de S(+)-ketamina;
- (vi) Comparar os efeitos comportamentais obtidos com o pré-tratamento com canabidiol com os obtidos com o pré-tratamento com clozapina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados cerca de 250 ratos Wistar machos adultos, pesando 350-450g, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – USP/RP. Os animais chegaram ao biotério de nosso laboratório aproximadamente uma semana antes dos experimentos, para habituação e manuseio. Foram mantidos em caixas de polipropileno (40 x 33 x 18 cm) contendo raspas de madeira (maravalha) sobre o assoalho, limpas três vezes por semana.

Durante todo o período dos experimentos, os animais permaneceram alojados em biotério com temperatura controlada em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, submetidos a ciclo de 12 h de claro e 12 h de escuro com luzes acesas às 07:00 h e com livre acesso à comida e água. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas previstas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP – USP), aprovados sob o número de processo 030/2011.

4.2. DROGAS

Todas as drogas foram administradas no mesmo volume (1 mL/kg) por via intraperitoneal e, com exceção da S(+)-ketamina, foram preparadas pouco antes dos experimentos e mantidas ao abrigo da luz durante a realização dos testes. A S(+)-ketamina (KET - Ketamin S (+) 50 mg/mL - Cristália) foi utilizada em uma concentração de 30 mg/mL. O canabidiol (CBD) foi diluído em óleo de milho (óleo de cozinha) nas concentrações de 15, 30, 60 e 120 mg/mL. A clozapina (CZP, Leponex – Novartis) foi dissolvida em solução de ácido acético 0,5 % em salina na concentração de 2,5 mg/mL (Moreira; Guimarães, 2005). Como controle da KET foi utilizada a solução de salina (SAL, NaCl 0,9 %) e o controle do CBD foi o óleo de milho.

As drogas citadas acima foram gentilmente cedidas pelo Prof^o Dr Jaime E. C. Hallak, do Depto de Neurociências e Ciências do Comportamento da FMRP. A escolha da dose de KET foi realizada através de estudo piloto em nosso laboratório, tendo como critério de seleção a eficácia em induzir hiperlocomoção no monitor de atividade e déficit na inibição

pré-pulso do reflexo de sobressalto. As doses do CBD foram baseadas na literatura (Moreira; Guimarães, 2005; Guimarães et al., 2004).

4.3. GRUPOS

Os animais foram randomicamente selecionados para os grupos. Devido à curta duração do efeito da KET observado em nosso estudo-piloto, foram necessários animais diferentes para a realização dos experimentos, ou seja, os mesmos animais foram utilizados para a análise da atividade locomotora e da inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto, porém outros animais foram utilizados para o teste da interação social. Como para esse último teste foram utilizadas duplas de animais, considera-se aqui o número de duplas como n amostral.

A composição dos grupos ocorreu de acordo com a combinação entre o pré-tratamento e a segunda injeção. Dentre o pré-tratamento (primeira injeção), os animais poderiam receber uma injeção de óleo de milho (ÓLEO, controle), clozapina 2,5 mg/kg (CZP), canabidiol 15 mg/kg (CBD15), canabidiol 30 mg/kg (CBD30), canabidiol 60 mg/kg (CBD60) ou canabidiol 120 mg/kg (CBD120). Na segunda injeção, os animais poderiam receber salina (SAL) ou S(+)-ketamina 30 mg/kg (KET). Descrição dos grupos:

Experimento 1: Influência do pré-tratamento com CZP ou CBD e da administração de KET sobre a Atividade Locomotora e a Inibição Pré-Pulso do Reflexo de Sobressalto

- Grupo 1: canabidiol 15 mg/kg + S(+)-ketamina 30 mg/kg, (n=10);
- Grupo 2: canabidiol 30 mg/kg + ketamina 30 mg/kg, (n=10);
- Grupo 3: canabidiol 60 mg/kg + S(+)-ketamina 30 mg/kg, (n=10);
- Grupo 4: canabidiol 120 mg/kg + S(+)-ketamina 30 mg/kg, (n=10);
- Grupo 5: clozapina 2,5 mg/kg + S(+)-ketamina 30 mg/kg, (n=10);
- Grupo 6: óleo de milho + S(+)-ketamina 30 mg/kg, (n=10);
- Grupo 7: canabidiol 15 mg/kg + salina, (n=10);
- Grupo 8: canabidiol 30 mg/kg + salina, (n=10);
- Grupo 9: canabidiol 60 mg/kg + salina, (n=10);
- Grupo 10: canabidiol 120 mg/kg + salina, (n=10);
- Grupo 11: clozapina 2,5 mg/kg + salina, (n=10);

- Grupo 12: óleo de milho + salina, (n=10);

Experimento 2: Influência do intervalo entre o pré-tratamento com CBD30 e a administração de KET sobre a Atividade Locomotora e a Inibição Pré-Pulso do Reflexo de Sobressalto

- Grupo 2: canabidiol 30 mg/kg + ketamina 30 mg/kg, (n=10);
- Grupo 13: canabidiol 30 mg/kg (2 horas) + S(+)-ketamina 30 mg/kg, (n=10);
- Grupo 6: óleo de milho + S(+)-ketamina 30 mg/kg, (n=10);

Experimento 3: Influência do pré-tratamento com CBD30 ou CZP e os efeitos da KET sobre a interação social

- Grupo 14: canabidiol 30 mg/kg + S(+)-ketamina 30 mg/kg, (n=11);
- Grupo 15: clozapina 2,5 mg/kg + S(+)-ketamina 30 mg/kg, (n=9);
- Grupo 16: óleo de milho + S(+)-ketamina 30 mg/kg, (n=10);
- Grupo 17: canabidiol 30 mg/kg + salina, (n=10);
- Grupo 18: clozapina 2,5 mg/kg + salina, (n=9);
- Grupo 19: óleo de milho + salina, (n=10).

4.4. ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

No Experimento 1, os animais receberam injeção de óleo de milho, canabidiol ou clozapina, nas doses já descritas acima, de acordo com os grupos a que pertenciam. Passados 30 minutos da injeção (com exceção do grupo 13, no qual esse tempo foi de 100 minutos) os animais foram colocados no centro do Monitor de Atividades e depois transferidos para a gaiola do Monitor do Reflexo de Sobressalto, onde foram testados na Inibição Pré-Pulso. Para o experimento 2, os animais pertencentes aos grupos restantes, passados 30 minutos da injeção de óleo de milho, canabidiol ou clozapina, receberam uma injeção de S(+)-ketamina 30 mg/kg ou salina e foram colocados na caixa do Monitor de Atividades para filmagem de seu comportamento social após 20 minutos. O paradigma

experimental de cada experimento está ilustrado na **FIGURA 1**. Após o término de cada experimento os animais foram sacrificados em câmara de gás carbônico.

4.4.1. Análise da atividade locomotora no monitor de atividades

O Monitor de Atividades (Insight – Brasil) consiste de uma caixa de acrílico transparente com dimensões de 46 cm x 46 cm x 46 cm (altura x largura x comprimento) e uma tampa removível, também de acrílico, com furos para permitir a entrada de ar. A caixa é dotada de 6 barras, cada uma com 16 sensores infravermelho que detectam a posição relativa do animal na caixa, ponto a ponto durante todo o período do experimento. Este equipamento é conectado a um computador e o software pode prover uma análise detalhada de todo comportamento do animal dentro da caixa como, por exemplo, a distância percorrida e quantidade de vezes que o animal ficou em pé, entre outros. As análises realizadas são armazenadas em banco de dados e podem ser utilizadas posteriormente para pesquisa.

Após 30 minutos da injeção de canabidiol, óleo de milho ou clozapina, os animais foram colocados no centro do monitor de atividades e tiveram seu comportamento monitorado por 20 minutos. Ainda dentro do equipamento, receberam injeção de salina ou S(+)-ketamina 30 mg/kg e foram monitorados por mais 20 minutos. Os 40 minutos totais de experimento foram divididos em blocos de 2 minutos, para uma análise mais minuciosa da atividade exploratória ao longo do tempo, e também foram divididos em 2 grandes blocos, antes e depois da injeção de S(+)-ketamina ou salina.

4.4.2. Análise da inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto (PPI, do inglês *prepulse inhibition*)

O aparato da inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto é formado por uma gaiola de madeira com barras de aço inox acoplada a um estabilímetro, localizada dentro de uma caixa ventilada e com isolamento acústico, com dimensões de 63 cm x 49 cm x 53 cm (altura x largura x comprimento). A reação motora do animal aos estímulos acústicos gera uma pressão no estabilímetro que é amplificada, digitalizada e analisada pelo software (Insight – Brasil) instalado num computador ao qual o aparato experimental é conectado.

Este software também controla todos os parâmetros de cada sessão, como a intensidade do estímulo acústico e sua duração. Os estímulos sonoros (ruído de fundo, pré-pulso e pulso) são gerados por 2 alto-falantes localizados dentro da caixa de isolamento acústico.

Dois dias antes dos experimentos, todos os animais passaram por um teste de linha de base do PPI e apenas aqueles animais que apresentaram um valor de inibição acima de 50 % foram utilizados. Após um período de 5 minutos de habituação onde não há registro de comportamento, com um ruído de fundo de 65 dB de intensidade que permaneceu durante toda a sessão, o equipamento registrou 24 tentativas semi-randomizadas, com intervalo de $15\text{ s} \pm 7\text{ s}$ entre as tentativas: 18 estímulos Pulso (120 dB de intensidade e 40 ms de duração) e 6 estímulos pareados Pré-Pulso + Pulso (Pré-Pulso com 77 dB de intensidade e 20 ms de duração, 100 ms antes do Pulso).

No dia do experimento, ao ser retirado do Monitor de Atividades, o animal foi colocado na gaiola dentro da caixa e a sessão, também com ruído de fundo de 65 dB, teve início com 4 tentativas Pulso (120 dB de intensidade e 40 ms de duração) que servem para estabilizar o reflexo de sobressalto e não são registradas. O equipamento então coordenou e registrou 46 tentativas distribuídas semi-randomicamente em intervalos de $15\text{ s} \pm 7\text{ s}$ e igualmente divididas em 2 blocos (23 + 23). Cada bloco de 23 estímulos consistiu de: 8 estímulos Pulso, 5 estímulos Pré-Pulso + Pulso (Pré-Pulso de 68 dB, 20 ms de duração, 100 ms antes do Pulso); 5 estímulos Pré-Pulso + Pulso (Pré-Pulso de 71 dB, 20 ms de duração, 100 ms antes do Pulso); 5 estímulos Pré-Pulso + Pulso (Pré-Pulso de 77 dB, 20 ms de duração, 100 ms antes do Pulso). Ao fim destas 46 tentativas, mais 4 estímulos Pulso com a mesma intensidade já descrita foram liberados pelo equipamento mas também não foram registrados.

Para a análise dos resultados, foram calculadas as médias dos diferentes estímulos (Pulso e Pré-Pulso + Pulso nas 3 diferentes intensidades) em cada sessão, e a percentagem de PPI através da fórmula $\%PPI = 100 - \{[(PP+P)/P] \times 100\}$.

4.4.3. Teste de interação social

O Teste de Interação Social é um teste utilizado com bastante frequência para testar a eficiência de drogas ansiolíticas ou antipsicóticas. Com esse teste pretendemos quantificar

os efeitos de nossos tratamentos sobre o grau de comportamento social dos animais experimentais e controle.

No dia anterior ao experimento, cada animal foi colocado no Monitor de Atividades por 10 minutos para aclimação ao aparato experimental. No dia do experimento os animais foram pesados para a formação de pares com pesos semelhantes – variação de 10 a 20 g. O experimento teve duração de 10 minutos e foi filmado para posterior análise. A interação social foi definida se os animais se encontrassem a uma distância máxima de 20 cm e apresentassem comportamentos como cheirar, seguir, *grooming*, rastejar e lutar com o outro animal. A interação social de contato ocorre se houver obrigatoriamente contato físico; exploração anogenital, cheirar em contato direto, rastejar no animal, *grooming* e brincadeiras entre os animais dos pares testados. O ato de seguir e cheirar, sem contato direto, é definido como interação social sem contato, e ambas as interações foram quantificadas através da análise dos vídeos, segundo Lee et al. (2005).

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Quando a comparação ocorreu entre apenas dois grupos, foi utilizado o teste t não-pareado na existência de apenas uma variável, e o teste t pareado na existência de mais de uma variável. Para a comparação de mais de dois grupos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) – ANOVA de uma via para uma variável dependente e ANOVA de duas vias para duas variáveis dependentes. Existindo mais de uma medida para o mesmo parâmetro, como por exemplo, um parâmetro medido ao longo do tempo, foi utilizada a ANOVA de medidas repetidas. A análise *posthoc* foi realizada com o teste de Student-Newman-Keuls quando detectadas diferenças significativas entre os fatores analisados. O critério para significância estatística foi o valor de $p < 0,05$.

