UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

KENNIA MOURA SILVEIRA

Avaliação do efeito tipo-antidepressivo da aracdonoil serotonina (AA-5HT) no teste do nado forçado

Ribeirão Preto
2018

KENNIA MOURA SILVEIRA

Avaliação do efeito tipo-antidepressivo da aracdonoil serotonina (AA-5HT) no teste do nado forçado

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Profª Drª Sâmia Regiane Lourenço Joca

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 04/04/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

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

Silveira, Kennia Moura
Avaliação do efeito tipo-antidepressivo da aracdonoil serotonina (AA-5HT) no teste do nado forçado. Ribeirão Preto, 2018.
76 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.
Orientador: Joca, Sâmia Regiane Lourenço.

1. AA-5HT. 2. Endocanabinóides. 3. Teste do nado forçado.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Kennia Moura Silveira

Avaliação do efeito tipo-antidepressivo da aracdonoil serotonina (AA-5HT) no teste do nado forçado

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Dedico este trabalho a minha família, com amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Sâmia Joca, pela oportunidade do Mestrado, e por ter me orientado com tanta dedicação. Obrigada pela confiança, pelo incentivo e por toda colaboração no desenvolvimento deste projeto.

À Ariandra Sartim por sua amizade e generosidade neste projeto. Obrigada pela paciência e por me tranquilizar diante das dificuldades, enfim, muito obrigada por toda ajuda durante a realização deste projeto.

Ao Pedro Gobira por sua amizade, pela paciência, pelos conselhos e discussões de resultados.

A todos os meus amigos de laboratório Aline, Gabriela, Laura, Deidiane, Izaque, Rebeca, Cassiano e Stefano pela convivência diária, companheirismo, e por terem tornado meu dia-dia mais feliz.

À técnica de laboratório, Flávia Sallata, pela ajuda durante o desenvolvimento dos experimentos.

À agência de fomento, CNPq, pelo amparo financeiro.

Aos meus pais, Marinilce e Vanderlino, por todo amor, carinho e compreensão. Obrigada pelos conselhos, por apoiarem e incentivarem minhas escolhas. Muito obrigada por tudo! Sem vocês nada disso seria possível!

Aos meus avós, Raul e Maria, por todo carinho e dedicação. Obrigada pelo apoio e incentivo.

Ao meu irmão, Maiko, pela cumplicidade. Obrigada por estar sempre ao meu lado e por encorajar os meus sonhos.

Ao meu namorado, Lucas, por todo amor, paciência e companheirismo. Obrigada por acreditar em mim, por apoiar e incentivar a busca dos meus sonhos. Obrigada por estar sempre comigo e por fazer os meus dias mais felizes.

Muito obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste projeto!

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância”.

John F. Kennedy

RESUMO

SILVEIRA, K. M. **Avaliação do efeito tipo-antidepressivo da aracdonoil serotonina (AA-5HT) no teste do nado forçado**. 2018. 76f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A anandamida, um dos principais endocanabinóides estudados, além de se ligar aos receptores CB1, em altas doses, também é capaz de ativar os receptores vanilóides de potencial transitório tipo-1 (TRPV1). Evidências experimentais indicam que a sinalização mediada por CB1 facilita, enquanto TRPV1 prejudica, a resposta de adaptação a situações de estresse, tornando o animal mais susceptível a suas consequências comportamentais. Estudos demonstram que a inibição da enzima amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH), responsável pela hidrólise da anandamida, apresenta efeito tipo-antidepressivo, efeito este também observado quando administrado antagonista de TRPV1. Portanto, a ação combinada de inibição da FAAH e bloqueio de TRPV1 poderia ter potencial efeito antidepressivo. Diante destas evidências, o objetivo do presente trabalho foi investigar se a administração sistêmica de AA-5HT, droga que inibe a FAAH e bloqueia TRPV1, em camundongos submetidos ao teste do nado forçado, promove um efeito tipo-antidepressivo; e ainda, se esse comportamento estaria relacionado com a ativação de receptores canabinóides CB1 e com bloqueio dos receptores vanilóides TRPV1. Camundongos Swiss machos receberam injeção intraperitoneal de AA-5HT (0.1, 0.3, e 1 mg/kg), inibidor da FAAH (URB597 - 0.03, 0.1, 0.3, 1, e 3 mg/kg), antagonista TRPV1 (SB366791 - 0.03, 0.1, 0.3, 1 e 3 mg/kg) e antagonista CB1 (AM251 - 1 e 3 mg/kg) ou o veículo correspondente e, 30 minutos depois, os mesmos animais foram submetidos ao teste do campo aberto. Imediatamente após foram submetidos ao teste do nado forçado. O tratamento com AA-5HT na dose de 0.3mg/kg reduziu significativamente o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, sem alterar a atividade locomotora. Por outro lado, as doses testadas de URB597, SB366791 e AM251 não reduziram significativamente o tempo de imobilidade quando comparadas ao grupo veículo. E ainda, não foi observada somação de efeito da coadministração de doses equipotentes e subefetivas de SB366791 e URB597 no teste do nado forçado. Por fim, a pré-administração do antagonista CB1 (AM251) não alterou o tempo de imobilidade de AA-5HT. Apesar disso, quando o AA-5HT foi pré-administrado com o veículo utilizado para diluir o AM251, apresentou aumento significativo no tempo de imobilidade quando comparado aos animais pré-tratados com salina, comprometendo assim a investigação sobre a participação dos receptores CB1 no efeito do AA-5HT. Sendo assim, nossos resultados sugerem que a administração sistêmica de AA-5HT produz um efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar o envolvimento dos receptores CB1 neste comportamento.

Palavras-chave: AA-5HT. Endocanabinóides. Teste do nado forçado. Camundongos.

ABSTRACT

SILVEIRA, K. M. **Evaluation of the antidepressant-like effect of arachidonoyl serotonina (AA-5HT) in the forced swim test**. 2018. 76f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Anandamide, one of the most studied endocannabinoids, acts through interaction with CB1 cannabinoids receptors, and, in higher doses, activate TRPV1 receptor. Experimental evidence shows that CB1-mediated signaling improve, while TRPV1-signaling impairs the adaptative response to stressful situations, thus increasing the susceptibility to behavioral consequences. The administration of inhibitors of fatty acid amide hydrolase (FAAH), responsible for anandamide hydrolysis, exerts antidepressant-like effects in preclinical models. The same effect is observed when TRPV1 antagonist is administered. Therefore, the combined blockade of FAAH and TRPV1 could potentially represent an interesting pharmacological tool to induce antidepressant effects. Based on that, the aim of this study was to investigate if AA-5HT, a FAAH inhibitor and TRPV1 blocker, would induce antidepressant-like effect in mice, and to evaluate the participation of TRPV1 and CB1 receptors in this effect. Male Swiss mice received an intraperitoneal injection of AA-5HT (0.1, 0.3, e 1 mg/kg), FAAH inhibitor (URB597 - 0.03, 0.1, 0.3, 1, e 3 mg/kg), TRPV1 antagonist (SB366791 - 0.03, 0.1, 0.3, 1 e 3 mg/kg) and CB1 antagonist (AM251 - 1 e 3 mg/kg) or the corresponding vehicle and, 30 minutes later, they were individually submitted to the open field test. Immediately after this, the same animal was submitted to the forced swimming test. Our results showed that the treatment with AA-5HT at dose 0,3mg/kg significantly reduced the immobility time in the forced swim test without changing the locomotor activity. On the other hand, the tested dose range of URB597, SB366791 e AM251 did not significantly reduced the immobility time when compared to vehicle group. Furthermore, there was no observed effect of the coadministration of equipotent and sub-effective doses of SB366791 and URB597 on forced swim test. Finally, pre-administration of the CB1 antagonist (AM251) did not alter the immobility time of AA-5HT. However, when AA-5HT was pre-administered with the vehicle used to dilute AM251, it showed a significant increase in immobility time when compared to animals pretreated with saline, thus compromising the study about the participation of CB1 receptors in the effect of AA-5HT. Thus, our results suggest systemic administration of AA-5HT produces an antidepressant-like effect on FST. However, further studies are needed to evaluate the involvement of CB1 receptors in this behavior.

Keywords: AA-5HT. Endocannabinoids. Forced swim test. Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modulação do sistema endocanabinóide..... 08
Figura 2. Desenho experimental..... 20
Figura 3. Efeito da administração sistêmica de AA-5HT, em animais submetidos aos testes do nado forçado e do campo aberto..... 26
Figura 4. Efeito da administração sistêmica de SB366791 em animais submetidos aos testes do nado forçado e do campo aberto..... 28
Figura 5. Efeito da administração sistêmica de URB597 em animais submetidos aos testes do nado forçado e do campo aberto..... 30
Figura 6. Efeito da administração sistêmica de URB597 em animais submetidos aos testes do nado forçado e do campo aberto..... 32
Figura 7. Efeito da coadministração sistêmica de SB366791 e URB597, em doses equipotentes a AA-5HT, em animais submetidos aos testes do nado forçado e do campo aberto..... 34
Figura 8. Efeito da coadministração sistêmica de SB366791 e URB597, em doses subefetivas, em animais submetidos aos testes do nado forçado e do campo aberto..... 36
Figura 9. Efeito da administração sistêmica de AM251 em animais submetidos aos testes do nado forçado e do campo aberto..... 38
Figura 10. Efeito da coadministração sistêmica de AM251 e AA-5HT em animais submetidos aos testes do nado forçado e do campo aberto..... 40
Figura 11. Efeito da administração sistêmica de AA-5HT nos testes do nado forçado e no campo aberto..... 42
Figura 12. Efeito da coadministração sistêmica de AM251 e AA-5HT em animais submetidos aos testes do nado forçado e do campo aberto (repetição do experimento 7) 44
Figura 13. Efeitos AA-5HT (0,3mg/kg), após pré-tratamento, em animais submetidos ao teste do nado forçado e do campo aberto..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de modelos animais e testes comportamentais empregados no estudo da neurobiologia da depressão e identificação de novos antidepressivos..... 05
Tabela 2 – Efeitos do AA-5HT em estudo pré-clínicos de transtornos emocionais..... 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2-Aracdonoil glicerol
AA-5HT	Aracdonoil serotonina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
CPFm	Córtex pré-frontal medial
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPN	Dia pós-natal
DSM-V	5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
ER	Estresse de restrição
FAAH	Amida hidrolase de ácidos graxos
FST	*Forced swim test* (Teste do nado forçado)
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
i.p	Intraperitoneal
IC50	Concentração necessária para inibir cinquenta por cento de um efeito
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
MGL	Monoacilglicerol lipase
OFT	*Open field test* (Teste do campo aberto)
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
TRPV1	Receptor vanilóide de potencial transitório tipo-1
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas iv
Lista de abreviaturas e siglas v

1. INTRODUÇÃO..... 01
1.1 Depressão..... 02
1.2 Modelos preditivos de efeitos antidepressivos..... 03
1.2.1 Teste do nado forçado..... 06
1.3 Sistema endocanabinóide e depressão..... 06
1.3.1 Receptores vanilóides de potencial transitório tipo-1 (TRPV1)..... 10
1.3.2 Aracdonoil serotonina (AA-5HT)..... 12
1.4 Hipótese..... 13

2. OBJETIVOS..... 14
2.1 Objetivo geral..... 15
2.2. Objetivos específicos..... 15

3. MATERIAL E MÉTODOS..... 16
3.1 Animais..... 17
3.2 Drogas..... 17
3.3 Procedimentos Experimentais..... 18
3.3.1 Teste do Campo Aberto..... 18
3.3.2 Teste do Nado Forçado..... 19
3.4 Delineamento Experimental..... 19
Experimento 1..... 20
Experimento 2..... 20
Experimento 3..... 20
Experimento 4..... 21
Experimento 5..... 22
Experimento 6..... 22
Experimento 7..... 22
Experimento 8..... 22
3.5 Análise Estatística..... 23

4. RESULTADOS..... 24
4.1 - Experimento 1..... 25
4.2 - Experimento 2..... 27
4.3 - Experimento 3..... 29
4.4 - Experimento 4..... 33
4.5 - Experimento 5..... 35
4.6 - Experimento 6..... 37
4.7 - Experimento 7..... 39
4.8 - Experimento 8..... 45

5. DISCUSSÃO..... 47

6. CONCLUSÃO..... 61

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO..... 63

8. REFERÊNCIAS..... 64

9. ANEXO..... 75

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Depressão

A depressão é um transtorno psiquiátrico que atinge 300 milhões de pessoas (WORD HEALTH ORGANIZATION), e, em 2030, será a doença mais debilitante (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Em todo o mundo, a depressão é o transtorno mental mais comum e a principal causa de incapacidade (WORD HEALTH ORGANIZATION).

O indivíduo depressivo apresenta humor deprimido na maior parte do tempo e perda de interesse em atividades antes prazerosas (anedonia), associados a alterações de peso e sono, agitação ou retardo motor, fadiga, culpa excessiva, dificuldade de concentração, indecisão e ideias recorrentes de suicídio ou morte. Segundo a 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014), para o paciente ser diagnosticado com Depressão Maior, ele deve apresentar, por um período mínimo de duas semanas, ao menos cinco dos sintomas citados, dentre eles humor deprimido e anedonia.

Os episódios depressivos são mais prevalentes em mulheres (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; KENDLER *et al.*, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION), e seu risco de recorrência é maior em pacientes cujo episódio anterior foi grave, em indivíduos mais jovens e naqueles que já apresentaram múltiplos episódios (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Além do risco inerente de suicídio (WORLD HEALTH ORGANIZATION), indivíduos depressivos têm risco de morte cerca de 1,4 vezes maior do que a população geral, quando comparado a problemas físicos, como câncer, diabetes, e infecção por HIV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

A etiologia do transtorno depressivo consiste na combinação fatores ambientais (estresse) e genéticos (CASPI *et al.*, 2003; KENDLER; GARDNER, 2016, 2010; SAVEANU; NEMEROFF, 2012; SULLIVAN; NEALE; KENDLER, 2000). Na maioria dos casos, os episódios depressivos são precedidos por fatores estressantes, principalmente de origem psicosocial (KENDLER; KARKOWSKI; PRESCOTT, 1999; POST, 1992). Além disso, fatores genéticos

influenciam no desenvolvimento da depressão, tornando os indivíduos mais vulneráveis aos eventos estressantes (CASPI *et al.*, 2003; HABERSTICK *et al.*, 2016; KENDLER.; *et al.*, 2006; KENDLER.; GARDNER, 2016; POST, 1992).

Evidências demonstram que o estresse promove a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), no qual o hipotálamo secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que estimula a produção e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este, por sua vez, faz o córtex da adrenal produzir e secretar glicocorticoides: corticosterona em roedores e cortisol em humanos (GORZALKA; HILL; HILLARD, 2008; HILL, MATTHEW N.; MCEWEN, 2010). A exposição prolongada a níveis elevados, como ocorre na exposição ao estresse crônico, podem induzir disfunções em circuitos límbicos e predispor ao desenvolvimento de distúrbios afetivos (GORZALKA; HILL; HILLARD, 2008).

Além de alterações endócrinas, animais de laboratório expostos a fatores estressantes não controláveis apresentam alterações comportamentais, neurofisiológicas e neuroquímicas, as quais são sensíveis ao tratamento com drogas antidepressivas (YAN *et al.*, 2010). Por essa razão, muitos modelos animais utilizados para estudo da neurobiologia da depressão e identificação de drogas antidepressivas, baseiam-se na avaliação das alterações comportamentais induzidas pela exposição ao estresse e a reversão destas pelo tratamento com drogas antidepressivas (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013; YAN *et al.*, 2010).

1.2 Modelos preditivos de efeitos antidepressivos

Os modelos animais são ferramentas importantes na busca de novos alvos terapêuticos, bem como no estudo da etiologia do transtorno depressivo (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013). A depressão é uma doença caracterizada principalmente por sintomas psicológicos, logo é impossível que um modelo consiga mimetizar os sentimentos humanos em animais (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002). Por essa razão, os modelos animais de depressão utilizam comportamentos e características específicas que possam ser observadas, quantificadas e reproduzidas (DUMAN, 2010).

Um modelo animal de depressão ideal deve apresentar três critérios principais: validade de face, validade de constructo e validade preditiva (SLATTERY; CRYAN, 2012). A validade de face requer que o animal submetido a uma determinada situação experimental apresente comportamentos semelhantes aos sintomas observados em pacientes depressivos, como a anedonia (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013; POLLAK; REY; MONJE, 2010). A validade de constructo consiste na semelhança com a etiologia da doença, ou seja, nos mecanismos neurobiológicos que levam aos sintomas, como a alteração do eixo HPA (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013; DUMAN, 2010; YAN *et al.*, 2010). E por fim, a validade preditiva requer que os tratamentos antidepressivos eficazes na clínica sejam capazes de reverter as alterações comportamentais induzidas pela situação experimental em questão (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013; POLLAK; REY; MONJE, 2010).

Além dos modelos animais, existem também os testes comportamentais. Um modelo animal possui características semelhantes a patologia humana (validade de face), inclusive com aspectos fundamentais de sua patofisiologia (validade de construto), tentando mimetizar o transtorno psiquiátrico (POLLAK; REY; MONJE, 2010). Já o teste providencia um “endpoint”, ou seja, um comportamento ou característica que pode ser mensurada e manipulada geneticamente ou farmacologicamente (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013; YAN *et al.*, 2010). Portanto, os testes geralmente não preenchem adequadamente os critérios de validade de face e construto, mas apresentam boa validade preditiva, como é o caso do teste do nado forçado, que foi empregado neste estudo.

Tabela 1 – Exemplos de modelos animais e testes comportamentais empregados no estudo da neurobiologia da depressão e identificação de novos antidepressivos

Testes preditivos de efeitos antidepressivos	Estressor	Validade	Reproduti-bilidade	Vantagens	Limitações	Referências
Teste do nado forçado	Natação forçada	Preditiva	Alta	Baixo custo, alta confiabilidade, fácil execução, pode ser realizado com ratos e camundongos	Responde ao tratamento agudo com antidepressivos, falha em responder a ISRS, depende da função motora	CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; SLATTERY; CRYAN, 2014, 2012
Teste de suspensão pela cauda	Suspensão	Preditiva	Alta	Baixo custo, alta confiabilidade, fácil execução	Responde ao tratamento agudo com antidepressivos, realizado apenas com camundongos, depende da função motora	CRYAN; MOMBEREAU; VASSOUT, 2005; SLATTERY; CRYAN, 2014
Modelos animais de depressão envolvendo a apresentação de estresse						
Estresse crônico variado	Diferentes estressores	Preditiva, Constructo, Face	Baixa	Responde apenas ao tratamento crônico com antidepressivo, pode ser realizado com ratos e camundongos	Difícil execução e baixa confiabilidade	ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013; SLATTERY; CRYAN, 2014
Privação materna	Privação materna	Preditiva, Constructo, Face	Baixa	Estresse precoce aumenta probabilidade de desenvolver depressão em humanos, déficit de recompensa	Baixa confiabilidade, baixa reprodutibilidade	ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013; SLATTERY; CRYAN, 2014
Desamparo Apreendido	Choques inescapáveis	Preditiva, Constructo, Face	Alta	Não responde ao tratamento agudo, pode ser realizado com ratos e camundongos	Custo moderado, alguns animais não desamparam, restrições éticas em alguns países	ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013; CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; SLATTERY; CRYAN, 2014

1.2.1 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado (*forced swim test*, FST), proposto por Porsolt e colaboradores (1977), tem sido amplamente empregado para a triagem de drogas antidepressivas e seus mecanismos de ação (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002).