4.6. PARADIGMA EXPERIMENTAL

Experimento 1

Experimento 2

Experimento 3

5. RESULTADOS

Cada teste comportamental foi analisado isoladamente, sendo descritos a seguir. Em todas as análises estatísticas, comparou-se primeiramente o grupo ÓLEO + SAL com o grupo ÓLEO + KET, para verificar os efeitos da KET sobre os parâmetros escolhidos e replicar o sucesso da utilização desta droga em modelos animais de psicose. Secundariamente, os grupos restantes foram divididos em dois grandes grupos: os que receberam KET como segunda injeção e os que receberam SAL como segunda injeção. Essa subdivisão gerou grupos de acordo com o pré-tratamento, o que serviu para facilitar a demonstração dos resultados, verificando assim o efeito da droga da primeira injeção (CZP, CBD15, CBD30, CBD60 e CBD120) na ausência e na presença de KET.

5.1. EXPERIMENTO 1

REFLEXO DE SOBRESSALTO E INIBIÇÃO PRÉ-PULSO DO REFLEXO DE SOBRESSALTO

A análise estatística desse experimento ocorreu em duas partes. Primeiro, para cada grupo, foi obtida a média do reflexo de sobressalto, analisada através de teste t de Student na existência de dois grupos e através de ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls na existência de mais de dois grupos. Para a segunda parte da análise, foram utilizados os valores do reflexo de sobressalto e do reflexo de sobressalto na presença do pré-pulso em três intensidades – 68, 71 e 77 dB - para cada grupo. A porcentagem de inibição do pré-pulso (%PPI) foi obtida através da aplicação desses valores na fórmula $\%PPI = 100 - \{[(PP+P)/P] \times 100\}$, já citada na seção Materiais e Métodos. Essa porcentagem de inibição foi comparada entre os grupos através de ANOVA de duas vias com medidas repetidas, tendo a intensidade do pré-pulso como variável dependente.

Reflexo de sobressalto

Comparando os grupos ÓLEO + SAL e ÓLEO + KET, não foram obtidos resultados significativos, isto é, a KET reduziu o reflexo de sobressalto, porém de forma discreta e não significativa (**FIGURA 2A**; teste t de Student, $t=1,788$, $df=18$, $p=0,091$). Comparando os

grupos que receberam SAL também não foram obtidos resultados significativos, indicando que nem a CZP nem o CBD nas concentrações testadas influenciam significativamente o reflexo de sobressalto (**FIGURA 3A**; ANOVA de uma via, $F(5,54)=0,955$; $p=0,454$). Comparando os grupos que receberam KET, foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (**FIGURA 4A**; ANOVA de uma via, $F(5,54)=3,379$; $p=0,01$). Tendo o grupo ÓLEO + KET como grupo controle dentre os que receberam KET, a análise *post-hoc* (Student-Newman-Keuls) revelou diferenças significativas para o grupo CBD30 + KET, que apresentou maior amplitude do reflexo de sobressalto ($p=0,049$).

Inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto

Comparando os grupos ÓLEO + SAL e ÓLEO + KET (**FIGURA 2B**, ANOVA de duas vias com medidas repetidas) foram obtidos resultados significativos para o fator tratamento [$F(2,18)=15,650$; $p<0,001$] mas não para o fator intensidade [$F(2,36)=2,369$; $p=0,108$], ocorrendo interação entre os fatores [$F(2,36)=3,704$; $p=0,034$]. A análise *post-hoc* (Student-Newman-Keuls) revelou diferenças significativas entre os grupos nas três intensidades testadas, 68, 71 e 77 dB ($p=0,046$; $p<0,001$ e $p=0,002$; respectivamente). Comparando os grupos que não receberam KET (**FIGURA 3B**, ANOVA de duas vias com medidas repetidas) e as intensidades do pré-pulso, não foram obtidos resultados significativos nem para o fator tratamento [$F(5,54)=0,51$; $p=0,768$] nem para o fator intensidade [$F(2,108)=0,187$; $p=0,83$], e também não houve interação entre os fatores [$F(10,108)=1,071$; $p=0,391$]. Comparando os grupos que receberam KET (**FIGURA 4B**, ANOVA de duas vias com medidas repetidas) e as intensidades do pré-pulso, houve diferença significativa para o fator tratamento [$F(5,54)=4,022$; $p=0,004$] mas não para o fator intensidade [$F(2,108)=0,581$; $p=0,561$] e nem interação entre os fatores [$F(10,108)=1,511$; $p=0,145$]. A análise *post-hoc* (Student-Newman-Keuls) revelou diferenças significativas nos grupos CZP + KET e CBD30+KET, estes apresentando uma maior inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto, na intensidade do pré-pulso de 71 dB, em relação ao grupo ÓLEO + KET ($p=0,036$ e $p=0,003$; respectivamente).

A **B**

Figura 2: (A) efeito da administração de KET sobre a amplitude do reflexo de sobressalto. Sem diferenças significativas entre os grupos (teste t de Student, dados apresentados como média + EPM). (B) efeitos da administração de KET sobre a inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo ÓLEO + KET (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, dados apresentados como média + EPM).

Figura 3: (A) efeitos da CZP e do CBD sobre a amplitude do reflexo de sobressalto. Sem diferenças significativas entre os grupos (ANOVA de uma via, dados apresentados como média + EPM). **(B)** efeitos da CZP e do CBD sobre a inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto. Sem diferenças significativas entre os grupos (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, dados apresentados como média + EPM).

Figura 4: (A) influência do pré-tratamento com CBD ou CZP sobre a ação da KET, na amplitude do reflexo de sobressalto. * $p=0,049$ comparado ao grupo ÓLEO + KET (ANOVA de uma via, dados apresentados como média + EPM). **(B)** influência do pré-tratamento com CZP ou CBD, sobre os efeitos da KET na inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto. * $p<0,05$ comparado ao grupo ÓLEO + KET na mesma intensidade do pré-pulso (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, dados apresentados como média + EPM).

ATIVIDADE LOCOMOTORA

A análise da atividade locomotora foi realizada de duas maneiras, ambas utilizando ANOVA de duas vias com medidas repetidas tendo o bloco ou o tempo como variáveis dependentes, seguida do teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. Inicialmente, o tempo do experimento no monitor de atividades (40 minutos) foi dividido em dois grandes blocos, o primeiro corresponde aos 20 minutos antes da administração da segunda injeção e o segundo aos 20 minutos depois, sendo que essa segunda injeção significa a administração de KET para alguns grupos e SAL para outros.

Para verificar se essa segunda injeção exerceu algum efeito sobre a atividade locomotora foram comparados os dois blocos dentro de cada um dos grupos; para verificar a diferença entre os grupos foi comparado cada bloco entre todos os grupos. Depois, o segundo bloco – depois da segunda injeção - foi subdividido em 5 blocos de 4 minutos para observar a atividade locomotora do animal ao longo do tempo e assim o efeito mais detalhado da administração das drogas. Nas duas formas de análise da atividade locomotora foram utilizados como parâmetros a distância percorrida (em cm), representativo de hiperlocomção, e a quantidade de vezes que o animal ficou em pé, medida comportamental relacionada à ansiedade.

Distância percorrida

A análise global dos dados, comparando apenas os grupos ÓLEO + SAL e ÓLEO + KET, indicou diferenças significativas para os fatores tratamento [$F(1,18)=26,078$; $p<0,001$] e bloco [$F(1,18)=6,993$; $p=0,016$], e interação entre os fatores [$F(1,18)=27,634$; $p<0,001$]. Ao comparar os grupos que não receberam injeção de KET, a análise não revelou diferença significativa para o fator tratamento [$F(5,54)=1,760$, $p=0,137$], somente para o fator bloco [$F(1,54)=206,350$; $p<0,001$] e também não revelou interação entre os fatores [$F(5,54)=1,111$; $p=0,366$]. Por fim, comparando os grupos que receberam KET, a análise revelou diferenças significativas para os fatores tratamento [$F(5,54)=4,319$; $p=0,002$] e bloco [$F(1,54)=50,820$; $p<0,001$], e interação entre os fatores [$F(5,54)=3,710$; $p=0,006$].

1. Primeiro bloco (antes da segunda injeção)

Comparando os grupos ÓLEO + SAL e ÓLEO + KET antes da segunda injeção, os dois grupos não apresentaram diferenças significativas na distância percorrida (**FIGURA 5A**; $p=0,837$). Comparando os grupos que não receberam injeção de KET e tendo o grupo ÓLEO + SAL como controle, apenas o grupo CZP + SAL apresentou uma atividade locomotora menor (**FIGURA 6A**; $p=0,049$). Comparando os grupos que receberam KET e tendo o grupo ÓLEO + KET como controle, não foram obtidas diferenças significativas (**FIGURA 7A**).

2. Segundo bloco (depois da segunda injeção)

Comparando os grupos ÓLEO + SAL e ÓLEO + KET após a segunda injeção, o grupo ÓLEO + KET apresentou uma atividade locomotora muito maior (**FIGURA 5A**; $p<0,001$). Comparando os grupos que não receberam injeção de KET e tendo o grupo ÓLEO + SAL como controle, nenhum grupo apresentou diferenças significativas na atividade locomotora (**FIGURA 6A**). Comparando os grupos que receberam KET e tendo o grupo ÓLEO + KET como controle, apenas o grupo CZP + KET apresentou uma atividade locomotora menor (**FIGURA 7A**; $p<0,001$).

A análise das subdivisões desse bloco (análise da distância percorrida de 4 em 4 minutos) para os grupos ÓLEO + SAL e ÓLEO + KET revelou diferenças significativas apenas para o fator tratamento [$F(1,18)=28,941$; $p<0,001$]; não foram encontradas diferenças significativas para o fator tempo [$F(4,72)=0,278$; $p=0,891$] e nem interação entre os fatores [$F(4,72)=0,950$; $p=0,440$]. Em todos os tempos após a segunda injeção o grupo ÓLEO + KET apresentou maior atividade locomotora do que o grupo ÓLEO + SAL (**FIGURA 5B**; 4 minutos, $p=0,023$; 8 minutos, $p=0,004$; 12, 16 e 20 minutos, $p<0,001$).

Quando comparados os grupos que não receberam injeção de KET e tendo como controle o grupo ÓLEO + SAL, apenas o fator tempo apresentou diferenças significativas [$F(4,216)=2,789$; $p=0,027$], diferentemente do fator tratamento [$F(5,54)=1,913$; $p=0,107$], assim como não ocorreu interação entre os fatores [$F(20,216)=1,252$; $p=0,215$]. A análise *post-hoc* revelou que aos 8 minutos (**FIGURA 6B**), os grupos CBD15 + SAL e CBD60 + SAL apresentaram menor atividade locomotora ($p=0,020$ e $p=0,024$; respectivamente).

Comparando os grupos que receberam injeção de KET e tendo como controle o grupo ÓLEO + KET, foram observadas diferenças significativas para o fator tratamento

[$F(5,54)=4,211$; $p=0,003$] e para o fator tempo [$F(4,216)=5,180$; $p<0,001$]; porém não ocorreu interação entre os fatores [$F(20,216)=0,914$; $p=0,570$]. A análise *post-hoc* revelou diferenças apenas para o grupo CZP + KET, que apresentou menor atividade locomotora em relação ao grupo ÓLEO + KET. Essa diferença ocorreu especificamente aos 12 e aos 16 minutos (**FIGURA 7B**; $p=0,007$ e $p=0,012$; respectivamente).

3. Primeiro bloco X segundo bloco (antes X depois da segunda injeção)

Comparando os dois blocos dentro do grupo ÓLEO + SAL, não foram encontradas diferenças ($p=0,081$), porém dentro do grupo ÓLEO + KET a diferença foi significativa ($p<0,001$), indicando que a administração de KET provocou um aumento robusto na atividade locomotora (**FIGURA 5A**). Comparando os grupos que não receberam injeção de KET, a diferença se estendeu a todos os grupos representando que a distância percorrida no segundo bloco foi sempre menor do que no primeiro (**FIGURA 6A**). Comparando os grupos que receberam KET e tendo o grupo ÓLEO + KET como controle, a diferença ocorreu especificamente nos grupos ÓLEO + KET ($p<0,001$), CBD15 + KET ($p=0,021$), CBD30 + KET ($p=0,014$), CBD60 + KET ($p<0,001$) e CBD120 + KET ($p=0,005$), representando que a distância percorrida no segundo bloco foi maior do que no primeiro, devido ao efeito da KET. O único grupo que não apresentou diferença significativa entre os dois blocos foi CZP + KET ($p=0,834$), representando que a administração de KET não foi capaz de induzir hiperlocomoção significativa nesse grupo (**FIGURA 7A**).

Figura 5: (A) efeito da KET sobre a distância percorrida, nos dois blocos no monitor de atividades. Os dois grupos não apresentaram diferenças na locomoção antes da segunda injeção. Depois da segunda injeção, o grupo ÓLEO + KET apresentou uma atividade locomotora muito maior. * $p < 0,007$ comparado ao grupo ÓLEO + SAL. Comparando a locomoção de cada grupo antes e depois da segunda injeção, o grupo ÓLEO + SAL não apresentou diferenças, mas o grupo ÓLEO + KET apresentou uma atividade locomotora maior no segundo bloco. # $p < 0,001$, comparado ao respectivo grupo antes da segunda injeção (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, dados apresentados como média + EPM). (B) efeitos da KET sobre a distância percorrida, ao longo dos 20 minutos seguintes à segunda injeção. Em todos os tempos analisados, a atividade locomotora do grupo ÓLEO

+ KET foi maior. * $p < 0,05$ comparado ao grupo ÓLEO + SAL (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, dados apresentados como média + EPM).

Figura 6: (A) efeitos da CZP e do CBD sobre a distância percorrida, nos dois blocos no monitor de atividades. O grupo CZP + SAL apresentou uma locomoção menor antes da injeção de SAL. * $p = 0,049$ comparado ao grupo ÓLEO + SAL. Depois da injeção de SAL, não foram obtidas diferenças significativas entre os grupos. Comparando a locomoção de cada grupo antes e depois da injeção de SAL, todos os grupos apresentaram uma atividade locomotora menor no segundo bloco. # $p < 0,001$, comparado ao respectivo grupo antes da segunda injeção (ANOVA de duas vias com medidas

repetidas, dados apresentados como média + EPM). **(B)** efeitos da CZP e do CBD sobre a distância percorrida, ao longo dos 20 minutos seguintes à injeção de SAL, sem diferenças significativas.

Figura 6: (A) : influência do pré-tratamento com CZP ou CBD sobre os efeitos da KET, na distância percorrida nos dois blocos no monitor de atividades. Nenhum grupo apresentou diferenças antes da injeção de KET. Depois da injeção de KET, apenas o grupo CZP + KET apresentou uma atividade locomotora menor. * $p < 0,001$ comparado ao grupo ÓLEO + KET. Comparando a locomoção de cada grupo antes e depois da injeção de KET, todos os grupos apresentaram uma atividade locomotora maior, exceto o grupo CZP + KET. # $p < 0,05$, comparado ao respectivo grupo antes da injeção de KET (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, dados apresentados como média + EPM). **(B)** influência do pré-tratamento com CZP ou CBD sobre os efeitos da KET, na distância percorrida ao longo dos 20

minutos seguintes à injeção de KET. Aos 12 e aos 16 minutos, a atividade locomotora do grupo CZP + KET foi menor. * $p < 0,05$ comparado ao grupo ÓLEO + KET (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, dados apresentados como média + EPM).

Frequência em pé

A análise global dos dados, comparando apenas os grupos ÓLEO + SAL e ÓLEO + KET, indicou diferenças significativas para o fator tratamento [$F(1,18)=4,468$; $p=0,049$], para o fator bloco [$F(1,18)=10,269$; $p=0,005$] e interação entre os fatores [$F(1,18)=5,199$; $p=0,035$]. Ao comparar os grupos que não receberam injeção de KET, a análise não revelou diferenças significativas para o fator tratamento [$F(5,54)=1,789$; $p=0,131$], somente para o fator bloco [$F(1,54)=198,014$; $p < 0,001$], sem interação entre os fatores [$F(5,54)=0,783$; $p=0,567$]. Por fim, comparando os grupos que receberam KET, a análise revelou diferenças significativas para o fator tratamento [$F(5,54)=4,111$; $p=0,003$], o que não ocorreu para o fator bloco [$F(1,54)=2,675$; $p=0,108$], com interação entre os fatores [$F(5,54)=3,782$; $p=0,005$].

1. Primeiro bloco (antes da segunda injeção)

Comparando os grupos ÓLEO + SAL e ÓLEO + KET antes da segunda injeção, os dois grupos não apresentaram diferenças significativas no número de vezes que ficaram em pé no monitor de atividades (**FIGURA 8A**; $p=0,605$). Comparando os grupos que não receberam injeção de KET, apenas o grupo CB15 + SAL apresentou diferenças em relação ao grupo ÓLEO + SAL, apresentando uma menor frequência em pé (**FIGURA 9A**; $p=0,02$). Comparando os grupos que receberam KET e tendo o grupo ÓLEO + KET como controle, não foram encontradas diferenças significativas (**FIGURA 10A**).

2. Segundo bloco (depois da segunda injeção)

Comparando os grupos ÓLEO + SAL e ÓLEO + KET depois da segunda injeção, o grupo ÓLEO + KET apresentou uma maior frequência em pé (**FIGURA 8B**; $p=0,005$). Comparando os grupos que não receberam injeção de KET, não foram detectadas diferenças significativas (**FIGURA 9B**), diferentemente de quando comparados os grupos que receberam KET. A análise destes, quando comparados ao grupo ÓLEO + KET, revelou que o grupo CZP + KET

ficou menos vezes em pé no monitor de atividades ($p=0,049$) e o grupo CBD60 +KET mais vezes ($p=0,01$) (**FIGURA 10B**).

A análise das subdivisões desse bloco (número de vezes que o animal ficou em pé de 4 em 4 minutos) para os grupos ÓLEO + SAL e ÓLEO + KET revelou diferenças significativas apenas para o fator tratamento [$F(1,18)=6,911$; $p=0,017$]; não foram encontradas diferenças significativas para o fator tempo [$F(4,72)=0,397$; $p=0,811$] e nem interação entre os fatores [$F(4,72)=0,980$; $p=0,424$]. Depois da segunda injeção o grupo ÓLEO + KET apresentou maior frequência em pé do que o grupo ÓLEO + SAL aos 12, 16 e 20 minutos (**FIGURA 8B**; $p=0,007$; $p=0,033$ e $p=0,046$; respectivamente).

Quando comparados os grupos que não receberam injeção de KET, depois da segunda injeção não foram detectadas diferenças significativas (**FIGURA 9B**). Comparando os grupos que receberam injeção de KET e, foram observadas diferenças significativas para o fator tratamento [$F(5,54)=4,553$; $p=0,002$], sem diferenças para o fator tempo [$F(4,216)=1,598$; $p=0,176$] e sem interação entre os fatores [$F(20,216)=1,151$; $p=0,300$]. Tendo como controle o grupo ÓLEO + KET, a análise *post-hoc* revelou que, aos 8 minutos depois da segunda injeção, o grupo CBD60 + KET apresentou maior frequência em pé ($p=0,003$) e, aos 12 minutos, o grupo CZP + KET apresentou menor frequência em pé ($p=0,050$) (**FIGURA 10B**).

3. Primeiro bloco X segundo bloco (antes X depois da segunda injeção)

No grupo ÓLEO + SAL houve diferença significativa entre os dois blocos, ou seja, antes e depois da segunda injeção ($p=0,017$), indicando que os animais ficaram mais vezes em pé antes da segunda injeção. Já no grupo ÓLEO + KET não houve diferença significativa entre os dois blocos (**FIGURA 8A**; $p=0,522$). Comparando os grupos que não receberam injeção de KET, a diferença significativa se estendeu a todos os grupos representando que a quantidade de vezes que o animal ficou em pé no segundo bloco foi sempre menor do que no primeiro (**FIGURA 9A**; $p<0,05$). Comparando os grupos que receberam KET e tendo o grupo ÓLEO + KET como controle, a diferença entre os blocos ocorreu especificamente no grupo CZP + KET, com menor frequência em pé no bloco depois da segunda injeção ($p=0,008$), e no grupo CBD60 + KET, com maior frequência em pé no bloco depois da segunda injeção ($p=0,005$) (**FIGURA 10A**).

Figura 8: (A) efeito da KET sobre o número de vezes que o animal ficou em pé, nos dois blocos no monitor de atividades. Sem diferenças significativas entre os grupos antes da segunda injeção. Depois da segunda injeção, o grupo ÓLEO + KET ficou mais vezes em pé. * $p=0,005$ comparado com ÓLEO + SAL. Comparando cada grupo antes e depois da segunda injeção, o grupo ÓLEO + SAL apresentou uma redução no número de vezes em pé, em relação ao primeiro bloco. # $p=0,017$ comparado ao respectivo grupo antes da segunda injeção (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, dados apresentados como média + EPM). (B) efeitos da KET sobre o número de vezes que o animal ficou em pé, ao longo dos 20 minutos seguintes à segunda injeção. Aos 12, 16 e 20 minutos, a frequência em pé do grupo ÓLEO + KET foi maior. * $p<0,05$ comparado ao grupo ÓLEO + SAL (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, dados apresentados como média + EPM).

Figura 9: (A) efeitos da CZP e do CBD sobre o número de vezes que o animal ficou em pé, nos dois blocos no monitor de atividades. Antes da injeção de SAL, o grupo CBD15 + SAL ficou um menor número de vezes em pé. * $p=0,02$ comparado com ÓLEO + SAL. Depois da injeção de SAL, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Comparando cada grupo antes e depois da injeção de SAL, todos os grupos apresentaram uma redução no número de vezes em pé, em relação ao primeiro bloco. # $p<0,05$ comparado ao respectivo grupo antes da injeção de SAL (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, dados apresentados como média + EPM). **(B)** efeitos da CZP e do CBD sobre o número de vezes que o animal ficou em pé, ao longo dos 20 minutos seguintes à injeção de

SAL. Sem diferenças significativas entre os grupos (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, dados apresentados como média + EPM).

Figura 10: (A) influência do pré-tratamento com CZP ou CBD sobre os efeitos da KET, no número de vezes que o animal ficou em pé no monitor de atividades. Antes da injeção de KET, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos. Depois da injeção de KET, o grupo CZP + KET ficou menos vezes em pé e o grupo CBD60 + KET mais vezes. * $p < 0,05$ comparado ao grupo ÓLEO + KET. Comparando cada grupo antes e depois da injeção de KET, o grupo CZP + KET apresentou uma redução no número de vezes em pé e o grupo CBD60 + KET um aumento, ambos em relação ao

primeiro bloco. # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo antes da injeção de KET (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, dados apresentados como média + EPM). **(B)** influência do pré-tratamento com CZP ou CBD sobre os efeitos da KET no número de vezes que o animal ficou em pé, ao longo dos 20 minutos seguintes à injeção de KET. Aos 8 minutos, a frequência em pé do grupo CBD60 + KET foi maior e, aos 12 minutos, a do grupo CZP + KET foi menor. * $p < 0,05$ comparado ao grupo ÓLEO + KET (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, dados apresentados como média + EPM).

5.2. EXPERIMENTO 2

Nesse experimento, os grupos ÓLEO + KET e CBD30 + KET foram comparados com um novo grupo (CBD (2hs) + KET), que recebeu a segunda injeção, nesse caso KET, após um intervalo de tempo maior, duas horas depois da primeira injeção, nesse caso CBD30.

REFLEXO DE SOBRESSALTO E INIBIÇÃO PRÉ-PULSO DO REFLEXO DE SOBRESSALTO

Reflexo de sobressalto

Comparando os grupos ÓLEO + KET, CBD30 + KET e CBD30 (2hs) + KET, a análise estatística global apontou uma diferença entre os grupos [$F(2,27)=3,361$; $p=0,05$], sendo que a análise *post-hoc* indicou uma diferença quase estatisticamente significativa entre os grupos ÓLEO + KET e CBD30 + KET ($p=0,052$), com o grupo CBD30 + KET apresentando maior amplitude do reflexo de sobressalto (**FIGURA 11A**).

Inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto

Comparando os grupos ÓLEO + KET, CBD30 + KET e CBD30 (2hs) + KET, a análise estatística global apontou diferenças significativas para o fator o grupo [$F(2,27)=5,426$; $p=0,01$], sem diferenças para o fator intensidade [$F(2,54)=1,075$; $p=0,348$] e nem interação entre os fatores [$F(4,54)=2,332$; $p=0,067$]. A análise *post-hoc* indicou diferenças significativas apenas para o grupo CBD30 + KET, que apresentou a maior inibição nas três intensidades testadas (68, 71 e 77 dB; $p=0,02$; $p=0,005$ e $p=0,039$; respectivamente) (**FIGURA 11B**).

Figura 11: **(A)** influência do intervalo entre o pré-tratamento com CBD30 e a administração de KET, sobre a amplitude do reflexo de sobressalto. O grupo CBD30 + KET apresentou maior amplitude, com uma diferença quase significativa estatisticamente. * $p=0,052$ comparado ao grupo ÓLEO + KET (ANOVA de uma via, dados apresentados como média + EPM). **(B)** influência do intervalo entre o pré-tratamento com CBD30 e a administração de KET, sobre a inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto. O grupo CBD30 + KET apresentou uma maior inibição pré-pulso. * $p<0,05$ comparado ao grupo ÓLEO + KET (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, dados apresentados como média + EPM).

Distância percorrida

A análise global dos dados não indicou diferenças significativas para o fator tratamento [$F(2,27)=0,682$; $p=0,514$], somente para o fator bloco [$F(1,27)=26,853$; $p<0,001$], sem interação entre os fatores [$F(2,27)=0,979$; $p=0,389$].

1. Primeiro bloco (antes da segunda injeção)

Comparando os grupos antes da segunda injeção, não foram indicadas diferenças significativas na distância percorrida (**FIGURA 12A**).