O teste consiste em submeter o animal em uma situação inescapável de estresse, a natação forçada. Após um período de atividade vigorosa, o animal fica imóvel, fazendo apenas movimentos necessários para manter a cabeça fora d'água. Os resultados obtidos com esse teste demonstraram que tratamento com antidepressivos diminui o tempo de imobilidade, e que fármacos ansiolíticos ou antipsicóticos não o afetam. A diminuição da imobilidade também pode ser observada em resposta a tratamentos antidepressivos não farmacológicos, como eletrochoque (PORSOLT *et al.*, 1978). Drogas psicoestimulantes, no entanto, podem induzir resultado falso-positivo no modelo ao diminuírem o tempo de imobilidade como consequência do aumento na atividade locomotora. Portanto, a diminuição da imobilidade reflete um efeito tipo-antidepressivo no modelo quando isso ocorre independente de efeitos em testes que avaliam a atividade locomotora, como a exploração no teste do campo aberto (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013; YAN *et al.*, 2010; YIN; GUVEN; DIETIS, 2016). Em conjunto, esses dados suportam a elevada validade preditiva do modelo proposto (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013; YAN *et al.*, 2010).

Dentre as vantagens na utilização do FST estão baixo custo, fácil execução, alta confiabilidade e reprodutibilidade (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013; PARONE *et al.*, 2013; SLATTERY; CRYAN, 2012), e a possibilidade de ser realizado tanto em ratos quanto em camundongos, embora com protocolos experimentais diferentes (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013; SLATTERY; CRYAN, 2012). E sua principal limitação é a de responder ao tratamento agudo com drogas antidepressivas, comprometendo assim sua validade preditiva (DUMAN, 2010; POLLAK; REY; MONJE, 2010; SLATTERY; CRYAN, 2014, 2012; YAN *et al.*, 2010).

1.3 Sistema endocanabinóide e depressão

O sistema endocanabinóide foi descrito apenas na década de 1990, porém as propriedades da *Cannabis sativa* já eram conhecidas a milhares de anos devido ao uso, terapêutico e recreativo (DI MARZO, 2006). No entanto, a investigação sobre esse sistema tornou-se possível apenas a partir de 1964, quando Mechoulam e colaboradores identificaram o principal composto psicoativo da Cannabis, o Δ^9-Tetrahidrocanabidiol (Δ^9-THC) (DI MARZO, 2006; FOWLER, 2015; KANO, 2009).

O sistema endocanabinóide possui dois principais receptores, CB1 (HERKENHAM *et al.*, 1991) e CB2 (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993), ambos acoplados a proteína G (HOWLETT *et al.*, 2002). Os receptores CB1 estão expressos em todo o cérebro (HERKENHAM *et al.*, 1991) e são responsáveis pela maioria dos efeitos comportamentais dos canabinóides (KANO, 2009; SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010). Já os receptores CB2 estão localizados principalmente no sistema imune periférico (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993), apesar de também estarem expressos nos neurônios e nas micróglias (ONAIVI *et al.*, 2006, 2008). Os principais, e mais estudados, agonistas endógenos (endocanabinóides) destes receptores são a aracdonoil etanolamina (anandamida) (DEVANE *et al.*, 1992) e o 2-aracdonoil glicerol (2-AG) (SUGIURA *et al.*, 1995).

Os endocanabinódes são neurotransmissores atípicos, sendo, portanto, sintetizados “sob demanda” e não armazenados em vesículas. Sua síntese ocorre nos neurônios pós-sinápticos, após o influxo de cálcio e ativação das fosfolipases, que convertem os fosfolipídios em endocanabinóides. Em seguida, são liberados e, de maneira retrógrada, ativam os receptores canabinóides, localizados na membrana pré-sináptica. A ativação de CB1 leva a diminuição do influxo de cálcio, reduzindo assim a liberação do neurotransmissor (Fig. 1) (MCLAUGHLIN; HILL; GORZALKA, 2014; MOREIRA. *et al.*, 2015; ROSS *et al.*, 2001). Dessa forma, o sistema endocanabinóide é capaz de modular a neurotransmissão de sinapses tanto inibitórias quanto excitatórias, dependendo da localização do receptor (MOREIRA; LUTZ, 2008). A ação dos endocanabinóides é limitada por sua internalização e pelo catabolismo hidrolítico. As enzimas amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e monoacilglicerol lipase são as principais responsáveis pela hidrólise da

anandamida e 2-AG, respectivamente (Fig. 1) (MCLAUGHLIN; HILL; GORZALKA, 2014; MOREIRA *et al.*, 2015).

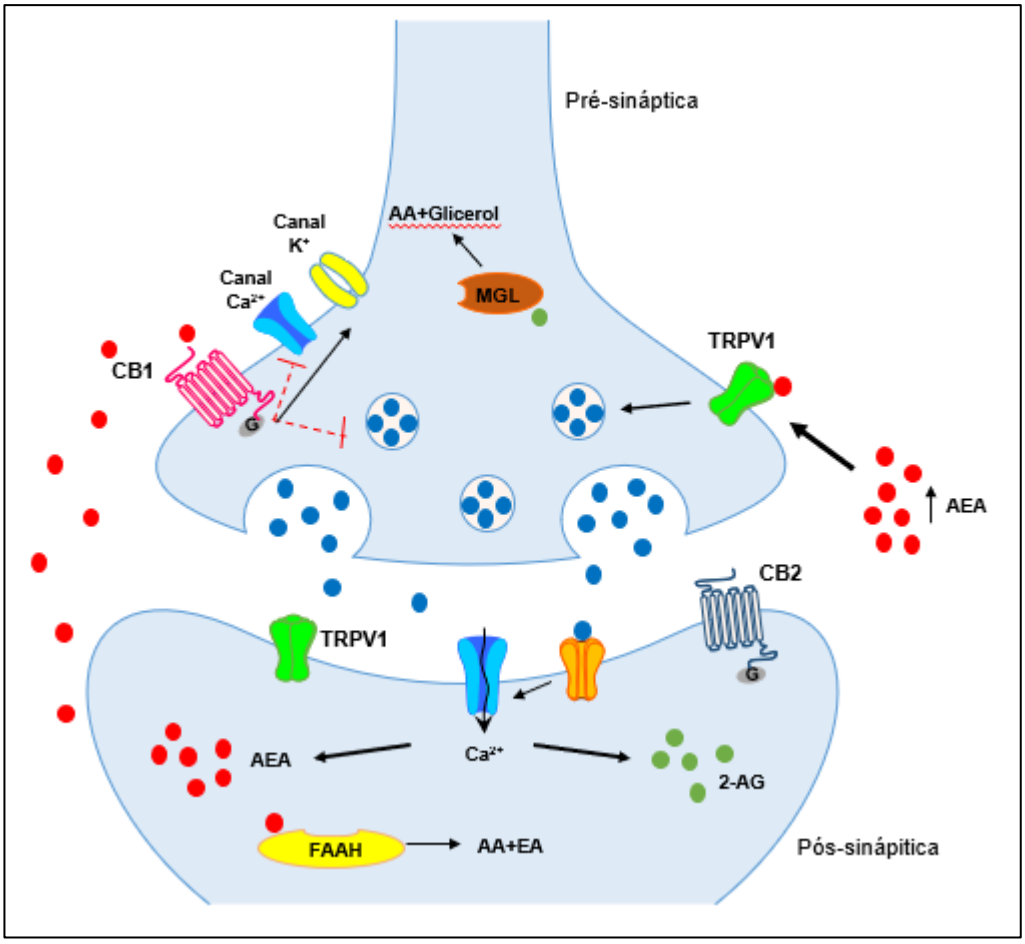

Figura 1 – Modulação do sistema endocanabinóide. A liberação de neurotransmissores, por exemplo glutamato, promove o influxo de cálcio, o qual estimula a produção dos endocanabinóides, anandamida (AEA) e 2-aracdonoil glicerol (2-AG). Em seguida, são liberados e, de maneira retrógrada, ativam os receptores canabinóides, localizados na membrana pré-sináptica. A ativação de CB1 leva a diminuição do influxo de cálcio (Ca^{2+}), ativa canais potássio (K^{+}), e reduz a liberação do neurotransmissor. Em altas concentrações, a anandamida também é capaz de ativar os receptores vanilóides de potencial transitório tipo-1 (TRPV1), o que promove o influxo de Ca^{2+} e facilita a liberação de neurotransmissores. A ação dos endocanabinóides é limitada por sua internalização e pelo catabolismo hidrolítico. As enzimas amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH), e monoacilglicerol lipase (MGL) são as principais responsáveis pela hidrólise da anandamida e 2-AG, respectivamente. A anandamida é principalmente hidrolisada em ácido aracdônico (AA) e etanolamina (EA), e o 2-AG em ácido aracdônico e glicerol.

A primeira evidência clínica da relação entre o sistema endocanabinóide e os transtornos emocionais ocorreu em 2007, em um estudo publicado na revista Lancet, no qual Christensen e colaboradores (2007) testaram uma nova droga “anti-obesidade”, o Rimonabanto, um antagonista/agonista inverso dos receptores CB1. Os pesquisadores observaram que pacientes tratados com esta droga tinham mais chances de interromperem o tratamento devido ao desenvolvimento do transtorno depressivo, ansiedade e também por apresentarem maior risco de suicídio (CHRISTENSEN *et al.*, 2007). Topol e colaboradores (2010) precisaram reduzir o período de triagem devido aos graves efeitos colaterais psiquiátricos do Rimonabanto, que neste caso, resultou em 4 suicídios.

Desde de então, dados da literatura têm corroborado a íntima relação do sistema endocanabinóide com a neurobiologia da depressão. Em estudos pré-clínicos, roedores tratados com agonista de receptores CB1 apresentaram um efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado (HILL, MATTHEW N.; GORZALKA, 2005; MCLAUGHLIN, RYAN J. *et al.*, 2007). Além disso, a administração de inibidores da enzima FAAH, ou a ausência da mesma (BAMBICO, FRANCIS RODRIGUEZ *et al.*, 2010; GOBBI *et al.*, 2005), também promove efeito tipo-antidepressivo, efeito este revertido pela administração de um antagonista de receptores CB1 (ADAMCZYK *et al.*, 2008; BORTOLATO *et al.*, 2007; GOBBI *et al.*, 2005; HILL, MATTHEW N.; GORZALKA, 2005). Por outro lado, a deleção da expressão de CB1 acentua a redução da ingestão de sacarose em animais expostos ao estresse crônico moderado, sugerindo um aumento da susceptibilidade destes animais ao desenvolvimento de consequências comportamentais do estresse (MARTIN *et al.*, 2002). Em conjunto, esses dados sugerem que a facilitação do sistema endocanabinóide e consequente ativação de receptores CB1 promove adaptação ao estresse e efeito tipo-antidepressivo em modelos animais.

Nesse contexto, é possível esperar que a depressão esteja associada a prejuízos nessa via de neurotransmissão. De fato, estudos realizados em humanos demonstraram que o polimorfismo de um único nucleotídeo no receptor CB1 aumenta a vulnerabilidade para o desenvolvimento da depressão e o risco de resistência ao tratamento antidepressivo (DOMSCHKE *et al.*, 2008; JUHASZ

et al., 2009). Além disso, pessoas diagnosticadas com depressão maior, apresentam uma redução nos níveis circulantes de endocanabinóides (HILL *et al.*, 2010, 2012), sugerindo assim que a deficiência na sinalização endocanabinóide pode levar ao desenvolvimento da depressão (HILL, MATTHEW N. *et al.*, 2009). Para revisão detalhada sobre o assunto, ver MORENA *et al.*, 2016.

A anandamida, além de se ativar os receptores CB1, também é capaz de se ligar e ativar os receptores vanilóides de potencial transitório tipo-1 (TRPV1) (ROSS, 2003; STAROWICZ; NIGAM; DI MARZO, 2007). Estudos indicam que esse receptor também está envolvido com respostas comportamentais ao estresse, conforme descrito a seguir.

1.3.1 Receptores vanilóides de potencial transitório tipo-1 (TRPV1)

Os receptores vanilóides de potencial transitório tipo-1 (TRPV1) são canais iônicos não seletivos pertencentes a família dos receptores de potencial transitório (STAROWICZ; NIGAM; DI MARZO, 2007; TÓTH; BLUMBERG; BOCZÁN, 2009) e estão presentes em diversas regiões do sistema nervoso central de roedores, como hipocampo, córtex, cerebelo, bulbo olfatório, entre outras (CRISTINO *et al.*, 2006; TÓTH *et al.*, 2005).

A anandamida é agonista pleno nos receptores TRPV1, e sua ligação promove o influxo de cálcio e consequente despolarização da célula em que se encontra; sendo assim ativação de receptores TRPV1 parece promover efeitos opostos aos de CB1, geralmente facilitando a liberação de neurotransmissores (Fig. 1) (ROSS, 2003; STAROWICZ; NIGAM; DI MARZO, 2007; TÓTH; BLUMBERG; BOCZÁN, 2009).

Evidências em estudos pré-clínicos demonstram que o tratamento com agonista de receptores TRPV1 promoveu um efeito tipo-depressivo no teste do nado forçado (ABDELHAMID *et al.*, 2014), enquanto animais tratados com um antagonista destes receptores apresentaram efeito tipo-antidepressivo no mesmo teste (NAVARRIA *et al.*, 2014; SARTIM; MOREIRA; JOCA, 2016; SOCAŁA; WLAŹ, 2016). Efeito semelhante ao dos antagonistas foi observado em camundongos *knockouts* para TRPV1 (YOU *et al.*, 2012). Portanto, a

ativação de TRPV1 parece prejudicar a adaptação ao estresse inescapável, enquanto a ativação de receptores CB1 parece induzir efeitos contrários.

Em 2008, Rubino e colaboradores relataram evidências importantes sobre a relação da anandamida com os receptores CB1 e TRPV1. Os pesquisadores administraram um análogo da anandamida, a meta-anandamida, no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado, e observaram que, na menor dose testada (0,1µg), a droga promoveu um efeito tipo-ansiolítico, o qual foi mediado por receptores CB1, pois foi bloqueado pelo pré-tratamento com o antagonista AM251. Já na maior dose administrada (10µg), foi observado um efeito tipo-ansiogênico, o qual foi bloqueado pelo antagonista TRPV1 (capsazepina) (RUBINO *et al.*, 2008). Para explicar esses resultados, foi sugerido que em baixas concentrações a anandamida interage preferencialmente com CB1, promovendo assim efeito tipo-ansiolítico; já em altas concentrações, ativa também TRPV1, promovendo efeito ansiogênico (MOREIRA *et al.*, 2012). De maneira semelhante, dados ainda não publicados do laboratório demonstraram que a administração de anandamida no córtex pré-frontal medial (CPFm) promoveu efeito tipo-antidepressivo em menores doses, o qual foi sensível ao bloqueio com antagonista de receptores CB1; enquanto o efeito da anandamida não foi observado em doses maiores devido à ativação de receptores TRPV1. Portanto, parece haver um equilíbrio fino entre a ativação de CB1 e TRPV1 pela anandamida, durante situações de estresse, a fim de favorecer respostas de adaptação. No entanto, níveis muito baixos de anandamida, com insuficiente ativação de CB1, ou níveis excessivamente elevados desse neurotransmissor, com predomínio de ativação de TRPV1, poderiam prejudicar a adaptação ao estresse e facilitar o desenvolvimento de consequências comportamentais. Isso explicaria a curva dose-resposta em forma de sino (ou U invertido), observada após administração de doses crescentes de inibidores da FAAH ou da própria anandamida, em animais expostos a diferentes situações experimentais (BORTOLATO *et al.*, 2006; MOREIRA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2009; RUBINO *et al.*, 2008).

Sendo assim, uma droga capaz de aumentar os níveis endógenos de anandamida, inibindo a FAAH, e ao mesmo tempo antagonizar TRPV1,

provavelmente favoreceria a resposta adaptativa ao estresse e induziria efeitos antidepressivos. Nesse contexto, a droga aracdonoil serotonina, uma droga que possui ambos os mecanismos (BISOGNO *et al.*, 1998; MAIONE *et al.*, 2007), apresenta um perfil farmacológico interessante para ser estudada com potencial fármaco antidepressivo, tendo sido objeto de estudo no presente trabalho.

1.3.2 Aracdonoil serotonina (AA-5HT)

Aracdonoil serotonina (AA-5HT) foi descrita pela primeira vez em 1998, por Bisogno e colaboradores, durante um *screening* de novas moléculas com a capacidade de inibir a FAAH. Naquele momento, o AA-5HT, derivado sintético do ácido aracdônico, foi descrito apenas como um potente inibidor da FAAH (BISOGNO *et al.*, 1998; FOWLER *et al.*, 2003), que não ativa receptores CB1 (BISOGNO *et al.*, 1998). Apenas em 2007 seu segundo mecanismo de ação foi descrito: antagonista competitivo dos receptores TRPV1 (MAIONE *et al.*, 2007).

A administração sistêmica, aguda e repetida, de AA-5HT promove o aumento nos níveis dos endocanabinóides, anandamida e 2-AG (DE LAGO *et al.*, 2005; MICALE *et al.*, 2009), aumento este que permanece por até 12h após a última administração (DE LAGO *et al.*, 2005), demonstrando assim sua eficácia em inibir a FAAH.

E ainda, dados na literatura demonstram que o AA-5HT é capaz de produzir efeito analgésico, anti-inflamatório, anticonvulsivante, tipo-antidepressivo, tipo-ansiolítico e tipo-antiaversivo; efeitos estes mediados pela ativação dos receptores CB1 (COSTA *et al.*, 2010; GOBIRA *et al.*, 2017; JOHN; CURRIE, 2012; KIRKEDAL *et al.*, 2017; MAIONE *et al.*, 2007; MICALE *et al.*, 2009; NAVARRIA *et al.*, 2014; ORTAR *et al.*, 2007; SARTIM; MOREIRA; JOCA, 2016; VILELA *et al.*, 2014).

A administração de AA-5HT no CPFm de ratos promoveu efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado, efeito este revertido pelo bloqueio dos receptores CB1 (KIRKEDAL *et al.*, 2017; SARTIM; MOREIRA; JOCA, 2016), e mimetizado pela coadministração, em doses subefetivas, de um inibidor da FAAH e um antagonista TRPV1 (SARTIM; MOREIRA; JOCA, 2016). Sartim e colaboradores (2016) sugeriram, ainda, que o efeito de AA-5HT pode ser devido

tanto pela inibição da hidrólise da anandamida, com posterior ativação de CB1, como também devido ao bloqueio de TRPV1, já que o efeito promovido pelo antagonismo de TRPV1 não foi alterado pelo bloqueio de CB1. Fogaça e colaboradores (2012) demonstraram, por imunohistoquímica, que os receptores CB1 e TRPV1 estão estreitamente expressos na mesma região do CPFm pré-límbico, localizados pré e pós-sinapticamente, respectivamente; proporcionando assim um suporte anatômico para o mecanismo de ação de AA-5HT.

O efeito tipo-antidepressivo de AA-5HT no teste do nado forçado também foi demonstrado quando administrado sistemicamente. Entretanto, este efeito foi observado apenas em ratos Wistar estressados (submetidos a 4h de estresse de restrição) e os mecanismos de ação da droga não foram explorados (NAVARRIA *et al.*, 2014). Além disso, não existe a informação de que, sistemicamente, tanto a inibição da FAAH quanto o bloqueio de TRPV1 são importantes para este efeito, ou seja, não se sabe ainda se o mecanismo sistêmico é semelhante ao que ocorre no córtex pré-frontal medial. Portanto, há necessidade de confirmação do potencial efeito antidepressivo da AA-5HT em testes preditivos de efeito antidepressivo, bem como estudo dos mecanismos envolvidos nos seus efeitos comportamentais.

1.4 Hipótese

A hipótese do presente trabalho é que a administração sistêmica de AA-5HT promove efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos ao teste do nado forçado; e ainda, que este efeito está relacionado com a ativação dos receptores CB1 e com o bloqueio dos receptores TRPV1.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o potencial efeito tipo-antidepressivo da aracdonoil serotonina (AA-5HT), e ainda, a possível participação de receptores TRPV1 e CB1 nesse efeito.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar se a administração sistêmica de AA-5HT em camundongos submetidos ao teste do nado forçado induz efeito tipo-antidepressivo.
- Avaliar a participação de receptores CB1 nos efeitos induzidos pela administração de AA-5HT em camundongos submetidos ao teste do nado forçado.
- Avaliar se a administração sistêmica de inibidor da enzima FAAH (URB597) e/ou de antagonista de receptores TRPV1 (SB366791) induziria efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos ao teste do nado forçado.
- Avaliar se a coadministração de doses subefetivas ou equipotentes de URB597 e SB366791 induziriam efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos ao teste do nado forçado.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, pesando entre 25 e 30 g (7-8 semanas), provenientes do Biotério Central da USP, campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em caixas de acrílico (28x18x11cm), com 4 animais por caixa, por pelo menos uma semana no Biotério da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP (FCFRP), em condições controladas: temperatura de 24±1°C, ciclo de luz claro escuro de 12 horas, sem privação de alimento e água, exceto durante a realização do experimento. Todos os esforços foram feitos para amenizar o sofrimento dos animais e a manipulação destes foi feita conforme os protocolos experimentais adotando as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto-USP (16.1.261.60.0).

3.2 Drogas

As drogas utilizadas foram:

1) Aracdonoil serotonina (AA-5HT; Tocris, EUA), antagonista de receptores TRPV1 e inibidor da enzima FAAH, nas doses de 0,1mg/kg, 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg (VILELA *et al.*, 2014). O veículo utilizado para diluí-la foi 5% de etanol, 5% de dimetil sulfóxido (DMSO) e 90% de salina 0,9%. Para os experimentos 1 e 7 (Fig. 10), foi utilizado AA-5HT diluído em uma solução mãe de 10mg/kg, a qual foi armazenada protegida da luz a -20°C. Já para os experimentos 7 (Fig. 11 e 12) e 8, foi utilizado AA-5HT (10mg/ml) aliquotado e armazenado protegido da luz a -20°C. As diluições foram realizadas no dia de cada experimento.

2) SB366791 (Tocris, EUA), antagonista de receptores TRPV1, nas doses de 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg, e 3,0 mg/kg (VILELA *et al.*, 2014). O veículo utilizado para diluí-la foi 5% de etanol, 5% de DMSO e 90% de salina 0,9%. Para o experimento 2, foi utilizado SB366791 diluído em uma solução mãe

de 10mg/kg, a qual foi armazenada protegida da luz a -20°C. Já para os experimentos 4 e 5, foi utilizado SB366791 diluído em solução mãe de 3mg/kg, a qual foi aliquotada e armazenada protegida da luz a -20°C. As diluições foram realizadas no dia de cada experimento.

3) URB597 (Tocris e Cayman, EUA), inibidor da enzima FAAH, nas doses de 0,03mg/kg, 0,1mg/kg e 0,3mg/kg, 1mg/kg e 3mg/kg (GOBBI *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2008). O veículo utilizado para diluí-la foi 5% de etanol, 5% de DMSO e 90% de salina 0,9%. Para o experimento 3 (Fig. 5), foi utilizado URB597 (Tocris, EUA) diluído em uma solução mãe de 10mg/kg, a qual foi armazenada protegida da luz a -20°C. Já para os experimentos 3 (Fig. 6), 4 e 5 foi utilizado URB597 (Cayman, EUA) diluído em solução mãe de 10mg/kg, a qual foi aliquotada e armazenada protegida da luz a -20°C. As diluições foram realizadas no dia de cada experimento.

4) AM251 (Tocris, EUA), antagonista/agonista inverso de receptores CB1, nas doses de 1mg/kg e 3mg/kg (VILELA *et al.*, 2014). O veículo utilizado para diluí-la foi 10% de etanol, 10% de DMSO e 80% de salina 0,9%. Para os experimentos 6 e 7 (Fig. 10), foi utilizado AM251 diluído em uma solução mãe de 10mg/kg, a qual foi armazenada protegida da luz a -20°C. Já para o experimento 7 (Fig. 12), o AM251 foi diluído no dia dos experimentos. As diluições foram realizadas no dia de cada experimento.

3.3 Procedimentos Experimentais

3.3.1 Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto (*open field test*, OFT) consiste na exposição individual dos animais a uma arena circular. Para este experimento foram necessários uma arena circular de acrílico transparente (altura: 30cm, diâmetro: 30cm) com o assoalho marcado com 12 quadrantes, uma câmera de vídeo e álcool 70% (para limpeza da arena). Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena, onde seu comportamento foi filmado durante 6 minutos. Os

últimos 4 minutos de gravação foram analisados e o número de quadrantes cruzados foi quantificado por um experimentador cego às condições experimentais. Ao final desse tempo, o animal era removido da arena e retornava à sua caixa de origem. A arena era limpa com solução de álcool 70% entre cada animal.

O número de cruzamentos serviu como medida da atividade locomotora de cada animal e dessa forma, o teste do campo aberto foi utilizado para verificar possíveis efeitos locomotores induzidos pelas drogas. Tal teste é importante porque o parâmetro avaliado no Teste do Nado Forçado (imobilidade) pode ser influenciado pela atividade locomotora dos animais, evitando assim, resultados falso-positivos (SLATTERY; CRYAN, 2012).

3.3.2 Teste do Nado Forçado

O teste do nado forçado (*forced swim test*, FST) consiste em um teste amplamente utilizado para a detecção de alterações comportamentais induzidas por drogas antidepressivas. Para a realização deste teste foram necessários um cilindro transparente (altura: 30cm, diâmetro: 20cm), uma câmera de vídeo, um termômetro e um cronômetro. Os procedimentos utilizados no presente trabalho foram similares àqueles descritos por Porsolt e colaboradores (1977). Os animais foram colocados para nadar, individualmente, no cilindro contendo 10 cm de água, com temperatura controlada de 24±1ºC, e seu comportamento foi filmado durante 6 minutos. Os últimos 4 minutos foram analisados e foi mensurado o tempo total de imobilidade (o animal permanece parado, realizando apenas pequenos movimentos necessários para a flutuação), por um experimentador cego às diferentes condições experimentais.

3.4 Delineamento Experimental

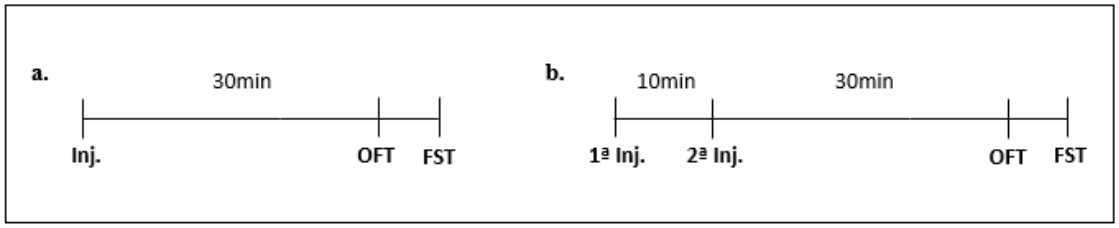

Fig. 2. Desenho experimental. a) Desenho relacionado aos experimentos 1, 2, 3 e 6; b) Desenho relacionado aos experimentos 4, 5, 7 e 8. Inj: injeção, OFT: teste do campo aberto, FST: teste do nado forçado.

Experimento 1 - efeitos da administração sistêmica de AA-5HT em camundongos submetidos aos testes do campo aberto e do nado forçado.

Grupos independentes de camundongos receberam, através de administração intraperitoneal (i.p.), AA-5HT nas doses de 0,1mg/kg, 0,3 mg/kg, e 1,0 mg/kg ou veículo e, após 30 minutos, foram submetidos ao teste do campo aberto (OFT). Imediatamente após ao OFT, os animais foram expostos ao teste do nado forçado (FST) (Fig. 2a). Esse experimento teve por objetivo avaliar se a AA-5HT é capaz de alterar o comportamento dos animais submetidos aos FST, sem promover alteração na atividade locomotora dos animais.

Experimento 2 - efeitos da administração de SB366791 (antagonista de TRPV1) em camundongos submetidos aos testes do campo aberto e do nado forçado.

Grupos independentes de camundongos receberam, através de administração i.p., SB366791 nas doses 0,03mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg e 3mg/kg ou veículo e, após 30 minutos, foram submetidos ao OFT. Imediatamente após o OFT, o animal foi submetido ao FST (Fig. 2a). O objetivo desse experimento foi observar se o antagonista de receptores TRPV1 SB366791 seria capaz de alterar o comportamento dos animais no teste do nado forçado, sem promover alteração na atividade locomotora.

Experimento 3 - efeitos da administração de URB597 (inibidor da FAAH) em camundongos submetidos aos testes do campo aberto e do nado forçado.

Grupos independentes de camundongos receberam, através de administração i.p., URB597 nas doses de 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg e 3mg/kg ou veículo e, após 30 minutos, foram submetidos ao OFT. Imediatamente após o OFT, o animal foi submetido ao FST (Fig. 2a). O objetivo desse experimento foi observar se a inibição da enzima FAAH, através da administração de URB597, seria capaz de alterar o comportamento dos animais no teste do nado forçado e escolher a dose subefetiva para as etapas subsequentes do trabalho.

Experimento 4 – efeitos da coadministração de URB597 e SB366791, em doses equipotentes ao AA-5HT em inibir a FAAH e TRPV1, nos camundongos submetidos aos testes do campo aberto e do nado forçado.

Dados *in vitro* demonstraram que a concentração necessária de AA-5HT para inibir cinquenta por cento (IC50) da FAAH é de 5µM (BISOGNO *et al.*, 1998), e para bloquear 50% de TRPV1 é 37-40nM (MAIONE *et al.*, 2007). No experimento 1 (Fig. 3a) foi demonstrado que a dose de 0,3mg/kg é capaz de promover efeito tipo-antidepressivo, sendo assim, as doses equipotentes do inibidor da FAAH e antagonista TRPV1 foram obtidas a partir dela. Dessa forma, a partir da IC50 do AA-5HT para FAAH e TRPV1, foram calculadas as doses equipotentes de URB597 (0,0001mg/kg) e SB366791 (0,045mg/kg), respectivamente (GUNTHORPE *et al.*, 2004; KACZOCHA *et al.*, 2006).

Camundongos receberam, através de administração i.p., uma primeira injeção de veículo ou SB366791 (0,045mg/kg), seguida da segunda injeção, 10 minutos depois, de URB597 (0,0001mg/kg) ou veículo. Após 30 minutos, os animais foram submetidos ao OFT. Imediatamente após o OFT, o animal foi submetido ao FST (Fig. 2b). Esse experimento teve por objetivo avaliar se a coadministração das drogas URB597 e SB366791, em doses equipotentes em inibir FAAH e TRV1, quando comparadas à dose efetiva da AA-5HT, promoveria efeito antidepressivo em animais submetidos ao FST, independente de alterações locomotoras.

Experimento 5 – efeitos da coadministração de URB597 e de SB366791, em doses subefetivas, a camundongos submetidos aos testes do campo aberto e do nado forçado.

Camundongos receberam, através de administração i.p., URB597 (3mg/kg) ou veículo, seguido de veículo ou SB366791 (3mg/kg) e, após 30 minutos, foram submetidos ao OFT. Imediatamente após o OFT, o animal foi submetido ao FST (Fig. 2b). Esse experimento teve por objetivo avaliar se a coadministração de doses subefetivas de URB597 e SB366791 efeito tipo-antidepressivo no FST, sem alterações no teste do campo aberto.

Experimento 6 - efeitos da administração de AM251 (antagonista CB1) em camundongos submetidos aos testes do campo aberto e do nado forçado.

Grupos independentes de camundongos receberam, através de administração intraperitoneal (i.p.), AM251 nas doses de 1 mg/kg e 3 mg/kg ou veículo e, após 30 minutos, foram submetidos ao OFT. Imediatamente após o OFT, o animal foi submetido ao FST (Fig. 2a). O objetivo desse experimento foi encontrar uma dose do antagonista de receptor CB1 (AM251) que não induza efeito *per se*, para ser utilizada no próximo experimento.

Experimento 7 - efeitos da pré-administração de AM251, seguida por AA-5HT em camundongos submetidos ao teste do campo aberto e nado forçado.

Grupos independentes de camundongos receberam, através de administração intraperitoneal (i.p.), AM251 (3mg/kg) ou veículo, seguida da administração (10 minutos) de veículo ou AA-5HT (0,3mg/kg). Após 30 minutos, os animais foram submetidos ao OFT e, imediatamente após, ao FST (Fig. 2b). O objetivo desse experimento foi verificar a participação de receptores CB1 no efeito comportamental induzido por AA-5HT.

Experimento 8 – efeitos da AA-5HT, com pré-tratamento, em camundongos submetidos ao teste do campo aberto e nado forçado.

Camundongos receberam, através de administração i.p., veículo utilizado para diluir AM251 (veículo AM) ou salina, seguido de veículo utilizado para diluir AA-5HT (veículo AA) ou AA-5HT (0,3mg/kg) e, após 30 minutos, foram submetidos ao OFT e, imediatamente após, ao FST (Fig. 2b). Esse experimento teve por objetivo verificar se o veículo AM poderia interferir no efeito tipo-antidepressivo de AA-5HT.

3.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism (versão 5.01, GraphPad Software, San Diego Califórnia, EUA). Os resultados comportamentais dos testes do nado forçado e do campo aberto com apenas uma administração foram analisados por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. Já nos experimentos que havia combinação de drogas foi utilizado ANOVA de duas vias (2 fatores: primeira e segunda injeção) seguida de pós-teste de Bonferroni, com exceção do experimento 8, o qual foi analisado por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Turkey, por não preencher critérios para a ANOVA de duas vias. As diferenças com $p<0,05$ foram consideradas significativas.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 - Experimento 1: efeitos da administração sistêmica de AA-5HT em camundongos submetidos aos testes do campo aberto e do nado forçado.

A administração sistêmica de AA-5HT, na dose de 0,3mg/kg, diminuiu significativamente o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado ($F_{3,34}$= 2,793, $p<0.05$; Fig. 3a), sem alterar a atividade locomotora ($F_{3,34}$=0,2785, $p>0.05$; Fig. 3b), mostrando assim um efeito tipo-antidepressivo desta droga.

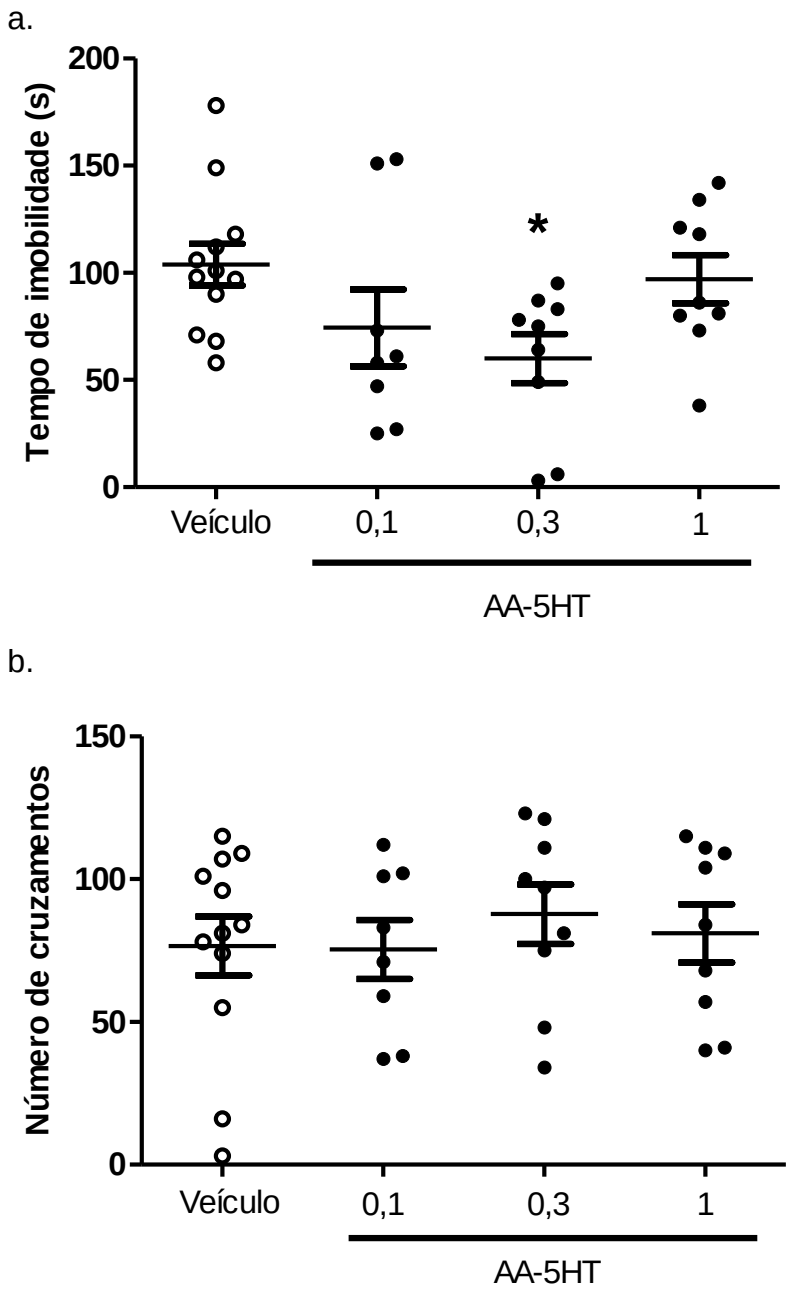

Fig. 3. Efeito da administração sistêmica de AA-5HT, em animais submetidos aos testes do nado forçado (a) e do campo aberto (b). Dados representam média ± erro padrão (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett**,** ***p<0,05; n= 8-12 por grupo). Doses expressas em mg/kg; tempo de imobilidade expresso em segundos.