2. Segundo bloco (depois da segunda injeção)

Comparando os grupos depois da segunda injeção, também não foram detectadas diferenças significativas (**FIGURA 12A**). A análise das subdivisões desse bloco (análise da distância percorrida de 4 em 4 minutos) não revelou diferenças significativas para o fator tratamento [$F(2,27)=0,766$; $p=0,475$], apenas para o fator tempo [$F(4,108)=3,967$; $p=0,005$], sem interação entre os fatores [$F(8,108)=1,308$; $p=0,247$]. Nenhum grupo apresentou diferenças significativas na distância percorrida após a segunda injeção (**FIGURA 12A**).

3. Primeiro bloco X segundo bloco (antes X depois da segunda injeção)

Os grupos ÓLEO + KET e CBD30 (2hs) + KET apresentaram diferenças significativas entre os dois blocos, ou seja, antes e depois da injeção de KET, indicando que nesses grupos o efeito da KET foi robusto o bastante para induzir hiperlocomoção ($p=0,003$ e $p<0,001$; respectivamente). Comparando os dois blocos dentro do grupo CBD30 + KET, não foram encontradas diferenças, indicando que a administração de KET não foi capaz de causar um aumento significativo da atividade locomotora, representado pela ação mais discreta da KET nesse grupo ($p=0,069$) (**FIGURA 12A**). A análise dos blocos não revelou diferenças significativas entre os grupos (**FIGURA 12B**).

Figura 12: **(A)** influência do intervalo entre o pré-tratamento com CBD30 e a administração de KET, sobre a distância percorrida, nos dois blocos no monitor de atividades. Nenhum grupo apresentou diferenças nem antes nem depois da injeção de KET. Os grupos ÓLEO + KET e CBD30 (2hs) + KET apresentaram maior atividade locomotora depois da injeção de KET. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo antes da injeção de KET (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, dados apresentados como média + EPM). **(B)** influência do intervalo entre o pré-tratamento com CBD30 e a administração de KET, sobre a distância percorrida ao longo dos 20 minutos seguintes à administração de KET. Sem diferenças significativas entre os grupos (dados apresentados como média + EPM).

Frequência em pé

A análise global dos dados não indicou diferenças significativas nem para o fator tratamento [$F(2,27)=1,998$; $p=0,155$] nem para o fator bloco [$F(1,27)=2,383$; $p=0,134$], sem interação entre os fatores [$F(2,27)=0,545$; $p=0,586$].

1. Primeiro bloco (antes da segunda injeção)

Comparando os grupos antes da segunda injeção, não foram indicadas diferenças significativas na quantidade de vezes que os animais ficaram em pé no monitor de atividades (**FIGURA 13A**).

2. Segundo bloco (depois da segunda injeção)

Comparando os grupos depois da segunda injeção, também não foram detectadas diferenças significativas (**FIGURA 13A**). A análise das subdivisões desse bloco (análise do número de vezes que o animal ficou em pé de 4 em 4 minutos) não revelou diferenças significativas nem para o fator tratamento [$F(2,27)=0,799$; $p=0,460$] nem para o fator tempo [$F(4,108)=1,419$; $p=0,233$], sem interação entre os fatores [$F(8,108)=0,579$; $p=0,793$] (**FIGURA 13B**).

3. Primeiro bloco X segundo bloco (antes X depois da segunda injeção)

Os grupos não apresentaram diferenças significativas entre os dois blocos, ou seja, antes e depois da injeção de KET, indicando que nesses grupos o efeito da KET não alterou a frequência que os animais ficaram em pé dentro do monitor de atividades (**FIGURA 13A**).

Figura 13: **(A)** influência do intervalo entre o pré-tratamento com CBD30 e a administração de KET, sobre o número de vezes que o animal ficou em pé, nos dois blocos no monitor de atividades. Antes ou depois da injeção de KET, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos, assim como também não foram encontradas diferenças quando comparado cada grupo antes e depois da injeção de KET (dados apresentados como média + EPM). **(B)** influência do intervalo entre o pré-tratamento com CBD30 e a administração de KET, sobre o número de vezes que o animal ficou em pé ao longo dos 20 minutos seguintes à administração de KET. Sem diferenças significativas entre os grupos (dados apresentados como média + EPM).

5.3. EXPERIMENTO 3

No teste de interação social, o tempo que a dupla de animais passou em interação social direta ou indireta foi convertido em porcentagem (10 minutos representando 100 % do tempo) e esses valores foram comparados entre os grupos, utilizando teste t de Student quando comparados apenas os grupos ÓLEO + SAL e ÓLEO + KET, e ANOVA de uma via, quando comparados os grupos que receberam KET como segunda injeção (ÓLEO + KET, CZP + KET e CBD30 + KET) e os grupos que receberam SAL como segunda injeção (ÓLEO + SAL, CZP + SAL e CBD30 + SAL).

Comparando primeiramente apenas os grupos ÓLEO + SAL e ÓLEO + KET (**FIGURA 14A**), foi possível verificar que a administração de KET reduziu o tempo passado em interação social pelos animais ($t=5,369$; $df=18$, $p<0,001$). Ao comparar os grupos que receberam SAL como segunda injeção (**FIGURA 14 B**), não foram detectadas diferenças significativas [$F(2,26)=1,145$; $p=0,334$], da mesma forma que os grupos que receberam KET como segunda injeção [$F(2,27)=0,780$; $p=0,468$] (**FIGURA 14 C**).

A

EFEITO DA KET

Figura 14: **(A)** efeito da KET sobre o tempo passado em interação social. A administração de KET reduziu o tempo que as duplas gastaram em interação social. $p < 0,001$ comparado ao grupo ÓLEO + SAL (teste t de Student, dados apresentados como média + EPM). **(B)** efeito da CZP e do CBD30 sobre o tempo passado em interação social. Sem diferenças significativas entre os grupos testados (dados apresentados como média + EPM). **(C)** influência da CZP ou do CBD30 sobre os efeitos da KET, no tempo passado em interação social. Sem diferenças significativas entre os grupos testados (dados apresentados como média + EPM).

6. DISCUSSÃO

Nossos experimentos, através da análise de parâmetros comportamentais bem estabelecidos para o estudo de sintomas do tipo psicótico em roedores, confirmaram que a administração aguda de S(+)-ketamina (KET), na concentração de 30 mg/kg, pode ser realmente utilizada como modelo farmacológico de psicose baseado no antagonismo de receptores NMDA. Conseguimos reproduzir hiperlocomoção, déficit no filtro sensorio-motor e redução na interação social, comportamentos que representam três classes diferentes de sintomas que se assemelham, em parte, aos sintomas da esquizofrenia em humanos. Além disso, conseguimos demonstrar, conforme a literatura, que o pré-tratamento, também agudo, com clozapina (CZP) exerce um efeito antipsicótico, reduzindo a hiperlocomoção e restaurando o filtro sensorio-motor dos animais, porém, não obtivemos sucesso sobre a redução do comportamento social.

Além de reproduzir os dados existentes na literatura, padronizando assim uma dose ideal de KET e de CZP a ser utilizada em ratos Wistar nos parâmetros que nossos experimentos foram realizados, utilizamos quatro diferentes concentrações de canabidiol (CBD), para obtenção de uma curva dose-resposta dos efeitos do pré-tratamento com essa droga, sobre os efeitos da KET citados acima. Assim, verificamos também se o CBD por si só exerce algum efeito comportamental nos testes realizados. De acordo com as doses, obtivemos diferentes resultados, que serão discutidos a seguir.

Estes resultados levantaram algumas hipóteses sobre: 1) mecanismo de ação do CBD; 2) interação entre CBD e KET; 3) diferenças entre o tratamento agudo e o crônico; 4) perfil antipsicótico do CBD e 5) utilização da KET como modelo de psicose induzida. Contudo, como nossas análises foram unicamente comportamentais e não utilizamos manipulações farmacológicas específicas com antagonistas/agonistas de receptores envolvidos na resposta à KET, não podemos inferir com prioridade a respeito de mecanismos de ação e interações entre as drogas utilizadas.

6.1. EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO CANABIDIOL

A inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto (PPI) é uma medida essencial para o estudo dos substratos neurais da esquizofrenia, pois sua circuitaria envolve hipocampo,

núcleo *accumbens*, estriado, globo pálido e tálamo. As regiões cerebrais envolvidas nesse processo relacionam-se à esquizofrenia e déficits no filtro cognitivo e no processamento sensorial são características clínicas muito importantes nessa desordem. Pacientes com esquizofrenia apresentam deficiências na atenção e uma inabilidade em filtrar pensamentos e estímulos sensoriais externos irrelevantes (McGhie; Chapman, 1961).

Adicionalmente, o PPI é regulado por interações corticais-subcorticais que também são propostas na geração de sintomas da esquizofrenia. Tanto a atividade serotoninérgica quanto a glutamatérgica e a dopaminérgica são importantes substratos envolvidos na modulação do PPI e também participam da fisiopatologia da esquizofrenia e da ação de antipsicóticos atípicos (Davis et al., 1991; Meltzer, 1995). O PPI é reduzido ou eliminado em ratos após administração sistêmica de antagonistas não-competitivos de receptores NMDA (Mansbach; Geyer, 1989). Os mecanismos centrais de ação desse efeito ainda estão sendo investigados.

O déficit no PPI causado pela administração de antagonistas NMDA pode ser prevenido pelo antipsicótico atípico clozapina, que atua sobre receptores serotoninérgicos e dopaminérgicos principalmente (Bakshi et al., 1994). Em nossos experimentos, a KET causou um déficit no PPI, nas três intensidades de pré-pulso testadas (68, 71 e 77 dB), sem causar alterações significativas na amplitude do reflexo de sobressalto. Esse déficit foi prevenido pelo pré-tratamento com CZP na dose de 2,5 mg/kg, e a administração de CZP sozinha não causou nenhum efeito nem sobre o reflexo de sobressalto nem sobre o PPI. A interação entre CZP e antagonistas NMDA no PPI ocorre apenas em doses limitadas e não foi confirmada em todos os estudos com ratos (Geyer et al, 2001). Portanto, nosso trabalho estabelece que, em ratos Wistar submetidos à tratamento agudo com KET, a CZP na dose de 2,5 mg/kg é eficaz em restaurar o estado do filtro sensório-motor.

O reflexo de sobressalto é uma contração rápida de toda a musculatura esquelética, em resposta a um estímulo intenso e inesperado. Esse padrão de resposta é sugestivo de um mecanismo de defesa, ocorrendo em todas as espécies de mamíferos (Koch, 1999). Em nossos experimentos, o CBD 30 mg/kg, nos animais que receberam KET, aumenta o reflexo de sobressalto. No trabalho desenvolvido por Long et al. (2006), o CBD nas doses de 1 e 15 mg/kg também aumenta o reflexo de sobressalto, porém sem associação com nenhum antagonista NMDA. Esse efeito não tinha sido descrito anteriormente na literatura, portanto esses mecanismos precisam ser mais bem estabelecidos. Já foi reportado que, dependendo

da dose, o CBD pode ter efeitos ansiogênicos (Elbatsh et al., 2011). Porém, não se pode afirmar que o CBD na dose de 30 mg/kg exerce algum efeito ansiogênico pois não foram testes de ansiedade em nossos experimentos. O pré-tratamento com CBD na dose de 30 mg/kg de CBD, assim como com a CZP na dose de 2,5 mg/kg, também previne o déficit no filtro sensorio-motor induzido pela KET. A hipótese mais provável seria de que o CBD, assim como a CZP, possui potencial para o tratamento de déficits cognitivos que acompanham as psicoses. Seu efeito parecido ao da CZP no teste de inibição pré-pulso corrobora a hipótese de que seu perfil antipsicótico se assemelha ao dos fármacos mais recentes, chamados de atípicos, que atuam de forma positiva sobre os déficits cognitivos da esquizofrenia (Meltzer; Massey, 2011).

Adicionalmente, no estudo desenvolvido por Long et al. (2006), quando administrado 20 minutos antes de uma injeção de MK-801, o CBD na dose de 5 mg/kg reduz o prejuízo no PPI, assim como a CZP na dose de 4 mg/kg. Nesse estudo o CBD também aumenta o reflexo de sobressalto. Esse foi o primeiro relato, em camundongos, de que o CBD pode restaurar o déficit no filtro sensorio-motor induzido por um antagonista NMDA. Esse efeito não é obtido se ocorre a administração prévia de um antagonista de receptores TRPV1, no caso a capsazepina.

Em experimentos recentes em ratos Sprague-Dawley, foi avaliado o potencial antipsicótico do CBD (3 – 30 mg/kg) utilizando o MK-801, e os efeitos foram também comparados aos da CZP. Curiosamente, os resultados demonstram que o próprio CBD parece possuir alguns efeitos pró-psicóticos. Na dose de 10 mg/kg, o CBD reduz o PPI e o reflexo de sobressalto, além de produzir hiperlocomoção, porém sem efeitos sobre a interação social. O déficit no PPI acompanhado pela redução na amplitude do reflexo de sobressalto dificulta a interpretação dos resultados, já que, mesmo tratando-se de medidas independentes, a fórmula para o cálculo do PPI utiliza a razão entre o reflexo de sobressalto obtido com e sem a associação com o pré-pulso. Quando realizado pré-tratamento com o CBD, antes da administração de MK-801, o CBD não provoca nenhum efeito nem sobre o PPI nem sobre a hiperlocomoção, mas normaliza parcialmente o déficit na interação social. Além de tudo, nesse estudo o CBD apresenta uma curva farmacológica em U, bem estabelecida pelo CBD, mas sem conhecimento dos mecanismos dessa ação. Nesse estudo, a dose mais baixa e a mais alta não causam nenhum efeito, mas a dose intermediária causa déficit no PPI.