4.2 - Experimento 2: efeitos da administração de SB366791 (antagonista de TRPV1) em camundongos submetidos aos testes do campo aberto e do nado forçado.

Não houve diferença entre os tratamentos sobre tempo de imobilidade ($F_{5,53}$=0,09806, $p>0.05$; Fig. 4a). Bem como, o tratamento não alterou o número de cruzamentos quando comparados aos animais controle ($F_{5,53}$=2,320, $p>0.05$; Fig. 4b).

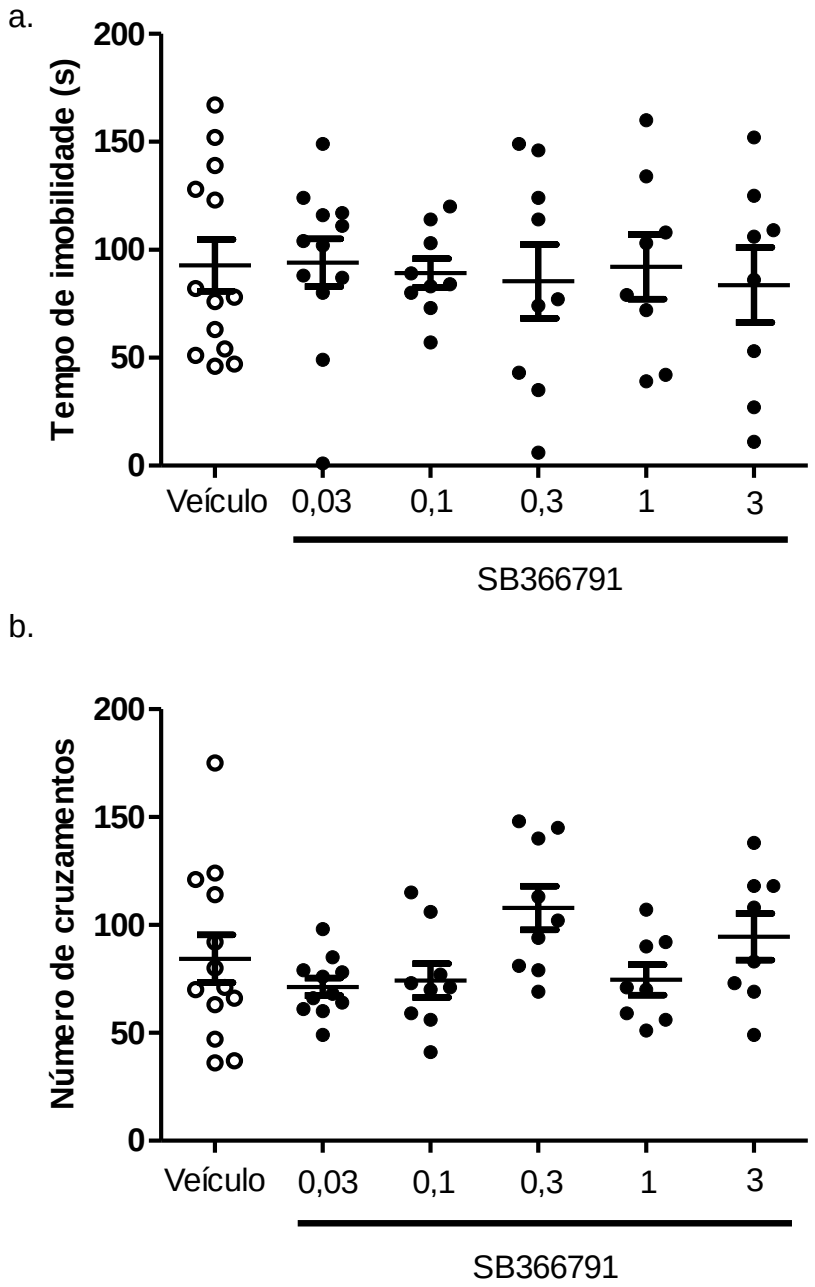

Fig. 4. Efeito da administração sistêmica de SB366791 em animais submetidos aos testes do nado forçado (a) e do campo aberto (b). Os dados representam média ± erro padrão (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett, p>0,05; n= 8-13 por grupo). Doses expressas em mg/kg, tempo de imobilidade expresso em segundos.

4.3 - Experimento 3 - efeitos da administração de URB597 (inibidor da FAAH) em camundongos submetidos aos testes do campo aberto e nado forçado.

Os animais tratados com URB597 não apresentaram diferença significativa no tempo de imobilidade quando comparados aos animais controle ($F_{4,40}$=3,442, $p>0.05$; Fig. 5a). O tratamento com o inibidor da FAAH também não interferiu na atividade locomotora ($F_{4,41}$= 0,8632, $p>0.05$; Fig. 5b).

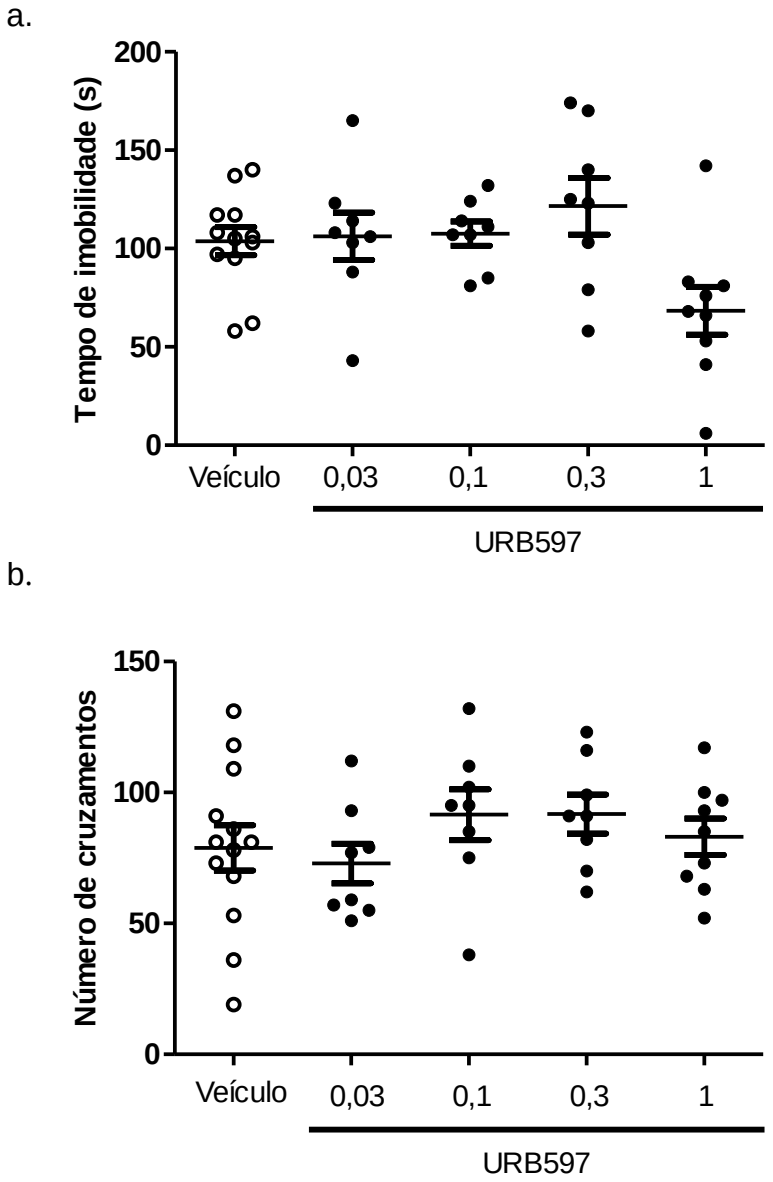

Fig. 5. Efeito da administração sistêmica de URB597 em animais submetidos aos testes do nado forçado (a) e do campo aberto (b). O tratamento com URB597 não induziu efeito no FST, bem como não interferiu na atividade locomotora. Os dados representam média ± erro padrão (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett, p>0,05; n= 8-13 por grupo). Doses expressas em mg/kg; tempo de imobilidade expresso em segundos.

Para avaliar se o efeito do URB597 poderia ser observado em doses maiores, uma vez que a dose de 1,0 mg/kg reduziu o tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle individualmente (Fig. 5a, t=2,639), o experimento 3 foi repetido. Novamente, o tratamento com URB597 não alterou o tempo de imobilidade ($F_{3,28}$= 0,6420, p>0,05; Fig. 6a), bem como não interferiu na atividade locomotora quando comparados ao grupo veículo ($F_{3,28}$=1,934, p>0,05; Fig. 6b).

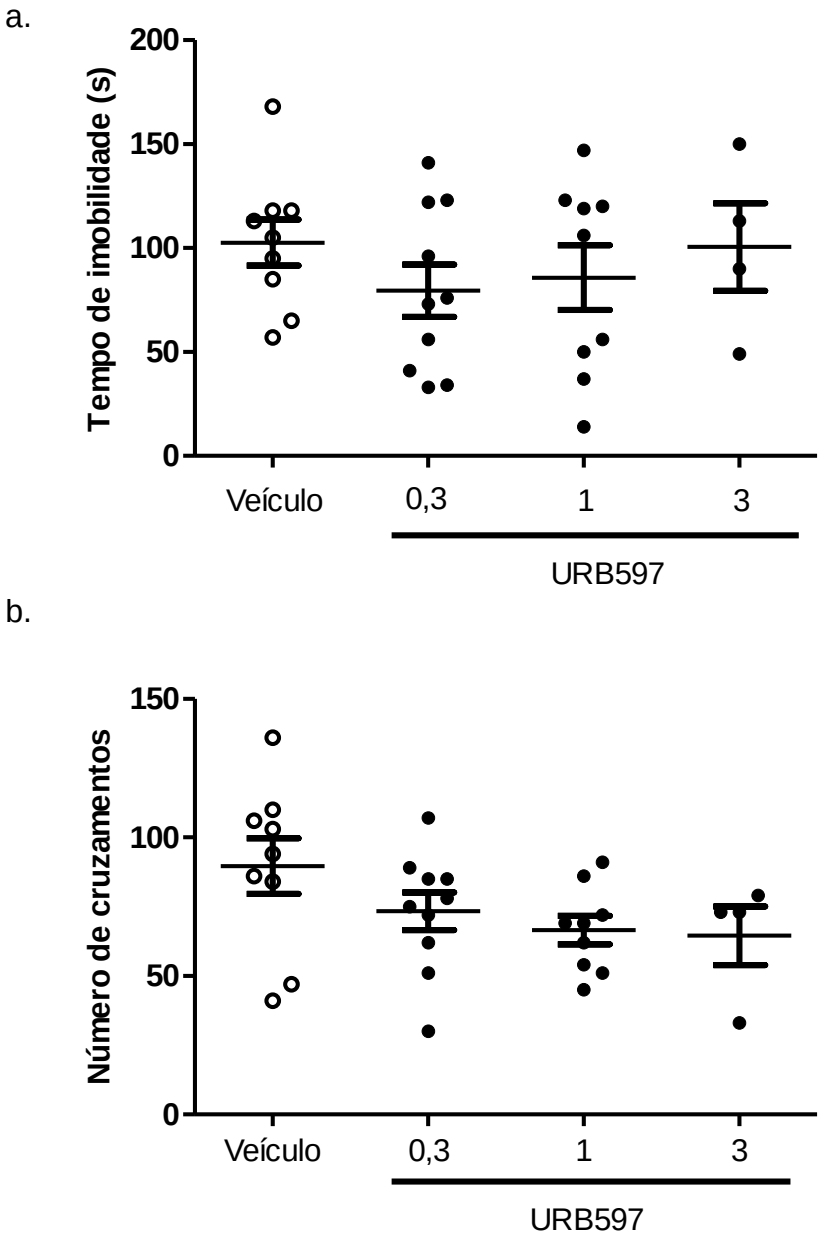

Fig. 6. Efeito da administração sistêmica de URB597 em animais submetidos aos testes do nado forçado (a) e do campo aberto (b), em novo experimento. O tratamento com URB597 não induziu efeito no tempo de imobilidade durante o FST, bem como não interferiu na atividade locomotora. Os dados representam média ± erro padrão (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett, p>0,05; n= 4-10 por grupo). Doses expressas em mg/kg; tempo de imobilidade expresso em segundos.

4.4 - Experimento 4 - efeitos da coadministração de URB597 e SB366791, em doses equipotentes ao AA-5HT em inibir a FAAH e TRPV1, respectivamente, nos camundongos submetidos aos testes do campo aberto e nado forçado.

A coadministração sistêmica de SB366791 e URB597 em doses equipotentes ao AA-5HT não promoveu efeito tipo-antidepressivo no FST. Conforme demonstrado na Fig. 7a, não houve efeito significativo da primeira injeção ($F_{3,26}$= 0,1452, $p>0.05$), nem da segunda ($F_{3,26}$= 0,2005, $p>0.05$) ou interação entre as duas injeções ($F_{3,26}$= 2,051, $p>0.05$), indicando que não houve efeito de nenhum dos tratamentos isoladamente ou em associação. E no OFT, a coadministração também não interferiu na atividade locomotora dos animais, como pode ser observado na Fig. 7b, não houve efeito significativo da primeira injeção ($F_{3,26}$= 1,418, $p>0.05$), nem da segunda ($F_{3,26}$= 0,3759, $p>0.05$) ou interação entre as duas injeções ($F_{3,26}$= 0,1382, $p>0.05$).

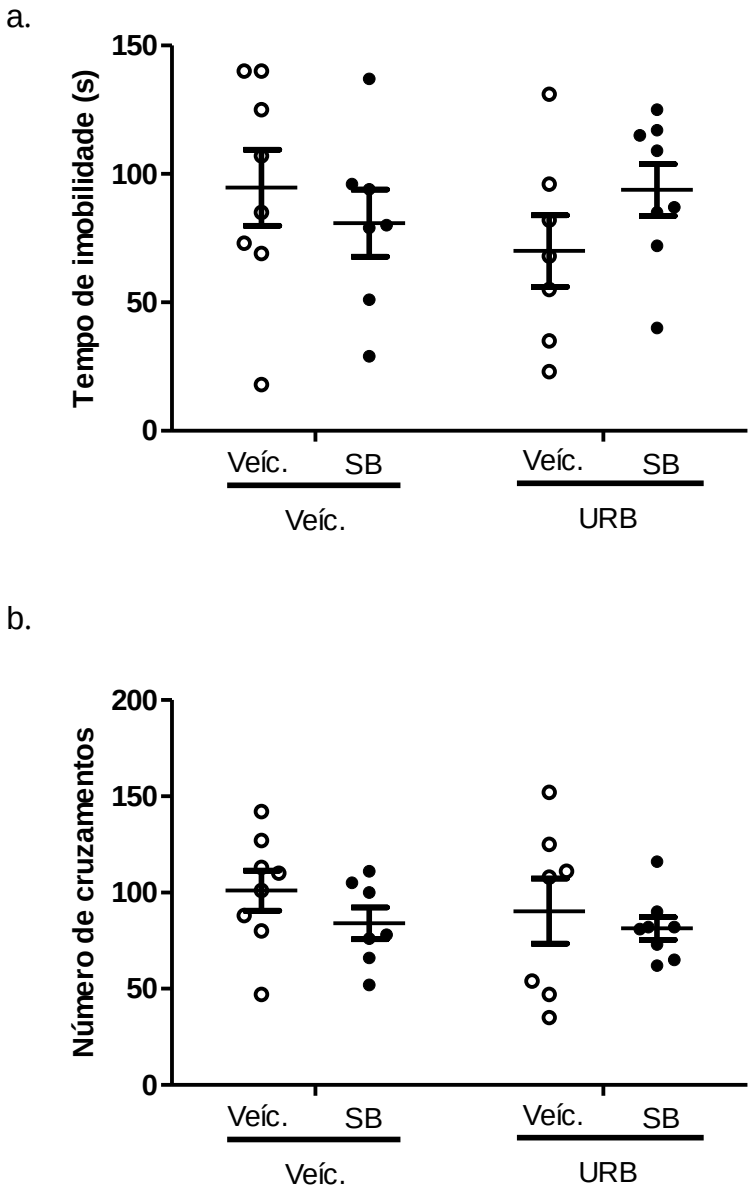

Fig. 7. Efeito da coadministração sistêmica de SB366791 e URB597, em doses equipotentes a AA-5HT, em animais submetidos aos testes do nado forçado (a) e do campo aberto (b). Os tratamentos com SB366791 e URB597, isoladamente ou em combinação, não induziram efeito no tempo de imobilidade, bem como não interferiu no número de cruzamentos. SB: SB366797 (0,045mg/kg), URB: URB597 (0,0001mg/kg). Os dados representam média ± erro padrão (ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, p>0,05; n= 7-8 por grupo). Tempo de imobilidade expresso em segundos.

4.5 - Experimento 5 - efeitos da coadministração de URB597 e SB366791, em doses subefetivas, nos camundongos submetidos aos testes do campo aberto e nado forçado.

A coadministração sistêmica de SB366791 e URB597 em doses subefetivas também não promoveu efeito tipo-antidepressivo no FST. Conforme demonstrado na Fig. 8a, não houve efeito significativo da primeira injeção ($F_{3,44}$= 0,1471, $p>0.05$), nem da segunda ($F_{3,44}$= 0,6428, $p>0.05$) ou interação entre as duas injeções ($F_{3,44}$= 0,1514, $p>0.05$), indicando que não houve efeito de nenhum dos tratamentos isoladamente ou em associação. No OFT, a coadministração também não interferiu na atividade locomotora dos animais, como pode ser observado na Fig. 8b, não houve efeito significativo da primeira injeção ($F_{3,44}$= 3,827, $p>0.05$), nem da segunda ($F_{3,44}$= 2,294, $p>0.05$) ou interação entre as duas injeções ($F_{3,44}$= 0,9454, $p>0.05$).

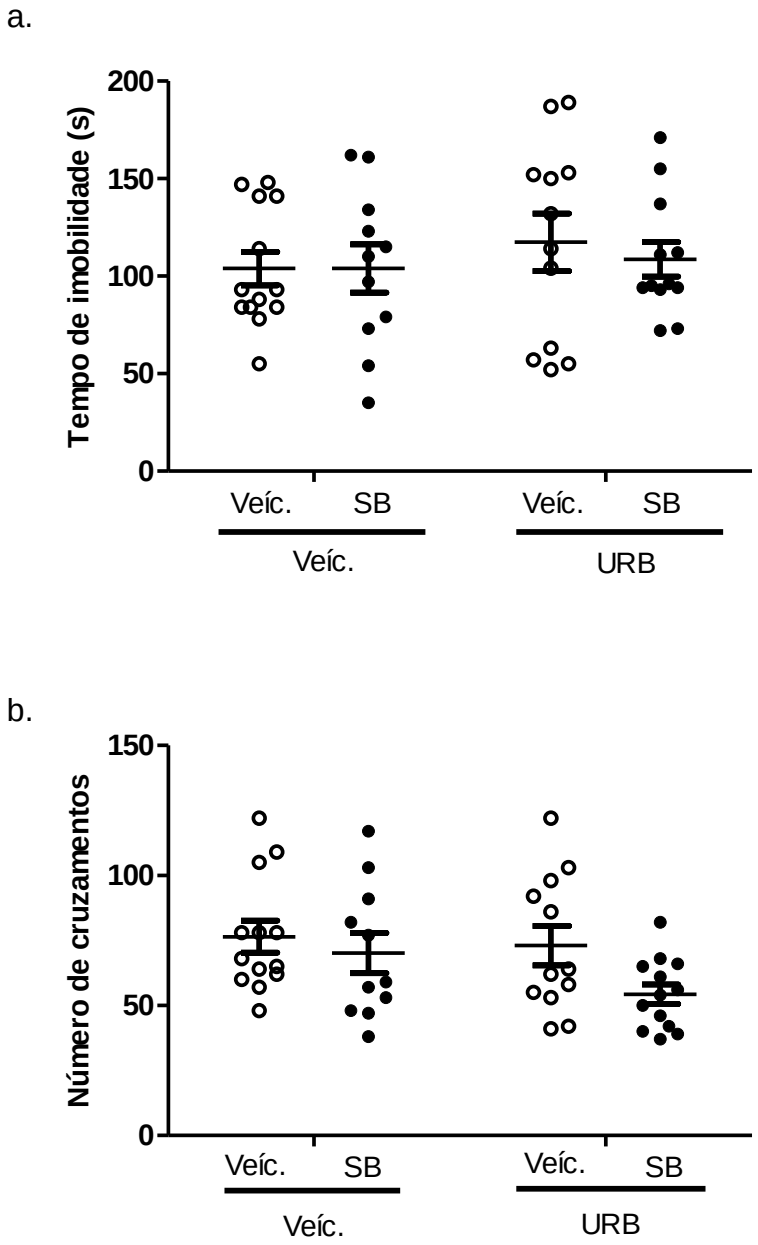

Fig. 8. Efeito da coadministração sistêmica de SB366791 e URB597, em doses subefetivas, em animais submetidos aos testes do nado forçado (a) e do campo aberto (b). O tratamento com SB366791 e URB597 não modificou o tempo de imobilidade, bem como não interferiu no número de cruzamentos. SB: SB366797 (3mg/kg), URB: URB597 (3mg/kg). Os dados representam média ± erro padrão (ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, $p>0,05$; n= 11-13 por grupo). Tempo de imobilidade expresso em segundos.

4.6 - Experimento 6 - efeitos da administração de AM251 (antagonista CB1) em camundongos submetidos aos testes do campo aberto e nado forçado.

O tratamento com antagonista de receptores CB1, o AM251, não influenciou no tempo de imobilidade ($F_{2,20}$=0,8657, $p>0.05$; Fig. 9a), assim como não alterou a atividade locomotora dos animais ($F_{2,20}$=1,423, $p>0.05$; Fig. 9b).

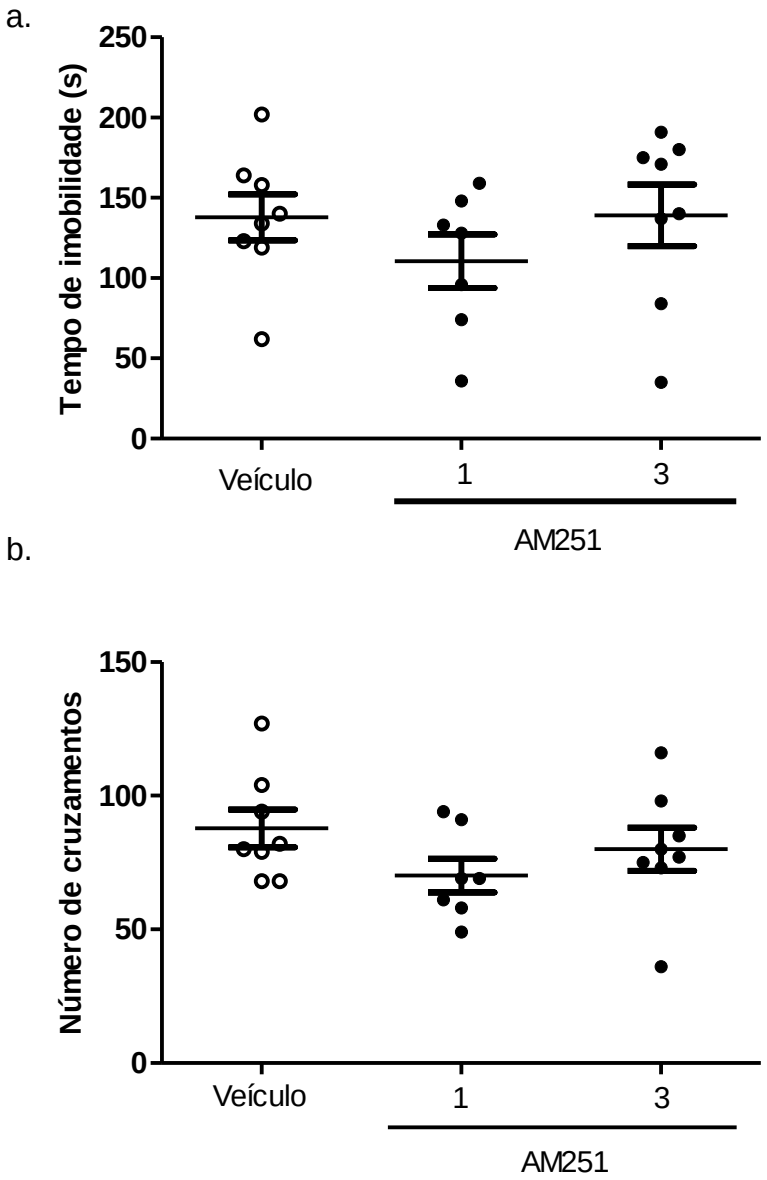

Fig. 9. Efeito da administração sistêmica de AM251 em animais submetidos aos testes do nado forçado (a) e do campo aberto (b). O tratamento com AM251 não induziu efeito no tempo de imobilidade, bem como não alterou o número de cruzamentos. Os dados representam média ± erro padrão (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett, $p>0,05$; n= 7-8 por grupo). Doses expressas em mg/kg; tempo de imobilidade expresso em segundos.

4.7 - Experimento 7 - efeitos da pré-administração de AM251, seguida por AA-5HT, em camundongos submetidos ao teste do campo aberto e nado forçado.

A pré-administração com o antagonista de receptores CB1, AM251, não alterou o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao FST. Conforme demonstrado na Fig. 10a, houve efeito significativo da primeira injeção ($F_{3,45}$= 5,447, $p<0.05$), entretanto não houve efeito na segunda injeção ($F_{3,45}$= 2,812, $p>0.05$) e nem interação entre as duas injeções ($F_{3,45}$= 0,6027, $p>0.05$). No OFT, o pré-tratamento também não interferiu na atividade locomotora dos animais, como pode ser observado na Fig. 10b, não houve efeito significativo da primeira injeção ($F_{3,43}$= 0,0001412, $p>0.05$), houve efeito significativo na segunda injeção ($F_{3,43}$= 8,034, $p<0.05$), entretanto não houve efeito na interação entre as duas injeções ($F_{3,43}$= 0,1056, $p>0.05$).

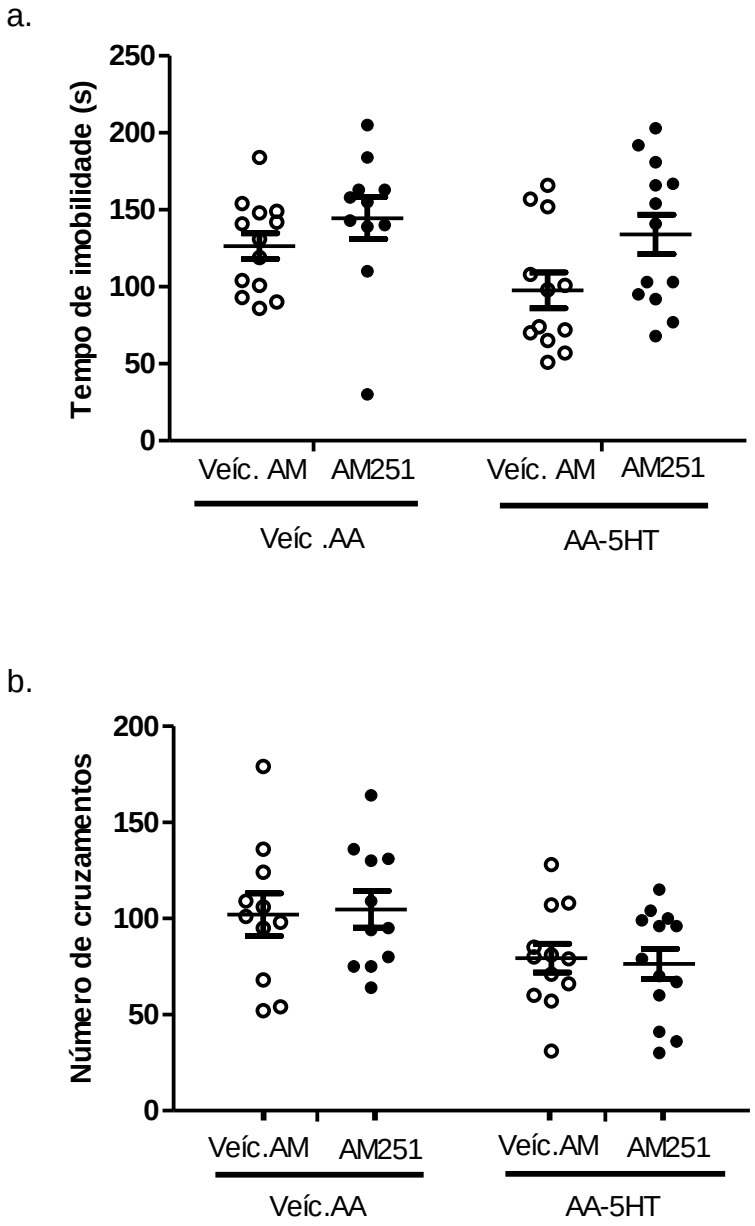

Fig. 10. Efeito da coadministração sistêmica de AM251 e AA-5HT em animais submetidos aos testes do nado forçado (a) e do campo aberto (b). AM251 (3mg/kg), AA-5HT (0,3mg/kg), Veíc. AM: veículo utilizado para diluir AM251, Veíc. AA: veículo utilizado para diluir AA5HT. Os dados representam média ± erro padrão (ANOVA de duas vias, $p<0,05$; n= 11-13 por grupo). Tempo de imobilidade expresso em segundos.

Diante deste resultado, em que a administração do antagonista CB1 não interferiu no efeito do AA-5HT, resultado este em desacordo com os dados na literatura, este experimento foi refeito. Entretanto, antes disso, como o AA-5HT não reduziu significativamente o tempo de imobilidade quando comparado individualmente ao controle, como demonstrado anteriormente, a curva do AA-5HT foi refeita para garantir que não houve degradação da droga.

Ao refazer a curva do AA-5HT ($F_{3,28}$=3,196, $p<0.05$; Fig. 11a), foi obtido o mesmo gráfico (Fig. 3a), demonstrando assim a boa reprodutibilidade dos resultados. E novamente, o tratamento com AA-5HT não interferiu na atividade locomotora ($F_{3,25}$= 1,770, $p>0.05$; Fig. 11b).

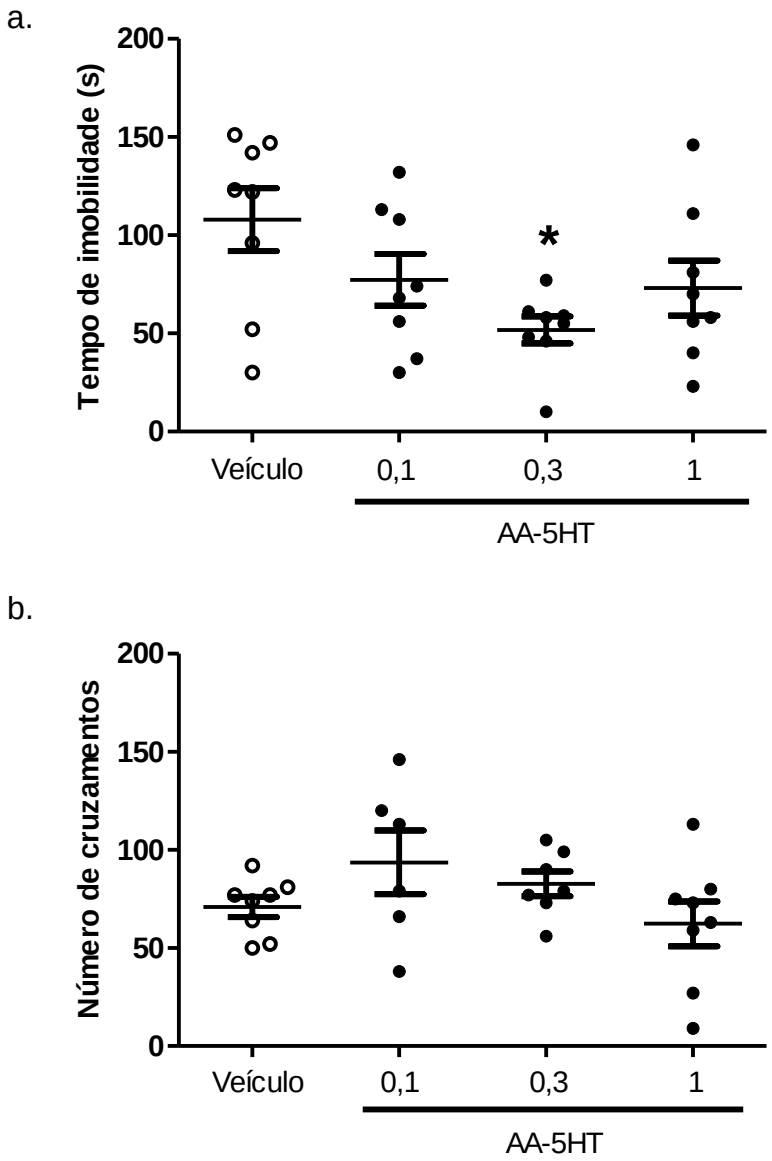

Fig. 11. Efeito da administração sistêmica de AA-5HT nos testes do nado forçado (a) e no campo aberto (b). O tratamento com AA-5HT na dose de 0,3mg/kg reduziu o tempo de imobilidade no FST (*p<0.05) quando comparado ao veículo. Os dados representam média ± erro padrão (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett**,** p<0,05, n= 6-8 por grupo). Doses expressas em mg/kg; tempo de imobilidade expresso em segundos.

O novo experimento com pré-administração com AM251 (Fig. 12a) apresentou efeito significativo da primeira injeção ($F_{3,35}$= 5,726, $p<0.05$), entretanto não houve efeito da segunda injeção ($F_{3,35}$= 1,892, $p>0.05$) ou interação entre as duas injeções ($F_{3,35}$= 0,05114, $p>0.05$), indicando que o pré-tratamento com AM251 não alterou o tempo de imobilidade *per se*, bem como não modificou o efeito da AA-5HT. E novamente, a pré-administração não interferiu na atividade locomotora (Fig.12b), não houve efeito da primeira injeção ($F_{3,35}$=0,04586, $p>0.05$), nem da segunda ($F_{3,35}$=0,09929, $p>0.05$) ou interação entre as injeções ($F_{3,35}$= 0,02340, $p>0.05$).