As diferenças nos resultados encontrados nos dois estudos podem ser explicadas pela escolha da espécie de roedor utilizada – o primeiro utilizou camundongos e o segundo, ratos Sprague-Dawley; e também pelas diferenças nos protocolos - no segundo foi realizado mais de um teste comportamental no mesmo dia, podendo ocorrer interferência entre os parâmetros, e também a aclimação dos animais aos aparatos comportamentais antes da realização dos testes, ação que pode reduzir as variações comportamentais influenciadas por fatores estressores externos. As diferenças em relação ao nosso estudo também podem ter ocorrido devido aos mesmos motivos, além das diferenças nas doses de CBD utilizadas, pois utilizamos doses maiores em nossos experimentos.

Em concordância com os estudos desenvolvidos por Long et al. (2006) e Gururajan et al. (2011), o CBD, quando administrado sozinho, não demonstra nenhum efeito sobre a interação social. Além disso, como já demonstrado anteriormente, o pré-tratamento com CZP também não reduz o prejuízo na interação social causado por antagonistas NMDA, o que pode ser justificado por seu efeito sedativo, reduzindo a locomoção dos animais e dificultando assim os encontros entre eles (Becker; Grecksch, 2004). Outra diferença pode estar relacionada à escolha do antagonista NMDA utilizado. A KET é bem menos potente e menos seletiva do que o MK-801 (Wong et al., 1986). Por último, a análise do comportamento social sofre variação dentro os estudos que utilizam o teste de interação social. Alguns utilizam aparatos automatizados para quantificação dos comportamentos (Sams-Dodd, 1995), enquanto que nossos experimentos foram quantificados manualmente.

A maioria dos modelos preditivos para agentes antipsicóticos, como a hiperlocomoção em roedores, acessa a habilidade de uma droga de reverter ou prevenir um estado fisiológico/comportamental provocado por uma manipulação, que pode ser farmacológica. Em roedores, o antagonismo de receptores NMDA provoca uma síndrome caracterizada pelo aumento da atividade locomotora, balanço de cabeça, ataxia, comportamento de rolar e padrões estereotipados de comportamento. Essas alterações comportamentais têm sido utilizadas amplamente como modelo de sintomas do tipo psicótico.

Em nosso trabalho, ao verificar os efeitos comportamentais do CBD e da CZP no monitor de atividades, e do pré-tratamento com CZP e CBD sobre os efeitos da KET, concluímos que a CZP reduz a hiperlocomoção induzida por KET, porém esse feito não foi obtido de forma significativa. Os mecanismos que podem estar envolvidos na ausência desse

efeito serão melhor explicados abaixo. Comparando os blocos antes da injeção de KET e depois da injeção de KET, apenas o grupo que recebeu pré-tratamento com CZP não apresentou aumento significativo da locomoção após KET, efeito que não foi detectado em nenhum grupo que recebeu CBD. Outro parâmetro de locomoção analisado foi a quantidade de vezes que o animal ficou em pé, indicativo de atividade exploratória (O'Donnel; Gould, 2007). Os animais que receberam pré-tratamento com CZP antes de KET apresentaram uma redução na frequência que ficaram em pé no monitor de atividades, o que pode ser representativo do efeito sedativo da clozapina (Mead; Kapur, 2008), enquanto que os animais que receberam pré-tratamento com CBD60 apresentaram um aumento da frequência em pé após a administração de KET, ou seja, aumento da atividade exploratória, provavelmente devido à hiperlocomoção. Nosso trabalho também é o primeiro a demonstrar esse efeito do CBD, mecanismo que também deve ser melhor compreendido.

Long et al. (2010) realizou um estudo em camundongos comparando os efeitos da administração aguda e crônica de THC e CBD. Os achados mais importantes foram que a administração aguda tanto de CBD quanto de THC aumenta o PPI, o tratamento crônico com CBD (50 mg/kg) atenua a hiperlocomoção induzida por dexanfetamina e induz sintomas ansiolíticos. O tratamento agudo com CBD nas doses de 1 e 50 mg/kg não altera a hiperlocomoção induzida por dexanfetamina. Nesse estudo também foi mostrado que o CBD não induz alterações no comportamento basal de interação social. Portanto, desses dados pode-se concluir que é possível obter resultados mais robustos com tratamento crônico com CBD do que com tratamento agudo. Em nosso trabalho, todos os tratamentos realizados foram agudos, o que pode não ser uma boa representação de sintomas do tipo psicóticos e nem das mudanças neurofisiológicas que podem ocorrer em longo prazo, no sistema endocanabinóide e em suas relações com outros sistemas, após tratamento crônico com CBD por exemplo.

6.2. MECANISMOS DE AÇÃO PROPOSTOS PARA O CANABIDIOL

Estudos *in vitro* já demonstraram que o CBD tem afinidade por receptores vanilóides TRPV1 e inibe a hidrólise e a receptação de anandamida (Bisogno et al., 2001). Após a detecção da expressão de receptores TRPV1 no córtex, amígdala, hipocampo, substância negra, hipotálamo, formação reticular e cerebelo (Mezey et al., 2000), e o possível

envolvimento no controle da emoção, aprendizagem e saciedade, foi especulado que, como essas regiões cerebrais participam também de circuitos que regulam o filtro sensorio-motor (Swerdlow; Geyer, 1998), esse receptor pode estar envolvido na regulação desse componente.

Nossos experimentos foram os primeiros a demonstrar, em ratos Wistar, que o pré-tratamento com CBD restaura o déficit no PPI causado pela administração de KET. Como os mecanismos de ação do CBD são pouco conhecidos, não se sabe ao certo como o CBD pode restaurar o estado do filtro sensorio-motor. O bloqueio de receptores NMDA leva à estimulação excessiva de receptores não-NMDA, resultado da redução da estimulação dos interneurônios GABAérgicos e a subsequente desinibição de neurônios glutamatérgicos (Deutsch et al., 2001). Esse efeito manifesta-se também através da desregulação do tônus dopaminérgico cortical, levando ao aumento da neurotransmissão dopaminérgica subcortical (Deutsch et al., 2001). Entretanto, é um tanto improvável que a modulação dopaminérgica seja diretamente responsável pelos efeitos de antagonistas NMDA sobre o PPI, já que camundongos *knockout* para receptores D1 e D2 também apresentam esse efeito (Ralph-Williams et al., 2002), e antipsicóticos que antagonizam receptores dopaminérgicos não restauram déficits no PPI causados por antagonismo de receptores NMDA (Martin et al., 2003).

Um estudo *in vitro* (Fernandes et al., 1973) investigou compostos provenientes da *Cannabis* e como ocorrem as interações hepáticas em ratos, considerando os efeitos sobre as enzimas metabolizadoras dessas substâncias. Foi constatado que o CBD, assim como os outros canabinóides, é um inibidor efetivo de diversas enzimas microssomais de metabolização hepática e, dentre os canabinóides testados nesse estudo, é o mais potente. Na primeira vez que foi demonstrada a interferência do CBD sobre o metabolismo de outras drogas *in vivo* em camundongos, o resultado foi que o CBD inibe o metabolismo do THC, potencializando a ação psicotomimética desse composto provavelmente pelo aumento da meia-vida (Jones; Pertwee, 1972).

Um estudo realizado por Stone e Forney (1978) demonstrou que a meia-vida da fenciclidina em camundongos é de aproximadamente 46 minutos. Quando o CBD (20 mg/kg) é administrado 30 minutos antes de uma injeção de 25 mg/kg de fenciclidina, a meia-vida da droga passa de 46 para 66 minutos, ou seja, o CBD, por ser um potente inibidor do citocromo P450, aumenta o tempo de metabolismo da fenciclidina prolongando seu efeito.

Além disso, no mesmo estudo, o CBD, também administrado 30 minutos antes da fenciclidina, reduz o aumento da atividade locomotora, porém, apenas após 30 minutos da administração da fenciclidina, mantendo essa redução da atividade dos animais por mais aproximadamente 30 minutos, quando a atividade locomotora começa a decair. Em nosso estudo, uma dose mais alta de CBD, no caso 60 mg/kg, aumenta a hiperlocomoção induzida por KET. No parâmetro distância percorrida, esse resultado não é significativo em comparação ao grupo que não recebeu CBD (controle), mas no parâmetro frequência em pé, o Grupo que recebeu pré-tratamento com CBD60 apresentou aumento na locomoção em comparação ao grupo controle, após administração de KET.

Parece então que o CBD em concentrações mais altas, no caso 60 mg/kg, pode inibir as enzimas hepáticas de forma mais robusta que em baixas doses, o que possivelmente prolonga a meia-vida da KET exacerbando e prolongando seus efeitos sobre a atividade locomotora. Nas concentrações mais baixas, além de prevenir parcialmente os efeitos da KET, o CBD, especialmente na dose de 30 mg/kg, parece começar a surtir mais efeito após 20 minutos da administração de KET, o que não foi possível constatar de fato, já que a análise da atividade locomotora acaba após 20 minutos da administração de KET, ou seja, quando o pico de ação da KET e a distância percorrida tende a ficar mais próxima do valor obtido com o pré-tratamento com CBD.

De acordo com essas evidências, foi recentemente publicado um estudo preliminar sobre as interações farmacodinâmicas entre a KET e o CBD em humanos (Hallak et al., 2011). A administração de CBD previamente à administração de KET aumenta os efeitos da ativação psicomotora provocados pela última droga. Não se sabe ao certo quais mecanismos estão envolvidos nesse efeito. Tanto a KET quanto o CBD atuam sobre a liberação de GABA e glutamato, contribuindo para um complexo padrão de interação entre seus efeitos comportamentais. A KET reduz a ativação de neurônios GABAérgicos e estimula a liberação de glutamato (Moghaddam et al., 1997). O CBD parece exercer efeitos complexos tanto na liberação de GABA quanto de glutamato. Os receptores CB1 inibem a liberação desses dois neurotransmissores no SNC (Godino et al., 2007; Neu et al., 2007) e geralmente esses receptores são estimulados pela liberação de endocanabinóides em resposta à ativação de receptores NMDA pós-sinápticos (Beierlein; Regehr, 2006). Se o CBD atua como um antagonista de agonistas de receptores CB1, ele pode bloquear os efeitos dos endocanabinóides sobre a liberação de GABA e glutamato, mas ao mesmo tempo, pode

inibir a recaptação e a hidrólise de endocanabinóides, além de outros efeitos sobre os sistemas serotoninérgico e vanilóide que vêm sendo investigados (Hallak et al., 2011).

Nesse sentido, outras hipóteses podem explicar porque em nossos experimentos no campo aberto o CBD não exerce efeitos significativos. Primeiramente, diferente dos resultados obtidos por Moreira e Guimarães (2005), que verificaram a atividade locomotora 20 minutos após a administração de KET, a atividade locomotora foi registrada durante os 20 minutos anteriores e posteriores à injeção de KET, que ocorreu com o animal ainda dentro do monitor de atividades. Ou seja, não foram esperados 20 minutos após a injeção da KET para o início do registro do comportamento, detectando dessa maneira o pico de hiperlocomoção e, por esse ser bem intenso, talvez mascare os efeitos do CBD. Entretanto, a CZP, como demonstrado em estudo anterior (Hoffman, 1992) reduz a hiperlocomoção induzida pelo antagonismo de receptores NMDA.

Além disso, recentemente foi verificado qual o pico plasmático e cerebral de CBD em roedores, após administração por via intraperitoneal na concentração de 120 mg/kg (Deiana et al., 2011). Foi constatado que a concentração atinge seu pico máximo no plasma e no cérebro após 120 minutos da administração. Portanto, no teste do campo aberto, a injeção de KET foi realizada 50 minutos após a administração de CBD, indicando possivelmente que o pico de CBD não foi obtido na realização de nossos experimentos. Outra questão importante a ser levantada é que utilizamos ratos Wistar, linhagem nunca antes utilizada em experimentos sobre o perfil antipsicótico do CBD, e o veículo utilizado foi o óleo de milho, anteriormente usado apenas em administrações por via oral em humanos (Zuardi et al., 2006; 2009).