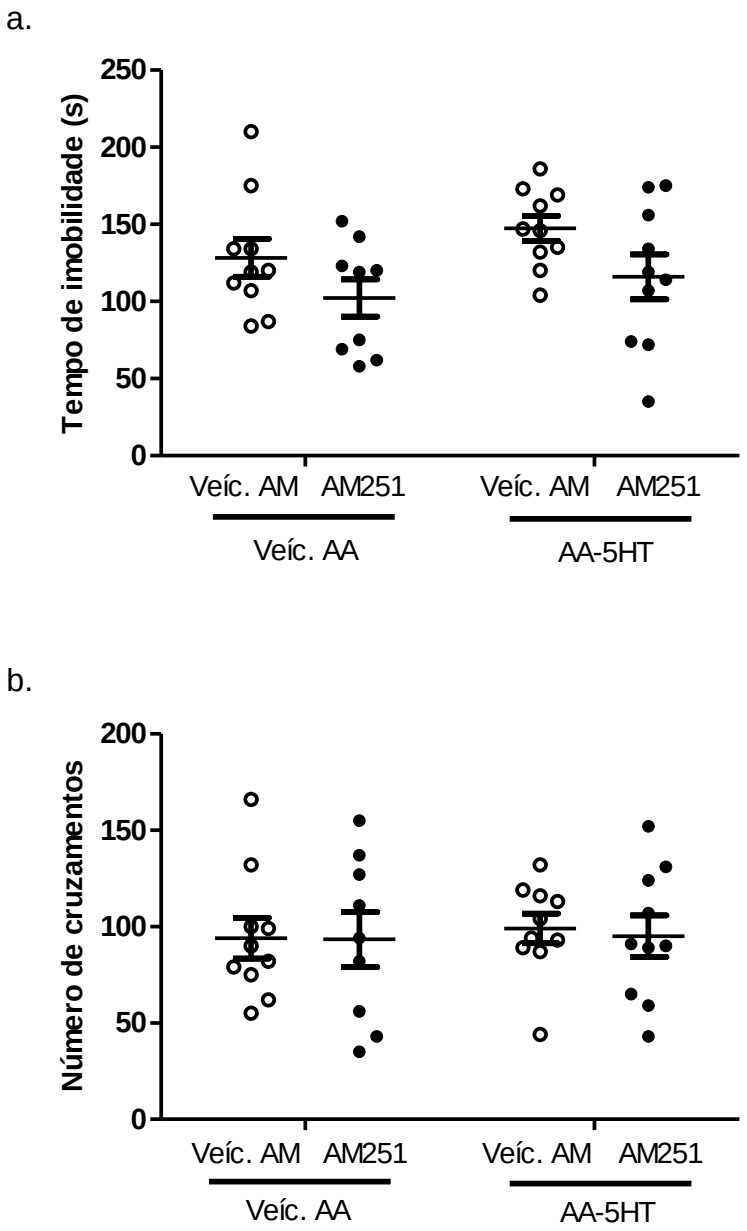

Fig. 12. Efeito da coadministração sistêmica de AM251 e AA-5HT em animais submetidos aos testes do nado forçado (a) e do campo aberto (b) (repetição do experimento 7). a. Efeito da coadministração no FST. b. Efeito da coadministração no OFT. AM251 (3mg/kg), AA-5HT (0,3mg/kg), Veíc. AM: veículo utilizado para diluir AM251, Veíc. AA: veículo utilizado para diluir AA5HT. Os dados representam média ± erro padrão (ANOVA de duas, $p<0,05$; n= 9-10 por grupo).

4.8 - Experimento 8 - efeitos do AA-5HT, após pré-tratamento, em camundongos submetidos ao teste do campo aberto e nado forçado.

O pré-tratamento com veículo do AM251 aumentou significativamente o tempo de imobilidade quando comparado aos animais pré-tratados com salina ($F_{2,21}$= 4,357, $p<0.05$; Fig. 13a), sem alterar a atividade locomotora ($F_{2,21}$= 0,1591, $p<0.05$; Fig. 13b).

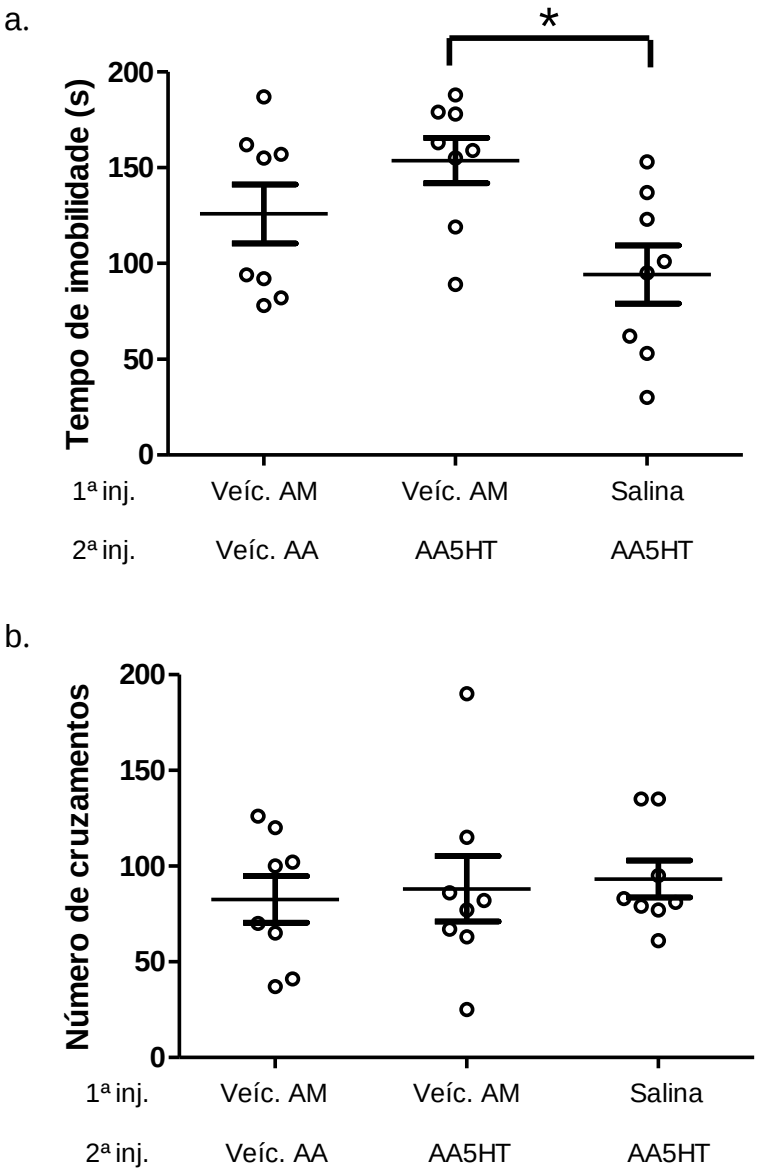

Fig. 13. Efeitos AA-5HT (0,3mg/kg), após pré-tratamento, em animais submetidos ao teste do nado forçado (a) e do campo aberto (b). A pré-administração com veículo AM251 aumentou o tempo de imobilidade quanto comparado aos pré-tratados com salina. Veíc. AM: veículo utilizado para diluir AM251, e Veíc. AA: veículo utilizado para diluir AA-5HT. Os dados representam representa média ± erro padrão (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Turkey $p<0,05$; n=8 por grupo). Tempo de imobilidade expresso em segundos.

Discussão

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi investigado o efeito da administração sistêmica de AA-5HT, um inibidor da FAAH e antagonista TRPV1, em camundongos submetidos ao teste do nado forçado. Os resultados demonstraram que o tratamento com AA-5HT na dose de 0,3mg/kg reduziu significativamente o tempo de imobilidade destes animais, demonstrando assim um comportamento tipo-antidepressivo desta droga. Já os tratamentos com o antagonista de receptores TRPV1, SB366791, e com o inibidor da enzima FAAH, URB597, não promoveram efeito tipo-antidepressivo nas doses testadas, tanto quando administrados individualmente quanto quando coadministrados em doses equipotentes e subefetivas.

O resultado obtido corrobora com dados da literatura que também demonstraram efeito tipo-antidepressivo de AA-5HT. A administração da droga no córtex pré-frontal medial (CPFm) de ratos, Wistar (0,25 e 0,5nmol) e Sprague Dawley (0,25nmol), reduziu significativamente o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (SARTIM; MOREIRA; JOCA, 2016; KIRKEDAL *et al.*, 2017; respectivamente). O mesmo foi observado com a administração sistêmica (i.p.), entretanto, neste caso, o efeito tipo-antidepressivo de AA-5HT (5mg/kg) foi observado apenas em ratos Wistar estressados (NAVARRIA *et al.*, 2014). Diante deste resultado de Navarria e colaboradores (2014), foi sugerido que o efeito da AA-5HT dependa do nível de estresse basal dos animais.

A relação do estresse no sistema endocanabinóide é amplamente descrito na literatura, evidências demonstram que a exposição a diferentes estressores, de forma aguda e crônica, é capaz de alterá-lo. Camundongos ICR e ratos Sprague-Dawley submetidos ao estresse de restrição durante 30min apresentaram, além de níveis aumentados de corticosterona (HILL *et al.*, 2011; RADEMACHER *et al.*, 2008), aumento de 2-AG no córtex pré-frontal e redução de anandamida na amígdala e no CPFm (HILL *et al.*, 2011; PATEL *et al.*, 2005; RADEMACHER *et al.*, 2008). Nesse sentido, camundongos ICR submetidos ao estresse de restrição por 30min, durante dez dias, também possuíam anandamida reduzida na amígdala e no CPFm, e apresentaram ainda um aumento da atividade da FAAH no CPFm (RADEMACHER *et al.*, 2008). De

maneira semelhante, ratos Wistar submetidos a 4h de estresse de restrição, 24h antes da eutanásia, apresentaram aumento na expressão tanto de RNA mensageiro (RNAm) quanto de proteína da FAAH e de receptores TRPV1, no hipocampo (NAVARRIA *et al.*, 2014).

Além de estresse de restrição, outros tipos de estressores também são capazes de alterar o sistema endocanabinóide. Dubreucq e colaboradores (2012) demonstraram que camundongos C57/BL6 expostos ao modelo de residente-intruso, por um dia, exibiram níveis reduzidos de anandamida no hipocampo; o mesmo foi observado nos animais expostos ao estresse durante 7 dias, além de apresentarem também aumento de 2-AG no hipocampo e no córtex.

Já Bowles e colaboradores (2012) demonstraram que camundongos C57/BL6 que receberam corticosterona na água de beber, durante 28 dias, apresentaram alterações na amigdala e no hipocampo. Em ambas as regiões, a anandamida estava diminuída e a velocidade hidrolítica da FAAH aumentada, sugerindo assim que a diminuição dos níveis do endocanabinóide esteja relacionado com um aumento da atividade da enzima; já os níveis de 2-AG estavam aumentados apenas hipocampo (BOWLES *et al.*, 2012). Os animais tratados com corticosterona também exibiram uma diminuição na interação do agonista com receptor CB1 na amigdala e no hipocampo, por outro lado, o tratamento não interferiu na expressão de CB1 e da FAAH (BOWLES *et al.*, 2012). Corroborando com estes dados, ratos (Long-Evans e Sprague-Dawley) submetidos ao estresse crônico variado apresentaram redução nos níveis de anandamida no córtex pré-frontal e no hipocampo (HILL *et al.*, 2008), por outro lado, ao contrário de Bowles e colaboradores (2012), os níveis de 2-AG estavam reduzidos no hipocampo (HILL *et al.*, 2005). Além disso, o estresse crônico também diminuiu a interação com receptor CB1 no hipocampo e aumentou no córtex pré-frontal (HILL *et al.*, 2008; MCLAUGHLIN *et al.*, 2013).

Além do alterar o sistema endocanabinóide, o estresse também parece interferir no efeito de drogas que o modulam, como os inibidores da FAAH. Campos e colaboradores (2010) demonstraram que a administração hipocampal de um inibidor da FAAH, AM404, em ratos Wistar submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado promoveu efeito tipo-ansiogênico (50pmol) em animais não

estressados. Já em animais submetidos a 2h de estresse de restrição, 24h antes do teste, a droga promoveu efeito tipo-ansiolítico (5 e 50pmol); e ainda, os autores observaram também que ambos os efeitos foram mediados por receptores CB1, sugerindo assim, que o estresse pode ser importante para drogas cujo o efeito necessite da produção endógena de anandamida. Por outro lado, existem trabalhos que demonstram o efeito tipo-ansiolítico de inibidores da FAAH em ratos (Sprague-Dawley e Wistar), bem como em camundongos (C57/BL), não estressados submetidos ao mesmo teste (BAMBICO *et al.*, 2015; FOGAÇA *et al.*, 2016; HAKIMIZADEH *et al.*, 2012; LISBOA *et al.*, 2015; MICALE *et al.*, 2009).

Ainda nesse contexto, Sartim e colaboradores (2016) e Kirkedal e colaboradores (2017) demonstraram efeito tipo-antidepressivo de AA-5HT em animais não estressados. Entretanto, é importante ressaltar que estes trabalhos demonstram o efeito em ratos (Wistar e Sprague Dawley), os quais são submetidos a um protocolo de teste do nado forçado diferente do realizado no presente trabalho. No teste em camundongos, os animais são submetidos apenas uma vez ao estresse inescapável, já os ratos são submetidos duas vezes ao cilindro com água, pré-teste e teste, em um intervalo de 24h. Abel (1993) demonstrou que em 15min de nado forçado, tempo de duração do pré-teste, ocorre um aumento nos níveis de corticosterona, aumento este quase cinco vezes maior do que o observado em um período de 5min, tempo de duração do teste. Nesse sentido, é possível que o estresse prévio do pré-teste favoreça a observação do efeito do AA-5HT nos trabalhos citados (KIRKEDAL *et al.*, 2017; SARTIM; MOREIRA; JOCA, 2016). Corroborando essa ideia, a administração sistêmica de AA-5HT promoveu efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado apenas em ratos Wistar submetidos a 4h de estresse de restrição (NAVARRIA *et al.*, 2014). Apesar de existirem dados demonstrando o efeito antidepressivo de inibidores da FAAH em animais não estressados (BAMBICO, *et al.*, 2015; GOBBI *et al.*, 2005; KIRKEDAL *et al.*, 2017; SARTIM; MOREIRA; JOCA, 2016), corroborando com o efeito de AA-5HT observado no presente trabalho, o estresse prévio parece ser fator importante para drogas cujo mecanismo de ação dependa da produção intrínseca de anandamida. Por essa razão, seria interessante realizar novos experimentos comparando os efeitos do

AA-5HT e demais drogas testadas nesse estudo, em animais previamente estressados, com animais não estressados.

Além de modificar o sistema endocanabinóide e os efeitos das drogas inibidoras da FAAH, o estresse também é capaz de interferir nos receptores TRPV1. Navarria e colaboradores (2014) demonstraram que animais submetidos a 4h de estresse de restrição apresentaram aumento nos níveis de corticosterona e aumento na expressão, tanto de RNAm quanto proteína, de TRPV1 no hipocampo. O tratamento com inibidor da FAAH e antagonista TRPV1, AA-5HT (5mg/kg), foi capaz de reverter a alteração nos níveis de corticosterona dos animais estressados.

Nesse sentido, Wang e colaboradores (2017) demonstraram que camundongos C57BL/6J submetidos ao estresse crônico variado apresentaram aumento no tempo de imobilidade (FST), na latência de escape no teste do desamparo apreendido e na latência de alimentação no teste de alimentação suprimida pela novidade. Já animais *knockouts* TRPV1 expostos ao mesmo estresse crônico não apresentaram alterações no teste do nado forçado, nem no desamparo apreendido, e ainda apresentaram redução na latência de alimentação, indicando potencial efeito antidepressivo desencadeado pela ausência de sinalização mediada por TRPV1 (WANG *et al.*, 2017). Além disso, os selvagens apresentaram o dobro nos níveis de corticosterona do que os animais *knockouts* (WANG *et al.*, 2017). Diante desses dados, os animais *knockouts* TRPV1 parecem ser menos susceptíveis a desregulação do eixo HPA induzida pelo estresse crônico que os selvagens. Esses dados corroboram com o trabalho da Navarria e colaboradores (2014) que ao antagonizar os receptores TRPV1, haveria atenuação dos níveis de corticosterona em animais estressados.

Wang e colaboradores (2017) ainda demonstraram que ao eliminar os receptores TRPV1, através da infusão de lentivírus, no hipocampo de animais submetidos ao estresse crônico variado, observou-se o efeito tipo-antidepressivo, tanto no teste do nado forçado quanto no desamparo apreendido; entretanto nenhum efeito foi observado no teste de alimentação suprimida pela novidade. Sendo assim, o efeito tipo-antidepressivo promovido pela ausência dos receptores TRPV1 não parece ser um mecanismo

compensatório, mas estaria relacionado à proteção contra o estresse (WANG *et al.*, 2017).

A relação dos receptores TRPV1 no efeito tipo-antidepressivo ainda não foi completamente esclarecida. Apesar de existirem dados que demonstrem o efeito tipo-antidepressivo de antagonistas TRPV1 (SARTIM; MOREIRA; JOCA, 2016; SOCAŁA; WLAŹ, 2016), bem como em animais *knockouts* TRPV1 (WANG *et al.*, 2017; YOU *et al.*, 2012), existem trabalhos que demonstram o mesmo efeito na ativação destes receptores (AMIRI *et al.*, 2016; HAYASE, 2011). No presente trabalho, a administração de SB366791 não promoveu efeito em nenhuma das doses testadas. Este resultado é contrário a dados na literatura que demonstram o efeito tipo-antidepressivo desta droga quando administrada no CPFm de ratos (SARTIM; MOREIRA; JOCA, 2016) ou sistemicamente em ratos estressados (NAVARRIA *et al.*, 2014). Apesar da divergência de resultados, é importante ressaltar que diferentemente deste estudo, os trabalhos foram desenvolvidos com ratos Wistar. Além disso, a administração sistêmica de SB366791 (1mg/kg) promoveu efeito tipo-antidepressivo apenas nos animais estressados, sugerindo assim que o estresse basal parece ser importante para que o efeito desta droga seja evidenciado. Por essa razão, seria interessante testar o efeito antidepressivo do SB366791 em animais previamente submetidos ao estresse, para avaliar se o estresse prévio favorece a observação do efeito da droga.

Além do estresse, a espécie escolhida para o desenvolvimento do trabalho também parece interferir no efeito de SB366791. Em modelo animal de convulsão, a administração sistêmica de AA-5HT (1 e 3mg/kg), em camundongos Swiss, promoveu efeito anticonvulsivante, entretanto nenhum efeito foi observado nos animais tratados com SB366791 (VILELA *et al.*, 2014). De maneira semelhante, Gobira e colaboradores (2017) demonstraram que a administração sistêmica de AA-5HT (0,1, 0,3 e 1mg/kg), na mesma espécie, promoveu efeito tipo-antiaversivo no modelo medo condicionado ao contexto, entretanto a administração de SB366791 não interferiu no comportamento. Em dados ainda não publicados do laboratório, a administração sistêmica de outro antagonista TRPV1, a capsazepina, em camundongos Swiss também não alterou o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, entretanto quando

administrada por via intracerebroventricular, a droga promoveu efeito tipo-antidepressivo. Sendo assim, seria interessante administrar SB366791 por outra via, e avaliar se a droga promoveria efeito.