Para tentar esclarecer porque o CBD não apresentou efeitos significativos sobre a hiperlocomoção induzida por KET no monitor de atividades e, baseado no pico plasmático do CBD em ratos, tentamos repetir os experimentos com um intervalo maior entre a administração de CBD30 e de KET. Escolhemos o CBD na concentração de 30 mg/kg pois em nosso trabalho é a que exerce os efeitos mais uniformes nos testes comportamentais. Escolhemos o intervalo de 100 minutos entre a administração de CBD30 e de KET, para que quando recebesse a KET, o animal tivesse recebido o CBD 30 há 120 minutos, ou seja, o CBD30 estaria em seu pico máximo de concentração plasmática. Entretanto, ao contrário do esperado, e comparado ao grupo controle ÓLEO + KET e ao grupo CBD30 + KET, os efeitos do

CBD30 no grupo CBD30 (2hs) + KET não foram significativos, sendo mais parecidos com os resultados do grupo que não recebeu CBD (controle).

Analizando apenas esses 3 grupos, o grupo que recebeu pré-tratamento com CBD30, e a administração de KET 50 minutos depois (grupo CBD30 + KET) não apresentou aumento significativo da locomoção após a injeção de KET, o que significa que o CBD30 reduz os efeitos da KET sobre a atividade locomotora. Com isso também podemos sugerir que o pico de ação do CBD em ratos Wistar, na dose de 30 mg/kg, ocorre em torno de 60 minutos após a administração. Quanto à ao teste de inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto, a administração de CBD 120 minutos antes do teste também não demonstra efeitos significativos, contrariamente ao grupo que recebe CBD aproximadamente 60 minutos antes do teste.

Um importante estudo investigou a associação entre sintomas psicóticos e utilização de *Cannabis* com alta ou baixa concentração de CBD. As conclusões foram que o CBD, quando em menor concentração na planta, está associado a níveis maiores de sintomas psicóticos, mas não está relacionado a sintomas negativos e depressivos (Schubart et al., 2011). Nos experimentos realizados por Gururajan et al. (2011), o CBD apresentou uma tendência a reduzir o déficit na interação social causado pela administração de MK-801. Entretanto, esse resultado não foi significativo, de acordo com o estudo de Long et al. (2010), indicando que até hoje não foi demonstrado, de fato, que o CBD atue sobre sintomas negativos induzidos por antagonistas NMDA. Isso não significa que esse efeito não possa ocorrer, podendo apenas refletir a dificuldade de se encontrar a dose ideal de CBD no teste de interação social. Da mesma maneira, o pré-tratamento com CBD em nossos experimentos não reverte o prejuízo na interação social induzido por KET, nem causa efeitos sobre esse comportamento quando administrado sozinho.

Zanelati et al. (2010) demonstrou que nenhuma dose testada de CBD induz mudanças na atividade locomotora em camundongos no teste do campo aberto, em conformidade com estudos anteriores (Guimarães et al., 1990; Moreira; Guimarães, 2005) e também com nosso estudo. Contudo, no trabalho de Zanelati et al. (2010), o CBD na dose de 30 mg/kg reduz o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, indicativo de seu possível papel também como antidepressivo, e esse efeito é bloqueado pela administração de antagonistas de receptores 5-HT_{1A}. Portanto, o efeito do CBD em tarefas comportamentais que são geralmente utilizadas para quantificar comportamentos semelhantes aos sintomas

negativos da esquizofrenia, já foi demonstrado. Não se sabe ao certo porque o efeito positivo do CBD não é obtido no teste de interação social.

Em estudo desenvolvido por Casarotto et al. (2010) o efeito positivo do CBD (30 mg/kg), em um modelo de transtorno obsessivo-compulsivo (teste de esconder esferas), foi bloqueado pela administração de AM251, um antagonista de receptores CB1. O CBD demonstra pouca afinidade por receptores CB1 *in vitro*, mas pode facilitar a neurotransmissão endocanabinóide reduzindo a hidrólise ou a receptação de anandamida (Bisogno et al., 2001). Endocanabinóides podem reduzir a liberação de diversos neurotransmissores, entre eles o glutamato (Piomelli, 2003). Essas evidências sugerem, além da possível utilização do CBD em transtornos de ansiedade, que o CBD pode facilitar a redução na liberação de glutamato mediada por CB1.

É grande o contraste entre o THC e o CBD – o THC é pelo menos 10 vezes mais potente em se ligar a receptores CB1, enquanto que o CBD possui afinidade pelo receptor 5-HT1A em concentrações micromolares (Russo et al., 2005), o que não é obtido com o THC. Além disso, também foi demonstrado que o CBD estimula TRPV1, um dos receptores vanilóides (Bisogno et al., 2001). Os receptores vanilóides (TRPV1) são expressos em diversas áreas relacionadas à elaboração de respostas emocionais, como amígdala, hipocampo, córtex pré-frontal e substância cinzenta periquedutal (Cristino et al., 2006).

Dentre os efeitos da *Cannabis* em roedores, baixas doses parecem produzir efeitos do tipo ansiolítico e altas doses efeitos do tipo ansiogênico (Crippa et al., 2009). Mesmo o THC sendo o principal fator responsável pelos efeitos da planta, muitos estudos demonstram que outros componentes podem influenciar sua atividade farmacológica (Ashton, 2001; Crippa et al., 2009), sendo o CBD um desses compostos. Dados anteriores de ressonância magnética funcional mostraram que o CBD, mas não o THC, atenua a resposta neural à apresentação de faces de medo (Fusar-Poli et al., 2009). Os efeitos neurofisiológicos do CBD foram observados em estruturas límbicas como a amígdala e córtex cingulado anterior, regiões responsáveis pela integração do processamento emocional (Pessoa, 2008). Estudos preliminares (Fusar-Poli et al., 2009) mostraram que o CBD atenua o sinal neurofuncional na amígdala e córtex cingulado anterior durante o processamento das imagens de faces de medo, indicando o papel da conexão entre essas duas estruturas no efeito ansiolítico do CBD.

A respeito dos efeitos contrastantes apresentados por diferentes doses de CBD em diversos modelos experimentais. Dois recentes estudos acrescentaram informações relevantes quanto ao efeito bifásico geralmente apresentado pelos canabinóides quando, por exemplo, uma baixa dose é ansiolítica e uma alta dose é ansiogênica. Quando aplicada em doses mais reduzidas diretamente no córtex pré-frontal de ratos, a metanandamida, um derivado do endocanabinóide anandamida, produz efeitos ansiolíticos em tarefas comportamentais que medem ansiedade, enquanto que doses mais altas produzem efeitos ansiogênicos. Foi também sugerido que os efeitos ansiolíticos são mediados por receptores CB1 e os efeitos ansiogênicos por receptores TRPV1 (Rubino et al., 2008). A aplicação sistêmica de um bloqueador dual da enzima FAAH e de TRPV1, em baixa dose, provocou efeitos ansiolíticos, que poderiam posteriormente ser bloqueados pelo AM251, e também pelo agonista TRPV1 olvanil (Micale et al., 2008). Esses dados, em conjunto, indicam que a ativação de receptores CB1 pela anandamida promove comportamentos do tipo ansiolítico, enquanto que a ativação de TRPV1, também pela anandamida, leva a estados do tipo ansiogênicos.

Em particular, esses efeitos bifásicos podem ser explicados pela característica dos receptores CB1 de serem expressos em baixos níveis em neurônios glutamatérgicos e, em altos níveis, em interneurônios GABAérgicos (Hill et al., 2007), resultando em efeitos comportamentais ou fisiológicos antagônicos. No entanto, mais informações são necessárias para elucidar esses mecanismos. Se comparados com outros dados existentes na literatura, nossos resultados apresentam discrepâncias que representam esse efeito bifásico. No estudo desenvolvido por Gururajan et al. (2011) o CBD apresentou características pró-psicóticas, enquanto que em nosso trabalho, assim como no trabalho de Long et al., (2006; 2010), características antipsicóticas.

Reverendo a literatura a respeito dos efeitos terapêuticos do CBD, pode-se perceber a utilização de uma grande variedade de doses e veículos utilizados, o que dificulta a comparação e demonstra com clareza os efeitos bifásicos dessa droga e a curva farmacológica em U muito bem caracterizada, visto que é possível, no mesmo experimento, se obter efeitos antagônicos com concentrações diferentes de CBD. Em nossos experimentos, obtivemos efeitos antipsicóticos com o CBD na dose de 30 mg/kg, contrários aos efeitos do CBD na dose de 60 mg/kg. Os mecanismos envolvidos nessa diferença, especialmente em relação aos mecanismos de ação do CBD, devem ser mais esclarecidos,

pois como só quantificamos parâmetros comportamentais sem outras manipulações farmacológicas além das administrações de CZP, CBD e KET, não podemos afirmar se o CBD na dose de 60 mg/kg exerceu algum efeito pró-psicótico, semelhante ao estudo de Gururajan et al. (2011), ou se o CBD aumentou a meia-vida da KET por interações no metabolismo hepático das duas substâncias, como proposto por Hallak et al., (2011). Portanto, estudos adicionais são necessários para compreender os mecanismos envolvidos nesses efeitos discrepantes entre os estudos citados, e dentro de nosso próprio estudo.

6.3. PERFIL ANTIPSICÓTICO PROPOSTO PARA O CANABIDIOL

Mesmo com as importantes contribuições dos modelos animais no estudo da farmacologia dos canabinóides e do sistema endocanabinóide, ainda existe muita discussão a respeito das limitações. Extratos de *Cannabis* contêm uma mistura de diferentes compostos. Portanto, a administração de *Cannabis* ou apenas de THC pode provocar uma gama de efeitos diferentes, inclusive efeitos colaterais (MOREIRA et al., 2009). Para isso, a substância mais investigada é o CBD, já, que como mencionado anteriormente, apresenta propriedades similares a drogas ansiolíticas e antipsicóticas e pode prevenir os efeitos aversivos produzidos pelo THC. Infelizmente, os mecanismos precisos pelos quais o CBD apresenta seus efeitos ansiolíticos e antipsicóticos permanecem bem pouco definidos. Em todo caso, terapias baseadas na combinação entre THC e CBD têm sido desenvolvidas, com ambos os compostos produzindo efeitos terapêuticos e, graças ao CBD, com menos efeitos aversivos e ansiogênicos produzidos pelo THC (Zuardi et al., 2006).

Drogas que aumentem os níveis de endocanabinóides também podem ser uma alternativa, ativando a sinalização mediada por CB1 e evitando assim os efeitos colaterais resultantes da ativação massiva desses receptores, visto que inibidores da degradação de endocanabinóides possuem propriedades do tipo ansiolítica e antidepressiva sem os efeitos sedativos e o potencial aditivo que os agonistas de receptores CB1 apresentam mesmo em doses baixas ou intermediárias (Moreira; Lutz, 2008).

Um recente ensaio clínico controlado testou o CBD em pacientes diagnosticados com esquizofrenia ou transtorno esquizofreniforme (DSM-IV) em episódio agudo, em comparação ao antipsicótico amisulprida (antipsicótico atípico). Nos dois tratamentos ocorreu redução significativa dos sintomas psicóticos após duas e quatro semanas. Não

foram observadas diferenças significativas entre os grupos e o CBD, que apresentou, de maneira significativa, menos efeitos colaterais extrapiramidais (Leweke et al., 2007), reforçando assim o possível perfil antipsicótico do CBD e a ausência de efeitos tóxicos, como demonstrado em estudos anteriores (Zuardi et al, 2006a;b). Experimentos futuros devem ser realizados com o intuito de verificar as interações farmacodinâmicas entre o CBD e outros fármacos, assim como manipulações farmacológicas e análises moleculares, na tentativa de trazer contribuições para a descoberta de seus mecanismos de ação, tanto em nível de neurotransmissão como de expressão de receptores/proteínas associadas a sistemas neurotransmissores que podem estar envolvidos no potencial terapêutico desse canabinóide.

Atualmente, o termo “atípico” é comumente utilizado para definir drogas capazes de antagonizar receptores 5-HT_{2A} e D₂ (Meltzer et al., 2003). Após a constatação de que os receptores 5-HT_{2A} apresentam interações funcionais com os receptores 5-HT_{1A} (Zhang et al., 2004), a atenção foi voltada ao receptor 5-HT_{1A} como um possível alvo para a terapia antipsicótica. Agonistas 5-HT_{1A} aumentam os efeitos antipsicóticos de antagonistas de receptores D₂ (Prinssen et al, 1996) e parecem melhorar os sintomas negativos e os déficits cognitivos por estimulação da liberação de dopamina no córtex pré-frontal (Ichikawa; Meltzer, 1999). Além disso, ressaltando que esses compostos apresentam propriedades antidepressivas e ansiolíticas (Blier & Ward, 2003), podem melhorar a qualidade de vida de pacientes com esquizofrenia que apresentam sintomas de depressão e ansiedade.

A importância de mecanismos serotoninérgicos para os efeitos antipsicóticos e pró-cognitivos das drogas atípicas é suportada especialmente pela hipótese baseada na função hipoglutamatérgica da esquizofrenia (Coyle, 2006). Alterações na neurotransmissão glutamatérgica corticolímbica, provocadas pelo tratamento subcrônico com antagonistas NMDA em modelos experimentais, produzem déficits prolongados na memória de trabalho e de longo prazo, na interação social e na atenção, representativas do declínio cognitivo que ocorre na esquizofrenia (Gozzi et al., 2010).