Ainda nesse contexto, Micale e colaboradores (2009) demonstraram que a administração sistêmica, e aguda, de AA-5HT (0,1, 0,5, 1 e 2,5mg/kg), URB597 (1mg/kg) e SB366791 (1mg/kg), em camundongos C57BL/6J, promoveu efeito tipo-ansiolítico no teste do labirinto em cruz elevado; enquanto o tratamento com doses maiores de AA-5HT (5mg/kg) e SB366791 (2,5mg/kg) promoveu efeito tipo-ansiogênico. Já o tratamento agudo com AA-5HT em camundongos Swiss promoveu apenas efeito tipo-ansiogênico na maior dose testada, 5mg/kg. A administração repetida (7 dias) em camundongos Swiss de AA-5HT (2,5mg/kg) e URB597 (1mg/kg) promoveu efeito tipo-ansiolítico, já o tratamento com AA-5HT (5mg/kg) e SB366791 (2,5mg/kg) promoveu efeito tipo-ansiogênico (MICALE *et al.*, 2009). Com relação aos níveis dos endocanabinóides, a administração aguda de AA-5HT (0,1, 0,5, 1 e 2,5mg/kg) em animais C57BL/6J aumentou os níveis cerebrais de ananadamida e 2-AG; entretanto em camundongos Swiss, apenas a administração crônica (1 e 2,5mg/kg) foi capaz de aumentar os níveis de anandamida, sem alterar os níveis de 2-AG. Diante desses resultados, tanto o AA-5HT quanto SB366791 parecem ser menos potentes e/ou eficazes em camundongos Swiss quando comparados ao C57BL/6J. Sendo assim, tanto o aumento dos níveis de anandamida, quanto o antagonismo de receptores TRPV1 parecem mais dificilmente observados em camungondos Swiss, podendo esta ser uma justificativa para ausência de efeito tipo-antidepressivo de URB597 e SB366791, no presente trabalho. Assim, seria interessante testar essas drogas em camundongos C57BL/6J e avaliar o efeito no teste do nado forçado.

Além do estresse (agudo e crônico) e a espécie utilizada, o teste comportamental utilizado também pode influenciar na observação do efeito da droga, como demonstrado no presente trabalho, no efeito tipo-antidepressivo de AA-5HT. Abel (1995) demonstrou que no teste do nado forçado, dos meses de dezembro a março obtém-se os maiores tempos de imobilidade, e que no restante do ano, os tempos de imobilidade são menores. E, como ambos os experimentos de AA-5HT que demonstraram efeito tipo-antidepressivo foram

realizados nesse período, é possível que o efeito da droga possa sofrer interferência de fatores de sazonalidade sobre as medidas realizadas no modelo. Nesse sentido, além da realização de experimentos em diferentes épocas do ano, a realização de outro teste comportamental, como por exemplo o teste de suspensão pela cauda, poderia ajudar a esclarecer essas questões.

A frente de todas essas informações, muitos fatores podem ter interferido no efeito tipo-antidepressivo de AA-5HT ao longo dos experimentos realizados no presente trabalho. O nível basal de estresse pode ter interferido no efeito, já que alguns dados demonstram que o efeito de drogas inibidoras da FAAH, ou seja, que dependem da produção intrínseca de anandamida, parece ser favorecido quando os animais são submetidos a um estresse prévio; e ainda, os receptores TRPV1 também parecem ser alterados após situações de estresse incontrolável. Além disso, a espécie utilizada bem como o modelo escolhido no trabalho também pode ter comprometido a eficácia da droga. Apesar disso, os dados do presente trabalho não são suficientes para afirmar o que pode ter provocado a oscilação do efeito de AA-5HT ao longo dos experimentos. Por essa razão, seria interessante que o experimentador submetesse os animais a um estressor antes do experimento, para avaliar se o nível basal de estresse favoreceria o efeito da droga; testar o mesmo protocolo em camundongos C57BL/6J e avaliar se existe diferença do que foi observado em camundongos Swiss; e por fim, também utilizar outro teste para avaliar o efeito tipo-antidepressivo da droga, como por exemplo o teste de suspensão pela cauda, excluindo assim qualquer interferência da sazonalidade.

Outro objetivo do trabalho foi investigar quais os mecanismos estariam envolvidos no efeito tipo-antidepressivo de AA-5HT. Para isso, foram testadas diferentes doses do antagonista TRPV1, SB366791, e inibidor da FAAH, URB597, no teste do nado forçado. Os resultados obtidos demonstraram que a administração sistêmica de SB366791 não alterou o tempo de imobilidade, resultado este em desacordo com dados na literatura (NAVARRIA *et al.*, 2014; SARTIM; MOREIRA; JOCA, 2016), e, conforme já foi comentado, tanto o estresse prévio como a espécie escolhida parecem ser fatores importantes para a ausência de efeito desta droga. O tratamento sistêmico com URB597 também não promoveu efeito tipo-antidepressivo no FST, resultado este discrepante do

observado em outros trabalhos que demonstraram o efeito tipo-antidepressivo desta droga (BAMBICO *et al.*, 2015; BORTOLATO *et al.*, 2007; GOBBI *et al.*, 2005), e como comentado, a ausência de estresse prévio e a espécie testada podem ter favorecido a inexistência de efeito do inibidor da FAAH.

Na tentativa de compreender se ambos os mecanismos de AA-5HT eram importantes para o efeito tipo-antidepressivo, SB366791 e URB597 foram coadministrados em doses equipotentes, ao AA-5HT, e subefetivas para avaliar se haveria um efeito sinérgico/aditivo das drogas. A coadministração sistêmica de SB366791 e URB597 em doses equipotentes ao AA-5HT não promoveu efeito tipo-antidepressivo no FST. Como as doses foram obtidas a partir de resultados de experimentos *in vitro*, baseadas no IC50, a ausência de efeitos da combinação das drogas em doses equipotentes pode ser resultante da influência de fatores farmacocinéticos característicos de cada uma das drogas, não sendo possível garantir que as drogas chegariam ao sítio de ação em proporções equivalentes às administradas.

A coadministração de SB366791 e URB597 em doses subefetivas também não interferiu no tempo de imobilidade. Este resultado está em desacordo ao observado por Sartim e colaboradores (2016) no qual a coadministração das drogas, em doses subefetivas, no CPFm de ratos Wistar promoveu efeito tipo-antidepressivo no FST. O resultado obtido também é diferente do observado em outros modelos animais, como demonstrado por John e Currie (2012), que mesmo na ausência de efeito no teste do labirinto em cruz elevado, quando administrado isoladamente, a coadministração de antagonista TRPV1 (capsazepina) e inibidor da FAAH (URB597) em ratos Sprague-Dawley promoveu efeito tipo-ansiolítico; de maneira semelhante, Gobira e colaboradores (2017) demonstraram no modelo de medo condicionado ao contexto que apesar da ausência de efeito de SB366791 em camundongos Swiss, quando coadministrado com dose subefetivas de URB597, o efeito tipo-antiaversivo foi observado. Sendo assim, como não foi encontrado nenhum efeito quando administrados isoladamente bem como quando coadministrados, os dados do presente trabalho não são suficientes para avaliar a participação dos mecanismos de ação, antagonismo de TRPV1 e inibição da FAAH, no efeito de AA-5HT.

E por fim, o último objetivo do presente trabalho foi avaliar se o efeito tipo-antidepressivo de AA-5HT era mediado por receptores CB1. Para isso, foram testadas doses do antagonista CB1, AM251, no FST. Como resultado, observou-se que o tratamento não promoveu efeito no FST, resultado este condizente com dados na literatura que demostram que o tratamento com antagonista de receptores CB1 não interfere no tempo de imobilidade (ADAMCZYK *et al.*, 2008; HILL; GORZALKA, 2005; KRUK-SLOMKA; MICHALAK; BIALA, 2015). A pré-administração de AM251 não interferiu no efeito de AA-5HT, sugerindo assim que o efeito de AA-5HT não é mediado por receptores CB1. Este resultado contradiz dados consistentes da literatura que demonstram que o bloqueio dos receptores CB1 reverte os efeitos induzidos por AA-5HT (GOBIRA *et al.*, 2017; KIRKEDAL *et al.*, 2017; MICALE *et al.*, 2009; SARTIM; MOREIRA; JOCA, 2016; VILELA *et al.*, 2014).

E ainda, como o AA-5HT não promoveu efeito tipo-antidepressivo neste experimento, mesmo após comprovar que a droga estava funcionando adequadamente, foi realizado o teste para avaliar se os veículos utilizados para diluir as drogas estaria interferindo no teste. E como resultado, observou-se que o veículo utilizado para diluir AM251 estava interferindo no efeito de AA-5HT, aumentando assim seu tempo de imobilidade. Por essa razão, para esclarecer a participação dos receptores CB1 no efeito tipo-antidepressivo de AA-5HT seria necessário utilizar outro antagonista canabinóide.

De maneira resumida, os dados de AA-5HT nos modelos pré-clínicos de transtornos emocionais estão expressos na tabela 2.

Finalmente, cabe ressaltar que a reprodutibilidade de dados experimentais tem sido um problema frequentemente relatado pela comunidade científica. Crabbe e colaboradores (1999) realizaram um experimento no qual diferentes espécies de camundongos (A/J, C57BL/6J, DBA/2J, 129/SvEvTac, 129/Sv-ter, 5HT1B-/-, BALB/cByJ, e B6D2F2) foram submetidos a testes comportamentais (teste do campo aberto, teste do labirinto em cruz elevado e o consumo de etanol) em três laboratórios diferentes: em Nova York, no Canadá e em Oregon; e como resultado obtiveram que dependendo do local e da espécie testada o comportamento pode ser afetado, como por exemplo, o experimento

realizado em Oregon no qual três espécies (A/J, BALB/cByJ e B6D2F2) submetidas ao teste do labirinto em cruz elevado apresentaram menor tempo nos braços abertos quando comparado aos outros laboratórios.

Além do ambiente, a espécie também parece ser um fator fundamental para reprodutibilidade. Suman e colaboradores (2017) demonstraram recentemente que o tratamento de camundongos Swiss com antidepressivos (bupropiona, desimipramina, e fluoxetina nas doses de 10 e 30mg/kg) por via oral (v.o. - por 7 e 14 dias) não reduziu o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado; bem como o tratamento agudo com fluoxetina via intraperitoneal (i.p - 20mg/kg) também não promoveu efeito tipo-antidepressivo. E ainda, os animais tratados agudamente (v.o.) com fluoxetina (20mg/kg) foram ainda submetidos a diferentes períodos de habituação, 10 ou 70 dias, bem como ao ciclo claro/escuro normal ou invertido, e novamente o tratamento não interferiu no FST, mesmo após a eficácia da droga ter sido demonstrado em outra espécie (ratos Wistar) (SUMAN *et al.*, 2017). Diante desses resultados, os autores observaram que cerca de 50% dos animais controles foram classificados com baixa imobilidade e a outra metade com alta imobilidade, o que promoveu alta variabilidade dos resultados, dificultado assim o aparecimento do efeito das drogas antidepressivas testadas (SUMAN *et al.*, 2017).

Ainda nesse contexto, Chesler e colaboradores (2002) identificaram, através do levantamento de dados na literatura, algumas causas da variabilidade em resposta a dor no ensaio de nocicepção termal, e os principais fatores relacionados com a variação na resposta foram o experimentador, o genótipo, e fatores ambientais como estação do ano, densidade da caixa, período do dia e umidade. Sendo assim, quanto mais detalhada for a metodologia em relação ao alojamento dos animais, período dos experimentos bem como informações sobre os procedimentos experimentais, menor será a variabilidade e, consequentemente, melhor será a reprodutibilidade dos resultados (TILLMANN, 2017).

Nesse sentido, é possível discutir que a variabilidade nos dados encontrados no presente trabalho pode estar relacionada à dificuldade em

reproduzir resultados em diferentes momentos, uma vez que foi observado alta variabilidade na resposta dos animais controle e dos animais tratados com droga. Sendo assim, o esclarecimento dos efeitos do AA-5HT deveria incluir testes em outras espécies, em animais estressados e não estressados, e em diferentes condições experimentais.

Linhagem	Teste / Modelo animal	Adm.	Estresse Prévio	Efeitos	Referências
Camundon-gos C57BL/6J e Swiss	Teste do labirinto em cruz elevado	i.p.	----	<u>Em camundongos C57BL/6J:</u> -A administração aguda de AA-5HT promoveu efeito tipo ansiolítico nas doses 0,1, 0,5, 1 e 2,5mg/kg; e efeito ansiogênico na dose de 5mg/kg -A pré-administração com AM251, transformou o efeito de AA-5HT (0,1mg/kg) em efeito tipo-ansiogênico -A administração aguda de AA-5HT (0,1, 0,5, 1 e 2,5mg/kg) aumentou os níveis de anandamida e 2-AG <u>Em camundongos Swiss:</u> -A administração aguda de AA-5HT promoveu efeito tipo-ansiolítico na dose de 5mg/kg -A administração repetida (7dias) promoveu efeito tipo-ansiolítico na dose 2,5mg/kg, e efeito ansiogênico na dose de 5mg/kg -A administração repetida de AA-5HT (1 e 2,5mg/kg) aumentou os níveis de anandamida e não alterou os níveis de 2-AG -O pré-tratamento com AM251, transformou o efeito tipo-ansiolítico da administração repetida de AA-5HT (2,5mg/kg)	MICALE *et al.*, 2009
Ratos Sprague-Dawley	Teste do labirinto em cruz elevado	Amigdala basolate-ral	----	AA-5HT induziu efeito tipo-ansiolítico nas doses de 0,25 e 0,5nmol O efeito tipo-ansiolítico foi mimetizado pela coadministração, em doses subefetivas, de capsazepina e URB597	JOHN; CURRIE, 2012
Ratos Wistar	Teste do nado forçado	i.p.	4h de ER (antes PT)	AA-5HT não interferiu no tempo de imobilidade de ratos não estressados AA-5HT promoveu efeito tipo-antidepressivo em animais estressados na dose de 5mg/kg Em animais estressados, AA-5HT (5mg/kg) inibiu o aumento dos níveis de corticosterona, e na dose de 2,5mg/kg aumentou os níveis de anandamida no cortex pré-frontal	NAVARRIA *et al.*, 2014
Ratos Wistar	Teste do nado forçado	CPFm	----	O AA-5HT reduziu o tempo de imobilidade nas doses de 0,25 e 0,5nmol Efeito tipo-antidepressivo mimetizado pela coadministração, em doses subefetivas, de SB366791 e URB597 Efeito tipo-antidepressivo revertido pelo antagonismo de CB1	SARTIM; MOREIRA; JOCA, 2016
Ratos Sprague-Dawley	Teste do nado forçado	CPFm	----	O AA-5HT reduziu o tempo de imobilidade na dose de 0,25nmol Efeito tipo-antidepressivo revertido pelo antagonismo de CB1	KIRKEDAL *et al.*, 2017
Camundon-gos Swiss	Medo condiciona-do ao contexto	i.p.	----	AA-5HT, nas doses de 0,1, 0,3 e 1mg/kg, inibiu a expressão do medo condicionado ao contexto O efeito tipo-antiaversivo de AA-5HT foi mimetizado pela coadministração, em doses subefetivas, de SB366791 e URB597 Efeito tipo-antiaversivo foi revertido pela administração de antagonista CB1	GOBIRA *et al.*, 2017
Ratos Wistar	Modelo KCN	i.p.	----	AA-5HT não diminuiu a duração do tempo de escape no modelo de ataque de pânico	BATISTA *et al.*, 2017

Tabela 2 - Efeitos do AA-5HT em estudo pré-clínicos de transtornos emocionais. Adm: administração; i.p.: intraperitoneal; CPFm: córtex pré-frontal medial; ER: estresse de restrição; PT: pré-teste; KCN: cianeto de potássio.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

A administração sistêmica de AA-5HT, na dose de 0,3mg/kg, reduziu significativamente o tempo de imobilidade de camundongos Swiss submetidos ao teste do nado forçado, demonstrando assim o efeito tipo-antidepressivo da droga, neste teste. Entretanto, os resultados deste estudo não foram suficientes para avaliar se ambos os mecanismos de ação da droga, antagonismo de receptores TRPV1 e inibição da enzima FAAH, são necessários para o efeito tipo-antidepressivo da mesma; bem como se este efeito é mediado por receptores CB1.

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O presente trabalho possui limitações que devem ser levadas em consideração quando forem discutidos e interpretados os resultados obtidos:

1) Ausência de controle positivo: diante da ausência de efeito da maioria das drogas, e da ocilação de efeito tipo-antidepressivo do AA-5HT, durante os experimentos deveria ter sido empregado um controle prositivo, como por exemplo a imipramina, para garantir a ausência de efeitos se deve a eficácia da droga e não por algum comprometimento no teste. Isso não foi realizado porque o teste do nado forçado é um teste padronizado no laboratório há muito tempo, de tal forma que através da média dos animais veículos já era possível avaliar se algo de anormal teria acontecido no experimento; sendo assim optou-se por não submeter cerca de 80 animais a um tratamento considerado, naquele momento, desnecessário.

2) Os efeitos das drogas foram avaliados apenas em animais de uma mesma linhagem submetidos a um único modelo preditivo de efeito antidepressivo, o teste do nado forçado. Como a maioria das drogas não promoveram efeito no teste do nado forçado, as mesmas drogas deveriam ser testadas em outro modelo, como por exemplo o teste de suspensão da cauda, e/ou em diferentes linhagens.

3) Diante da informação que o nível basal de estresse parece ser importante para a eficácia de drogas inibidoras da enzima FAAH, as drogas deveriam ser testadas em animais previamente submetidos a estresse para avaliar se o mesmo favoreceria ou prejudicaria o efeito das drogas testadas no teste do nado forçado.

Referências

8. REFERÊNCIAS

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

ABEL, E. L. Physiological correlates of the forced swim test in rats. **Physiology.and Behavior.** v. 54, n. 2, p. 317 , 1993.

ABEL, E. L. Circannual changes in the duration of the immobility response of rats in the forced swim test. **Physiology and Behavior** v. 58, n. 3, p. 591–593 , 1995.

ABELAIRA, H. M; RÉUS, G. Z; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Revista brasileira de psiquiatria** v. 35 Suppl 2, p. S112-20 , 2013.

ADAMCZYK, P. *et al.* Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. **Journal of Physiology and Pharmacology** v. 59, n. 2, p. 217–228 , 2008.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-5 Manual Diagnóstico e Etatístico de Transtornos Mentais**. Porto Alegre: Artmed, 2014, p. 155-188.

AMIRI, S. *et al.* NMDA receptors are involved in the antidepressant-like effects of capsaicin following amphetamine withdrawal in male mice. **Neuroscience** v. 329, p. 122–133 , 2016.

BAMBICO, F. R. *et al.* The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 modulates serotonin-dependent emotional behaviour , and serotonin 1A and serotonin 2A / C activity in the hippocampus. **European Neuropsychopharmacology** v. 26, n. 3, p. 1–13 , 2015.

BAMBICO, F. R. *et al.* Genetic deletion of fatty acid amide hydrolase alters emotional behavior and serotonergic transmission in the dorsal raphe, prefrontal cortex, and hippocampus. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology** v. 35, n. 10, p. 2083–100 , 2010.

BATISTA, L. A. *et al.* Effects of alprazolam and cannabinoid-related compounds in an animal model of panic attack. **Behavioural Brain Research** v. 317, p. 508–514 , 2017.

BISOGNO, T. *et al.* Arachidonoylserotonin and Other Novel Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase. **Biochemical and biophysical research communications** v. 248, n. 3, p. 515–22 , 1998.

BORTOLATO, M. *et al.* Antidepressant-like Activity of the Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitor URB597 in a Rat Model of Chronic Mild Stress. **Biological**

Psychiatry v. 62, p.1103-1110 , 2007.

BORTOLATO, M. *et al.* Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. **Neuropsychopharmacology** v. 31, n. 12, p. 2652–2659 , 2006.

BOWLES, N. P. *et al.* Chronic, noninvasive glucocorticoid administration suppresses limbic endocannabinoid signaling in mice. **Neuroscience** v. 204, p. 83–89 , 2012.

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

CASPI, A. *et al.* Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. **Science (New York, N.Y.)** v. 301, n. 5631, p. 386–389 , 2003.

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

COSTA, B. *et al.* The dual fatty acid amide hydrolase/TRPV1 blocker, N-arachidonoyl-serotonin, relieves carrageenan-induced inflammation and hyperalgesia in mice. **Pharmacological Research** v. 61, n. 6, p. 537–546 , 2010.

CRABBE, J. C.; WAHLSTEN, D.; DUDEK, B. C. Genetics of Mouse Behavior: Interactions with Laboratory Environment. **Science** v. 284, n. 5420, p. 1670–1672 , 1999.

CRISTINO, L. *et al.* Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. **Neuroscience** v. 139, n. 4, p. 1405–1415 , 2006.

CRYAN, J. F.; MOMBEREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** v. 29, n. 4–5, p. 571–625 , 2005.

CRYAN, J. F; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 23, n. 5, p. 238–245 , 2002.

DE LAGO, E. *et al.* Effect of repeated systemic administration of selective inhibitors of endocannabinoid inactivation on rat brain endocannabinoid levels. **Biochemical Pharmacology** v. 70, n. 3, p. 446–452 , 2005.

DEVANE, W. A. *et al.* Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. **SCIENCE** v. 258, p. 1946-1949, 1992.

DI MARZO, V. A. brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. **Trends in Pharmacological Sciences** v. 27, n. 3, p. 134–140 , 2006.

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

DUBREUCQ, S. *et al.* Genetic Dissection of the Role of Cannabinoid Type-1 Receptors in the Emotional Consequences of Repeated Social Stress in Mice. **Neuropsychopharmacology** v. 37, n. 8, p. 1885–1900, 2012.

DUMAN, C. H. Models of depression. **Vitamins and hormones** v. 82, n. 10, p. 1–21 , 2010.

CHESLER, E. J. *et al.* Influences of laboratory environment on behavior. **Nature neuroscience** v. 5, n. 11, p. 1101–1102 , 2002.

FOGAÇA, M. V. *et al.* Involvement of M1 and CB1 receptors in the anxiogenic-like effects induced by neostigmine injected into the rat prelimbic medial prefrontal cortex. **Psychopharmacology** v. 233, n. 8, p. 1377–1385 , 2016.

FOGAÇA, M. V. *et al.* The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. **Neuropharmacology** v. 63, n. 2, p. 202–210 , 2012.

FOWLER, C. J. *et al.* Inhibition of fatty acid amidohydrolase, the enzyme responsible for the metabolism of the endocannabinoid anandamide, by analogues of arachidonoyl-serotonin. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry** v. 18, n. 3, p. 225–231 , 2003.

FOWLER, C. J. The potential of inhibitors of endocannabinoid metabolism as anxiolytic and antidepressive drugs-A practical view. **European Neuropsychopharmacology** v. 25, n. 6, p. 749–762 , 2015.

GOBBI, G *et al.* Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 102, n. 51, p. 18620–18625 , 2005.

GOBIRA, P. H. *et al.* N-arachidonoyl-serotonin, a dual FAAH and TRPV1 blocker, inhibits the retrieval of contextual fear memory: Role of the cannabinoid CB1 receptor in the dorsal hippocampus. **Journal of Psychopharmacology** v. 31, n. 6, p. 750–756 , 2017.

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

GUNTHORPE, M. J. *et al.* Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist. **Neuropharmacology** v. 46, n. 1, p. 133–149 , 2004.

HABERSTICK, B. C. *et al.* Depression, stressful life events, and the impact of variation in the serotonin transporter: Findings from the national longitudinal study of adolescent to adult health. **PLoS ONE** v. 11, n. 3, p. 1–13 , 2016.

HAKIMIZADEH, E *et al.* Endocannabinoid system and TRPV1 receptors in the dorsal hippocampus of the rats modulate anxiety-like behaviors. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences** v. 15, n. 3, p. 795–802 , 2012.

HAYASE, T. Differential effects of TRPV1 receptor ligands against nicotine-induced depression-like behaviors. **BMC pharmacology** v. 11, n. 6, p. 1-11 , 2011.

HERKENHAM, M *et al.* Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience** v. 11, n. 2, p. 563–583 , 1991.

HILL, M. N. *et al.* Recruitment of Prefrontal Cortical Endocannabinoid Signaling by Glucocorticoids Contributes to Termination of the Stress Response. **Journal of Neuroscience** v. 31, n. 29, p. 10506–10515 , 2011.

HILL, M. N. *et al.* Downregulation of endocannabinoid signaling in the hippocampus following chronic unpredictable stress. **Neuropsychopharmacology** v. 30, n. 3, p. 508–515 , 2005.

HILL, M. N. *et al.* Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: Effects of concurrent antidepressant treatment. **Journal of Neurochemistry** v. 106, n. 6, p. 2322–2336 , 2008.

HILL, M. N. *et al.* The Therapeutic Potential of the Endocannabinoid System for the Development of a Novel Class of Antidepressants. **Trends in Pharmacological Sciences** v. 30, n. 9, p. 484–493 , 2009.

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

HILL, M. N.; MCEWEN, B. S. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry** v. 34, n. 5, p. 791–797 , 2010.

HOWLETT, A C *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacological reviews** v. 54, n. 2, p. 161–202 , 2002.

JOHN, C. S.; CURRIE, P. J. N-Arachidonoyl-serotonin in the basolateral amygdala increases anxiolytic behavior in the elevated plus maze. **Behavioural Brain Research** v. 233, n. 2, p. 382–388 , 2012.

JUHASZ, G. *et al.* CNR1 gene is associated with high neuroticism and low agreeableness and interacts with recent negative life events to predict current depressive symptoms. **Neuropsychopharmacology** v. 34, n. 8, p. 2019–27 , 2009.

KACZOCHA, M *et al.* Anandamide uptake is consistent with rate-limited diffusion and is regulated by the degree of its hydrolysis by fatty acid amide hydrolase. **Journal of Biological Chemistry** v. 281, n. 14, p. 9066–9075 , 2006..

KANO, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. **Physiol Rev** v. 89, p. 309–380 , 2009.

KENDLER, K. S.; *et al.* A Swedish National Twin Study of Lifetime Major Depression. **Am J Psychiatry** v. 163, n. 1, p. 109–114 , 2006.

KENDLER, K. S.; GARDNER, C. O. Depressive vulnerability, stressful life events and episode onset of major depression: a longitudinal model. **Psychological Medicine** p. 1–10 , 2016.

KENDLER, K. S.; GARDNER, C. O. Dependent Stressful Life Events and Prior Depressive Episodes in the prediction of major depression. **Arch Gen Psychiatry** v. 67, n. 11, p. 1120–1127 , 2010.

KENDLER, K. S.; KARKOWSKI, L. M.; PRESCOTT, C. A. Causal Relationship Between Stressful Life Events and the Onset of Major Depression. **Am J Psychiatry** v. 156, n. 6, p. 837–841 , 1999.

KIRKEDAL, C *et al.* A dual inhibitor of FAAH and TRPV1 channels shows dose-dependent effect on depression-like behaviour in rats. **Acta Neuropsychiatrica** v.6, p.324-329, 2017.

KRUK-SLOMKA, M.; MICHALAK, A.; BIALA, G. Antidepressant-like effects of the cannabinoid receptor ligands in the forced swimming test in mice: Mechanism of action and possible interactions with cholinergic system. **Behavioural Brain Research** v. 284, p. 24–36 , 2015.

LISBOA, S. F. *et al.* Cannabinoid CB1 receptors in the dorsal hippocampus and prelimbic medial prefrontal cortex modulate anxiety-like behavior in rats: Additional evidence. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry** v. 59, p. 76–83 , 2015.

LLORENTE-BERZAL, A. *et al.* Neurobehavioral and metabolic long-term consequences of neonatal maternal deprivation stress and adolescent olanzapine treatment in male and female rats. **Neuropharmacology** v. 62, n. 3,

p. 1332–1341 , 2012.

LLORENTE, R. *et al.* Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: A possible role for the endocannabinoid system. **Developmental Neurobiology** v. 68, n. 11, p. 1334–1347 , 2008.

MAIONE, S. *et al.* Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. **British journal of pharmacology** v. 150, n. 6, p. 766–81 , 2007.

MARCO, E M *et al.* Consequences of early life stress on the expression of endocannabinoid-related genes in the rat brain. **Behav Pharmacol** v. 25, n. 5–6, p. 547–556 , 2014.

MARCO, E. M. *et al.* Emotional, endocrine and brain anandamide response to social challenge in infant male rats. **Psychoneuroendocrinology** v. 38, n. 10, p. 2152–2162 , 2013.

MARCO, E. M. *et al.* Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. **Neuropharmacology** v. 68, p. 223–231 , 2013b.

MARTIN, M. *et al.* Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. **Psychopharmacology** v. 159, n. 4, p. 379–387, 2002.

HILL, M. N. *et al*. Serum Endocannabinoid Content is Altered in Females with Depressive Disorders: A Preliminary Report. **Pharmacopshychiatry** v. 41, n. 2, p. 48–53 , 2012.

HILL, M. N. *et al*. Circulating Endocannabinoids and N-Acyl Ethanolamines Are Differentially Regulated in Major Depression and Following Exposure to Social Stress. **Psychoneuroendocrinology** v. 34, n. 8, p. 1257–1262 , 2010.

MCLAUGHLIN, R. J. *et al.* Upregulation of CB1 receptor binding in the ventromedial prefrontal cortex promotes proactive stress-coping strategies following chronic stress exposure. **Behavioural Brain Research** v. 237, n. 1, p. 333–337 , 2013.

MCLAUGHLIN, R. J. *et al.* Local enhancement of cannabinoid CB1 receptor signalling in the dorsal hippocampus elicits an antidepressant-like effect. **Behavioural pharmacology** v. 18, n. 5–6, p. 431–438 , 2007.

MCLAUGHLIN, R. J; HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. Neuroscience and Biobehavioral Reviews A critical role for prefrontocortical endocannabinoid signaling in the regulation of stress and emotional behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** v. 42, p. 116–131 , 2014.

MICALE, V. *et al.* Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide

hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. **Neuropsychopharmacology** v. 34, p. 593–606 , 2009.

MOREIRA, F. A. *et al.* Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? **Neuroscience** v. 204, p. 186–192 , 2012.

MOREIRA, F. A. *et al.* Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. **Neuropharmacology** v. 54 , p. 141-150, 2008.

MOREIRA, F. A. *et al.* Endocannabinoids and striatal function. **Behavioural Pharmacology** v. 26, p. 59–72 , 2015.

MOREIRA, F. A.; LUTZ, B. The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. **Addiction Biology** v. 13, n. 2, p. 196–212, 2008.

MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. **Neuropharmacology** v. 52, n. 3, p. 958–965 , 2007.

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

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

NAVARRIA, A. *et al.* The dual blocker of FAAH/TRPV1 N-arachidonoylserotonin reverses the behavioral despair induced by stress in rats and modulates the HPA-axis. **Pharmacological research** v. 87, p. 1–9 , 2014.

ONAIVI, E. S. *et al.* Methods to study the behavioral effects and expression of CB2 cannabinoid receptor and its gene transcripts in the chronic mild stress model of depression. **Methods in molecular medicine** v. 123, p. 291–8 , 2006.

ONAIVI, E. S. *et al.* Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: From mice to human subjects. **PLoS ONE** v. 3, n. 2 , 2008.

ORTAR, G. *et al.* New N -Arachidonoylserotonin Analogues with Potential “ Dual ” Mechanism of Action against Pain. **Journal of Medicinal Chemistry** v. 50, n. 26, p. 6554–6569 , 2007.

PARONE, P. A. *et al.* Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes and astrocytomas. v. 58, n. 1, p. 1017–1030 , 2013.

PATEL, S. *et al.* Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. **European Journal of**

Neuroscience v. 21, n. 4, p. 1057–1069 , 2005.

POLLAK, D. D.; REY, C. E.; MONJE, F. J. Rodent models in depression research: Classical strategies and new directions. **Annals of Medicine** v. 42, n. 4, p. 252–264 , 2010.

PORSOLT, R. D. *et al.* Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European journal of pharmacology** v. 47, n. 4, p. 379–391 , 1978.

PORSOLT, R D; LE PICHON, M; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature** v. 266, n. 5604, p. 730–732 , 1977.

POST, R. Transduction of Psychosocial of Neurobiology of Recurrent Affective Disorder. **Am J Psychiatry** v. 149, p. 999–1010 , 1992.

RADEMACHER, D. J. *et al.* Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. **Neuropharmacology** v. 54, n. 1, p. 108–116 , 2008.

RIBEIRO, A. *et al.* Dose-response effects of systemic anandamide administration in mice sequentially submitted to the open field and elevated plus-maze tests. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 42, n. 6, p. 556–560 , 2009.

ROMANO-LÓPEZ, A. *et al.* Maternal separation and proclivity for ethanol intake: A potential role of the endocannabinoid system in rats. **Neuroscience** v. 223, p. 296–304 , 2012.

ROSS, R. A. *et al.* Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens. **British Journal of Pharmacology** v. 132, n. 3, p. 631–640 , 2001.

ROSS, R. A. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. **British journal of pharmacology** v. 140, n. 5, p. 790–801, 2003.

RUBINO, T. *et al.* Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. **Cerebral Cortex** v. 18, n. 6, p. 1292–1301 , 2008.

SAITO, V. M.; WOTJAK, C. T.; MOREIRA, F. A. Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide : novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão ? Pharmacological exploitation of the endocannabinoid system : new perspectives for the treatment of depression and anxiety? **Revista Brasileira de Psiquiatria** v. 32, p. 7–14 , 2010.

SARTIM, A. G., MOREIRA, F. A., JOCA, S. R. L. Involvement of CB1 and TRPV1 receptors located in the ventral medial prefrontal cortex in the modulation of

stress coping behavior. **Neuroscience** v. 340, p. 126–134, 2016.

SAVEANU, R. V.; NEMEROFF, C. B. Etiology of Depression: Genetic and Environmental Factors. **Psychiatric Clinics of North America** v. 35, n. 1, p. 51–71 , 2012.

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. The ups and downs of modelling mood disorders in rodents. **ILAR Journal** v. 55, n. 2, p. 297–309 , 2014.

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature Protocols** v. 7, n. 6, p. 1009–1014 , 2012.

SOCAŁA, K.; WLAŹ, P. Evaluation of the antidepressant- and anxiolytic-like activity of α-spinasterol, a plant derivative with TRPV1 antagonism effects, in mice. **Behavioural Brain Research** v. 303, p. 19-25, 2016.

STAROWICZ, K.; NIGAM, S.; DI MARZO, V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. **Pharmacology and Therapeutics** v. 114, n. 1, p. 13–33 , 2007.

SUÁREZ, J. *et al.* Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB1 and CB2 cannabinoid receptors of neonatal rats. **Hippocampus** v. 19, n. 7, p. 623–632 , 2009.

SUGIURA, T *et al.* 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain .**Biochem Biophys Res Commun**. v. 215, n. 1, p. 89-97, 1995.

SULLIVAN, P. F.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. Genetic epidemiology of major depression: Review and meta-analysis. **American Journal of Psychiatry** v. 157, n. 10, p. 1552–1562 , 2000.

SUMAN, P. R. *et al.* Failure to detect the action of antidepressants in the forced swim test in Swiss mice. **Acta Neuropsychiatrica** p. 1–10 , 2017.
TILLMANN, S. Mind the gap – towards complete and transparent reporting of animal research. **Medical Writing** v. 26, n. 4, p. 24–27 , 2017.

TOPOL, E. J. *et al.* Rimonabant for prevention of cardiovascular events (CRESCENDO): A randomised, multicentre, placebo-controlled trial. **The Lancet** v. 376, n. 9740, p. 517–523, 2010.

TÓTH, A. *et al.* Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. **Molecular Brain Research** v. 135, n. 1–2, p. 162–168 , 2005.

TÓTH, A.; BLUMBERG, P. M.; BOCZÁN, J. Chapter 15 Anandamide and the Vanilloid Receptor (TRPV1). **Vitamins and Hormones** v. 81, p. 389–419 , 2009.

VILELA, L. R *et al.* Anticonvulsant Effects of N -Arachidonoyl-Serotonin , a Dual Fatty Acid Amide Hydrolase Enzyme and Transient Receptor Potential Vanilloid

Type-1 (TRPV1) Channel Blocker, on Experimental Seizures : The Roles of Cannabinoid CB1 Receptors and TRPV1 Channels. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology** v. 1, p. 330–334 , 2014.

WANG, S. E. *et al.* TRPV1 Regulates Stress Responses through HDAC2. **Cell Reports** v. 19, n. 2, p. 401–412 , 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mental disorders.** 2015. Disponível em: < http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs396/en/ > Acessado em 10 de outubro de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global burden of mental disorders and the need for a comprehensive, coordinated response from health and social sectors at the country level. p. 1–6 , 2011. Disponível em: <http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB130/B130_9-en.pdf>.

YAN, H. C. *et al.* Behavioral animal models of depression. **Neuroscience bulletin** v. 26, n. 4, p. 327–337 , 2010.

YIN, X.; GUVEN, N.; DIETIS, N. Stress-based animal models of depression: Do we actually know what we are doing? **Brain Research** v. 1652, p. 30–42 , 2016.

YOU, I. J. *et al.* Alterations in the emotional and memory behavioral phenotypes of transient receptor potential vanilloid type 1-deficient mice are mediated by changes in expression of 5-HT 1A, GABA A, and NMDA receptors. **Neuropharmacology** v. 62, n. 2, p. 1034–1043 , 2012.

Anexo

Anexo I

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que o adendo da proposta intitulada "Avaliação do efeito tipo-antidepressivo de aracdonoil-serotonina (AA-5HT) no teste do nado forçado", registrada sob nº 16.1.261.60.0, sob a responsabilidade de Kennia Moura Silveira e Sâmia R. Lourenço Joca, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado na reunião de 14/12/2017 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	24/05/16 a 23/07/2017
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de animais	264
Peso/Idade	25 a 30g/ 6 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP RP

Ribeirão Preto, 18 de dezembro de 2017.

Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comissão de Ética no Uso de Animais – ceua@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3315-8559 – Fax: (16) 33152-4892