O sucesso do CBD em minimizar os déficits cognitivos em modelos animais de psicose induzida, como também foi demonstrado em nosso trabalho, utilizando um antagonista de receptores NMDA, aponta a necessidade de se investigar se seus mecanismos de ação realmente estão associados à ativação de receptores serotoninérgicos. Em nosso trabalho, em conformidade com estudos anteriores, o CBD apresentou um perfil antipsicótico

parecido com o da CZP, especialmente na restauração do filtro sensório-motor. Se, de maneira semelhante, secundariamente ao antagonismo de receptores 5-HT_{2A}, o CBD depender da ligação a receptores 5-HT_{1A} para obter seus efeitos, podemos sugerir que o possível potencial desse composto para melhorar os sintomas, especialmente os déficits cognitivos, associados à esquizofrenia e a outros transtornos psicóticos, deve ser mais bem explorado, assim como o de outras drogas que atuem sobre a neurotransmissão serotoninérgica.

7. CONCLUSÕES

- (i) em ratos Wistar, o tratamento agudo com S(+)-ketamina na dose de 30 mg/kg produz alterações comportamentais que se assemelham aos sintomas da esquizofrenia em humanos: sintomas positivos, sintomas negativos e déficits cognitivos. Esses sintomas são manifestados em roedores através de hiperlocomoção, prejuízo na interação social e déficit na inibição pré-pulso, respectivamente;
- (ii) o pré-tratamento agudo com clozapina, na dose de 2.5 mg/kg, previne a hiperlocomoção e o déficit na inibição pré-pulso induzidos por S(+)-ketamina;
- (iii) o pré-tratamento com canabidiol, na dose de 30 mg/kg, previne a hiperlocomoção e o déficit na inibição pré-pulso induzido por S(+)-ketamina, e aumenta o reflexo de sobressalto quando associado a S(+)-ketamina;
- (iv) o CBD apresenta uma curva farmacológica em U característica, com diferentes efeitos de acordo com a dose;
- (v) o pré-tratamento com CBD, na dose de 60 mg/kg, aumenta a frequência em pé, representativa de aumento do comportamento exploratório, após a administração de S(+)-ketamina;
- (vi) o CBD e a CZP, quando administrados sozinhos, não provocam nenhuma alteração comportamental sobre a atividade locomotora, a inibição pré-pulso e o teste de interação social;
- (vii) a ação do canabidiol sobre a hiperlocomoção e o déficit na inibição pré-pulso induzidos por S(+)-ketamina é significativa se o CBD é administrado cerca de 60 minutos antes da administração de S(+)-ketamina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alger BE. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol*. 2002 Nov;68(4):247-86.
- Ashton CH. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *Br J Psychiatry*. 2001 Feb;178:101-6.
- Bakshi VP, Swerdlow NR, Geyer MA. Clozapine antagonizes phencyclidine-induced deficits in sensorimotor gating of the startle response. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Nov;271(2):787-94.
- Becker A, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004 Dec;28(8):1267-77.
- Beierlein M, Regehr WG. Local interneurons regulate synaptic strength by retrograde release of endocannabinoids. *J Neurosci*. 2006 Sep 27;26(39):9935-43.
- Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol*. 2001 Oct;134(4):845-52.
- Blier P, Ward NM. Is there a role for 5-HT1A agonists in the treatment of depression? *Biol Psychiatry*. 2003 Feb 1;53(3):193-203.
- Brar JS, Chengappa KN, Parepally H, Sandman AR, Kreinbrook SB, Sheth SA, et al. The effects of clozapine on negative symptoms in patients with schizophrenia with minimal positive symptoms. *Ann Clin Psychiatry*. 1997 Dec;9(4):227-34.
- Casarotto PC, Gomes FV, Resstel LB, Guimaraes FS. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. *Behav Pharmacol*. 2010 Jul;21(4):353-8.
- Chevalleyre V, Takahashi KA, Castillo PE. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*. 2006;29:37-76.
- Coppel DL, Bovill JG, Dundee JW. The taming of ketamine. *Anaesthesia*. 1973 May;28(3):293-6.
- Corbett R, Camacho F, Woods AT, Kerman LL, Fishkin RJ, Brooks K, et al. Antipsychotic agents antagonize non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonist-induced behaviors. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995 Jul;120(1):67-74.
- Coyle JT. Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cell Mol Neurobiol*. 2006 Jul-Aug;26(4-6):365-84.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996 Nov 7;384(6604):83-7.
- Crippa JA, Zuardi AW, Martin-Santos R, Bhattacharyya S, Atakan Z, McGuire P, et al. Cannabis and anxiety: a critical review of the evidence. *Hum Psychopharmacol*. 2009 Oct;24(7):515-23.

Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*. 2006;139(4):1405-15.

Curran HV, Brignell C, Fletcher S, Middleton P, Henry J. Cognitive and subjective dose-response effects of acute oral Delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) in infrequent cannabis users. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002 Oct;164(1):61-70.

Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry*. 1991 Nov;148(11):1474-86.

Dean B, Sundram S, Bradbury R, Scarr E, Copolov D. Studies on [3H]CP-55940 binding in the human central nervous system: regional specific changes in density of cannabinoid-1 receptors associated with schizophrenia and cannabis use. *Neuroscience*. 2001;103(1):9-15.

Deiana S, Watanabe A, Yamasaki Y, Amada N, Arthur M, Fleming S, et al. Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Delta-tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behaviour. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012 Feb;219(3):859-73.

Deutch AY, Duman RS. The effects of antipsychotic drugs on Fos protein expression in the prefrontal cortex: cellular localization and pharmacological characterization. *Neuroscience*. 1996 Jan;70(2):377-89.

Deutsch SI, Rosse RB, Schwartz BL, Mastropaolo J. A revised excitotoxic hypothesis of schizophrenia: therapeutic implications. *Clin Neuropharmacol*. 2001 Jan-Feb;24(1):43-9.

Di Marzo V. CB(1) receptor antagonism: biological basis for metabolic effects. *Drug Discov Today*. 2008 Dec;13(23-24):1026-41.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 1994 Dec 15;372(6507):686-91.

Duncan GE, Leipzig JN, Mailman RB, Lieberman JA. Differential effects of clozapine and haloperidol on ketamine-induced brain metabolic activation. *Brain Res*. 1998 Nov 23;812(1-2):65-75.

Duncan GE, Moy SS, Lieberman JA, Koller BH. Effects of haloperidol, clozapine, and quetiapine on sensorimotor gating in a genetic model of reduced NMDA receptor function. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006 Jan;184(2):190-200.

Elbatsh MM, Assareh N, Marsden CA, Kendall DA. Anxiogenic-like effects of chronic cannabidiol administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012 May;221(2):239-47.

Fernandes M, Warning N, Christ W, Hill R. Interactions of several cannabinoids with the hepatic drug metabolizing system. *Biochem Pharmacol*. 1973 Dec 1;22(23):2981-7.

File SE, Hyde JR. Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol*. 1978 Jan;62(1):19-24.

Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*. 2003 Jul;83(3):1017-66.

- Fusar-Poli P, Allen P, Bhattacharyya S, Crippa JA, Mechelli A, Borgwardt S, et al. Modulation of effective connectivity during emotional processing by Delta 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2010 May;13(4):421-32.
- Gardner EL. Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005 Jun;81(2):263-84.
- Gardner EL, Lowinson JH. Marijuana's interaction with brain reward systems: update 1991. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991 Nov;40(3):571-80.
- Gardner EL, Paredes W, Smith D, Donner A, Milling C, Cohen D, et al. Facilitation of brain stimulation reward by delta 9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl)*. 1988;96(1):142-4.
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001 Jul;156(2-3):117-54.
- Godino Mdel C, Torres M, Sanchez-Prieto J. CB1 receptors diminish both Ca(2+) influx and glutamate release through two different mechanisms active in distinct populations of cerebrocortical nerve terminals. *J Neurochem*. 2007 Jun;101(6):1471-82.
- Gozzi A, Crestan V, Turrini G, Clemens M, Bifone A. Antagonism at serotonin 5-HT(2A) receptors modulates functional activity of frontohippocampal circuit. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010 Mar;209(1):37-50.
- Green MF, Kern RS, Braff DL, Mintz J. Neurocognitive deficits and functional outcome in schizophrenia: are we measuring the "right stuff"? *Schizophr Bull*. 2000;26(1):119-36.
- Guimaraes FS, Chiaretti TM, Graeff FG, Zuardi AW. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*. 1990;100(4):558-9.
- Guimaraes VM, Zuardi AW, Del Bel EA, Guimaraes FS. Cannabidiol increases Fos expression in the nucleus accumbens but not in the dorsal striatum. *Life Sci*. 2004 Jun 18;75(5):633-8.
- Gururajan A, Taylor DA, Malone DT. Cannabidiol and clozapine reverse MK-801-induced deficits in social interaction and hyperactivity in Sprague-Dawley rats. *J Psychopharmacol*. 2012 Apr 9.
- Hallak JE, Dursun SM, Bosi DC, de Macedo LR, Machado-de-Sousa JP, Abrao J, et al. The interplay of cannabinoid and NMDA glutamate receptor systems in humans: preliminary evidence of interactive effects of cannabidiol and ketamine in healthy human subjects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011 Jan 15;35(1):198-202.
- Haller J, Szirmai M, Varga B, Ledent C, Freund TF. Cannabinoid CB1 receptor dependent effects of the NMDA antagonist phencyclidine in the social withdrawal model of schizophrenia. *Behav Pharmacol*. 2005 Sep;16(5-6):415-22.
- Hamdani N, Tabeze JP, Ramoz N, Ades J, Hamon M, Sarfati Y, et al. The CNR1 gene as a pharmacogenetic factor for antipsychotics rather than a susceptibility gene for schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2008 Jan;18(1):34-40.
- Hashimoto Y, Ohno-Shosaku T, Kano M. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *Neuroscientist*. 2007 Apr;13(2):127-37.

- Hill EL, Gallopin T, Ferezou I, Cauli B, Rossier J, Schweitzer P, et al. Functional CB1 receptors are broadly expressed in neocortical GABAergic and glutamatergic neurons. *J Neurophysiol.* 2007 Apr;97(4):2580-9.
- Hiroi N, Graybiel AM. Atypical and typical neuroleptic treatments induce distinct programs of transcription factor expression in the striatum. *J Comp Neurol.* 1996 Oct 7;374(1):70-83.
- Hoffman DC. Typical and atypical neuroleptics antagonize MK-801-induced locomotion and stereotypy in rats. *J Neural Transm Gen Sect.* 1992;89(1-2):1-10.49.
- Ichikawa J, Meltzer HY. Relationship between dopaminergic and serotonergic neuronal activity in the frontal cortex and the action of typical and atypical antipsychotic drugs. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1999;249 Suppl 4:90-8.
- Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci.* 2009 Oct;30(10):515-27.
- Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 1991 Oct;148(10):1301-8.
- Jentsch JD, Roth RH. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 1999 Mar;20(3):201-25.
- Jones G, Pertwee RG. A metabolic interaction in vivo between cannabidiol and 1 - tetrahydrocannabinol. *Br J Pharmacol.* 1972 Jun;45(2):375-7.
- Jones NA, Hill AJ, Smith I, Bevan SA, Williams CM, Whalley BJ, et al. Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Feb;332(2):569-77.
- Kapur S, Cho R, Jones C, McKay G, Zipursky RB. Is amoxapine an atypical antipsychotic? Positron-emission tomography investigation of its dopamine₂ and serotonin₂ occupancy. *Biol Psychiatry.* 1999 May 1;45(9):1217-20.
- Kapur S, Seeman P. Ketamine has equal affinity for NMDA receptors and the high-affinity state of the dopamine D2 receptor. *Biol Psychiatry.* 2001 Jun 1;49(11):954-7.
- Katona I, Freund TF. Multiple Functions of Endocannabinoid Signaling in the Brain. *Annu Rev Neurosci.* 2012 Apr 17.
- Kegeles LS, Abi-Dargham A, Zea-Ponce Y, Rodenhiser-Hill J, Mann JJ, Van Heertum RL, et al. Modulation of amphetamine-induced striatal dopamine release by ketamine in humans: implications for schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2000 Oct 1;48(7):627-40.
- Kilts CD. The changing roles and targets for animal models of schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2001 Dec 1;50(11):845-55.
- Knable MB, Weinberger DR. Dopamine, the prefrontal cortex and schizophrenia. *J Psychopharmacol.* 1997;11(2):123-31.
- Koch M. The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol.* 1999 Oct;59(2):107-28.

Krystal JH, D'Souza DC, Madonick S, Petrakis IL. Toward a rational pharmacotherapy of comorbid substance abuse in schizophrenic patients. *Schizophr Res*. 1999 Mar 1;35 Suppl:S35-49.

Krystal JH, D'Souza DC, Mathalon D, Perry E, Belger A, Hoffman R. NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003 Sep;169(3-4):215-33.

Krystal JH, Karper LP, Bennett A, D'Souza DC, Abi-Dargham A, Morrissey K, et al. Interactive effects of subanesthetic ketamine and subhypnotic lorazepam in humans. *Psychopharmacology (Berl)*. 1998 Feb;135(3):213-29.

Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, et al. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry*. 1994 Mar;51(3):199-214.

Krystal JH, Petrakis IL, Webb E, Cooney NL, Karper LP, Namanworth S, et al. Dose-related ethanol-like effects of the NMDA antagonist, ketamine, in recently detoxified alcoholics. *Arch Gen Psychiatry*. 1998 Apr;55(4):354-60.

Kupfer D, Levin E, Burstein SH. Studies on the effects of 1-tetrahydrocannabinol (1-THC) and DDT on the hepatic microsomal metabolism of 1-THC and other compounds in the rat. *Chem Biol Interact*. 1973 Jan;6(1):59-66.

Lahti RA, Roberts RC, Tamminga CA. D2-family receptor distribution in human postmortem tissue: an autoradiographic study. *Neuroreport*. 1995 Dec 15;6(18):2505-12.

Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, et al. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 20;93(17):9235-40.

Lavin A, Moore HM, Grace AA. Prenatal disruption of neocortical development alters prefrontal cortical neuron responses to dopamine in adult rats. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Aug;30(8):1426-35.

Laviolette SR. Dopamine modulation of emotional processing in cortical and subcortical neural circuits: evidence for a final common pathway in schizophrenia? *Schizophr Bull*. 2007 Jul;33(4):971-81.

Ledgerwood CJ, Greenwood SM, Brett RR, Pratt JA, Bushell TJ. Cannabidiol inhibits synaptic transmission in rat hippocampal cultures and slices via multiple receptor pathways. *Br J Pharmacol*. 2011 Jan;162(1):286-94.

Leweke FM, Giuffrida A, Koethe D, Schreiber D, Nolden BM, Kranaster L, et al. Anandamide levels in cerebrospinal fluid of first-episode schizophrenic patients: impact of cannabis use. *Schizophr Res*. 2007 Aug;94(1-3):29-36.

Leweke FM, Koethe D. Cannabis and psychiatric disorders: it is not only addiction. *Addict Biol*. 2008 Jun;13(2):264-75.

Leweke FM, Schneider U, Radwan M, Schmidt E, Emrich HM. Different effects of nabilone and cannabidiol on binocular depth inversion in Man. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000 May;66(1):175-81.

Lewis DA, Gonzalez-Burgos G. Intrinsic excitatory connections in the prefrontal cortex and the pathophysiology of schizophrenia. *Brain Res Bull.* 2000 Jul 15;52(5):309-17.

Lewis DA, Pierri JN, Volk DW, Melchitzky DS, Woo TU. Altered GABA neurotransmission and prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1999 Sep 1;46(5):616-26.

Luby ED, Cohen BD, Rosenbaum G, Gottlieb JS, Kelley R. Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 1959 Mar;81(3):363-9.

Lutz B. On-demand activation of the endocannabinoid system in the control of neuronal excitability and epileptiform seizures. *Biochem Pharmacol.* 2004 Nov 1;68(9):1691-8.

Maccarrone M. Good news for CB1 receptors: endogenous agonists are in the right place. *Br J Pharmacol.* 2008 Jan;153(2):179-81.

Malhotra AK, Pinals DA, Adler CM, Elman I, Clifton A, Pickar D, et al. Ketamine-induced exacerbation of psychotic symptoms and cognitive impairment in neuroleptic-free schizophrenics. *Neuropsychopharmacology.* 1997 Sep;17(3):141-50.

Mansbach RS, Geyer MA. Effects of phencyclidine and phencyclidine biologs on sensorimotor gating in the rat. *Neuropsychopharmacology.* 1989 Dec;2(4):299-308.

Martin BR, Mechoulam R, Razdan RK. Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. *Life Sci.* 1999;65(6-7):573-95.

Martin RS, Secchi RL, Sung E, Lemaire M, Bonhaus DW, Hedley LR, et al. Effects of cannabinoid receptor ligands on psychosis-relevant behavior models in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 2003 Jan;165(2):128-35.

Mathe JM, Nomikos GG, Schilström B, Svensson TH. Non-NMDA excitatory amino acid receptors in the ventral tegmental area mediate systemic dizocilpine (MK-801) induced hyperlocomotion and dopamine release in the nucleus accumbens. *J Neurosci Res.* 1998 Mar 1;51(5):583-92.

McGhie A, Chapman J. Disorders of attention and perception in early schizophrenia. *Br J Med Psychol.* 1961;34:103-16.

Mead A, Li M, Kapur S. Clozapine and olanzapine exhibit an intrinsic anxiolytic property in two conditioned fear paradigms: contrast with haloperidol and chlordiazepoxide. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008 Oct;90(4):551-62.

Mechoulam R. Recent advantages in cannabinoid research. *Forsch Komplementarmed.* 1999 Oct;6 Suppl 3:16-20.

Mechoulam R, Gaoni Y. A Total Synthesis of Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc.* 1965 Jul 20;87:3273-5.

Meltzer HY. Clozapine: is another view valid? *Am J Psychiatry.* 1995 Jun;152(6):821-5.

Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003 Oct;27(7):1159-72.

Meltzer HY, Massey BW. The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Curr Opin Pharmacol*. 2011 Feb;11(1):59-67.

Meltzer HY, McGurk SR. The effects of clozapine, risperidone, and olanzapine on cognitive function in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 1999;25(2):233-55.

Micale V, Cristino L, Tamburella A, Petrosino S, Leggio GM, Drago F, et al. Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. *Neuropsychopharmacology*. 2009 Feb;34(3):593-606.

Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci*. 1997 Apr 15;17(8):2921-7.

Moreira FA, Guimaraes FS. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. *Eur J Pharmacol*. 2005 Apr 11;512(2-3):199-205.

Moreira FA, Lutz B. The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol*. 2008 Jun;13(2):196-212.

Murase S, Mathe JM, Grenhoff J, Svensson TH. Effects of dizocilpine (MK-801) on rat midbrain dopamine cell activity: differential actions on firing pattern related to anatomical localization. *J Neural Transm Gen Sect*. 1993;91(1):13-25.

Neu A, Foldy C, Soltesz I. Postsynaptic origin of CB1-dependent tonic inhibition of GABA release at cholecystokinin-positive basket cell to pyramidal cell synapses in the CA1 region of the rat hippocampus. *J Physiol*. 2007 Jan 1;578(Pt 1):233-47.

Newcomer JW, Farber NB, Jevtovic-Todorovic V, Selke G, Melson AK, Hershey T, et al. Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology*. 1999 Feb;20(2):106-18.

Oertel V, Rotarska-Jagiela A, van de Ven VG, Haenschel C, Maurer K, Linden DE. Visual hallucinations in schizophrenia investigated with functional magnetic resonance imaging. *Psychiatry Res*. 2007 Dec 15;156(3):269-73.

Palazzo E, de Novellis V, Marabese I, Cuomo D, Rossi F, Berrino L, et al. Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception. *Eur J Pharmacol*. 2002 Mar 29;439(1-3):69-75.

Parolaro D. [Adolescent cannabis consumption and schizophrenia: epidemiological and experimental evidences]. *Adicciones*. 2010;22(3):185-9.

Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*. 1997;74(2):129-80.

Pertwee RG. Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol*. 2008 Jun;13(2):147-59.

Pessoa L. On the relationship between emotion and cognition. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Feb;9(2):148-58.

- Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 2003 Nov;4(11):873-84.
- Raja M. Clozapine safety, 35 years later. *Curr Drug Saf.* 2011 Jul;6(3):164-84.
- Rakhshan F, Day TA, Blakely RD, Barker EL. Carrier-mediated uptake of the endogenous cannabinoid anandamide in RBL-2H3 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Mar;292(3):960-7.
- Ralph-Williams RJ, Lehmann-Masten V, Otero-Corchon V, Low MJ, Geyer MA. Differential effects of direct and indirect dopamine agonists on prepulse inhibition: a study in D1 and D2 receptor knock-out mice. *J Neurosci.* 2002 Nov 1;22(21):9604-11.
- Rigdon GC. Differential effects of apomorphine on prepulse inhibition of acoustic startle reflex in two rat strains. *Psychopharmacology (Berl).* 1990;102(3):419-21.
- Rosenkrantz H, Fleischman RW, Grant RJ. Toxicity of short-term administration of cannabinoids to rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1981 Mar 30;58(1):118-31.
- Rottanburg D, Robins AH, Ben-Arie O, Teggin A, Elk R. Cannabis-associated psychosis with hypomanic features. *Lancet.* 1982 Dec 18;2(8312):1364-6.
- Rubino T, Realini N, Castiglioni C, Guidali C, Vigano D, Marras E, et al. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb Cortex.* 2008 Jun;18(6):1292-301.
- Rung JP, Carlsson A, Ryden Markinhuhta K, Carlsson ML. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005 Jun;29(5):827-32.
- Russo E, Guy GW. A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses.* 2006;66(2):234-46.
- Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem Res.* 2005 Aug;30(8):1037-43.
- Ryan D, Drysdale AJ, Lafourcade C, Pertwee RG, Platt B. Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca²⁺ levels. *J Neurosci.* 2009 Feb 18;29(7):2053-63.
- Sams-Dodd F. Effect of novel antipsychotic drugs on phencyclidine-induced stereotyped behaviour and social isolation in the rat social interaction test. *Behav Pharmacol.* 1997 Jun;8(2-3):196-215.
- Schubart CD, Sommer IE, van Gastel WA, Goetgebuer RL, Kahn RS, Boks MP. Cannabis with high cannabidiol content is associated with fewer psychotic experiences. *Schizophr Res.* 2011 Aug;130(1-3):216-21.
- Seong E, Seasholtz AF, Burmeister M. Mouse models for psychiatric disorders. *Trends Genet.* 2002 Dec;18(12):643-50.
- Sesack SR, Carr DB, Omelchenko N, Pinto A. Anatomical substrates for glutamate-dopamine interactions: evidence for specificity of connections and extrasynaptic actions. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Nov;1003:36-52.

Sitges M, Nekrassov V, Guarneros A. Simultaneous action of MK-801 (dizclopine) on dopamine, glutamate, aspartate and GABA release from striatum isolated nerve endings. *Brain Res.* 2000 Jan 31;854(1-2):48-56.

Snyder SH. Catecholamines in the brain as mediators of amphetamine psychosis. *Arch Gen Psychiatry.* 1972 Aug;27(2):169-79.

Stone CJ, Forney RB. The effects of phencyclidine on ethanol and sodium hexobarbital in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1977 May;40(2):177-83.

Stone JM, Morrison PD, Pilowsky LS. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia--a synthesis and selective review. *J Psychopharmacol.* 2007 Jun;21(4):440-52.

Swerdlow NR, Bakshi V, Waikar M, Taaid N, Geyer MA. Seroquel, clozapine and chlorpromazine restore sensorimotor gating in ketamine-treated rats. *Psychopharmacology (Berl).* 1998 Nov;140(1):75-80.

Swerdlow NR, Geyer MA. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1998;24(2):285-301.

Ujike H, Morita Y. New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: cannabinoid receptors and schizophrenia. *J Pharmacol Sci.* 2004 Dec;96(4):376-81.

Verma A, Moghaddam B. NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine. *J Neurosci.* 1996 Jan;16(1):373-9.

Vigano D, Guidali C, Petrosino S, Realini N, Rubino T, Di Marzo V, et al. Involvement of the endocannabinoid system in phencyclidine-induced cognitive deficits modelling schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2009 Jun;12(5):599-614.

Watanabe K, Kayano Y, Matsunaga T, Yamamoto I, Yoshimura H. Inhibition of anandamide amidase activity in mouse brain microsomes by cannabinoids. *Biol Pharm Bull.* 1996 Aug;19(8):1109-11.

Winton-Brown TT, Allen P, Bhattacharyya S, Borgwardt SJ, Fusar-Poli P, Crippa JA, et al. Modulation of auditory and visual processing by delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol: an fMRI study. *Neuropsychopharmacology.* 2011 Jun;36(7):1340-8.

Wong EH, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Sep;83(18):7104-8.

Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimaraes FS, Joca SR. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol.* 2010 Jan;159(1):122-8.

Zavitsanou K, Garrick T, Huang XF. Selective antagonist [3H]SR141716A binding to cannabinoid CB₁ receptors is increased in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004 Mar;28(2):355-60.

Zuardi AW. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. *Rev Bras Psiquiatr.* 2008 Sep;30(3):271-80.

Zuardi AW, Crippa JA, Hallak JE, Moreira FA, Guimaraes FS. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. *Braz J Med Biol Res.* 2006 Apr;39(4):421-9.

Zuardi AW, Hallak JE, Dursun SM, Morais SL, Sanches RF, Musty RE, et al. Cannabidiol monotherapy for treatment-resistant schizophrenia. *J Psychopharmacol.* 2006 Sep;20(5):683-6.

Zuardi AW, Rodrigues JA, Cunha JM. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. *Psychopharmacology (Berl).* 1991;104(2):260-4.

Zuardi AW, Shirakawa I, Finkelfarb E, Karniol IG. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology (Berl).* 1982;76(3):245-50.