UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeitos da administração de canabidiol no CPFmv de ratos submetidos ao teste do nado forçado

Ariandra Guerini Sartim

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeitos da administração de canabidiol no CPFmv de ratos submetidos ao teste do nado forçado

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado(a): Ariandra Guerini Sartim

Orientador(a): Profª Drª Sâmia Regiane Lourenço Joca

Ribeirão Preto

2013

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.

Sartim, Ariandra Guerini

Efeitos da administração de canabidiol no CFPmv de ratos submetidos ao teste do nado forçado, 2013.

72p. 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. Canabidiol. 2. Córtex pré-frontal. 3. Nado forçado.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ariandra Guerini Sartim

Efeitos da administração de canabidiol no CPFmv de ratos submetidos ao teste do nado forçado

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador(a): Profª Drª Sâmia Regiane Lourenço Joca

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus exemplos:

Meus pais, Ademir e Catarina, pelo amor incondicional ao longo de toda a minha vida;

Meu marido, Marco Aurélio, pelo incentivo, companheirismo e amor;

Dedico esse trabalho.

Agradecimentos

À Profª Drª Sâmia Joca, por ter confiado em mim antes mesmo de me conhecer. À minha “chefa” pela excelente orientação ao longo desses dois anos, sempre demonstrando carinho e preocupação com a minha formação.

Ao Profº Drº Francisco Guimarães, pela colaboração no trabalho e pelas frequentes discussões em reuniões e seminários.

A todos os pós-graduandos e técnicos do Departamento de Farmacologia da FCFRP e FMRP pelo excelente convívio.

Aos amigos do laboratório, Amanda, Angélica, Cassiano, Carol, Deidiane, Karina, Laura, Letícia, Michele, Murilo, Plínio, Rafa, Vinícius e Vitor, pela parceria e ajuda mútua. Vocês tornam meu dia a dia mais feliz!

À técnica do laboratório, Flávia Sallata, por ajudar na rotina do laboratório, tornando possível a realização dos experimentos. Assim como à D. Nina, por colaborar nesse processo.

À Marlene, pela boa vontade com que sempre faz seu trabalho, ajudando com qualquer documentação necessária.

À agência de fomento à pesquisa, FAPESP, pelo apoio financeiro.

À minha irmã, Brena, que mesmo de longe se mantém tão presente. Juntamente com as minhas amigas de Vitória, que se tornam meu refúgio em períodos de férias.

Aos meus pais. Como encontrar palavras para agredecê-los? Obrigada por, muitas vezes, abrirem mão dos seus desejos para realizar os meus. E por me ensinarem que “Nada cai do céu”, mas que com dedicação podemos alcançar nossos objetivos.

Ao meu marido, Marco Aurélio, por ter me apresentado à ciência. Você foi o primeiro responsável por tudo isso! Obrigada pela paciência e incentivo ao longo desses anos e, especialmente, nesses meses finais “pré-defesa”.

Esse trabalho não teria sido realizado sem a ajuda e apoio de todos vocês.

Obrigada!

“Em primeiro lugar vem a dedicação, depois a habilidade”

Leonardo Da Vinci

RESUMO

SARTIM, A. G. **Efeitos da administração de canabidiol no CPFmv de ratos submetidos ao teste do nado forçado.** 2013. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A administração sistêmica de canabidiol (CBD), o principal constituinte não psicomimético da *Cannabis sativa*, induz efeito antidepressivo em modelos pré-clínicos. O mecanismo de ação do canabidiol, no entanto, permanece pouco conhecido, podendo envolver a ativação de receptores serotoninérgicos do tipo 1A (5-HT1A). Ademais, as estruturas encefálicas envolvidas nesses efeitos permanecem desconhecidas. O córtex pré-frontal medial ventral (CPFmv), dividido em infra-límbico (IL) e pré-límbico (PL), recebe densa inervação serotoninérgica e desempenha importante papel na modulação da resposta emocional ao estresse e na neurobiologia da depressão. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a hipótese de que a administração de canabidiol no CPFmv, diferenciado em PL e IL, produz efeito tipo-antidepressivo por meio da ativação de receptores 5-HT1A. Para tanto, ratos Wistar canulados bilateralmente no CPFmv, receberam CBD (10, 30, 60 nmol/0,2µl) ou veículo intra-PL e CBD (30, 45 e 60nmol/0,2µl) ou veículo intra-IL e foram submetidos ao teste do nado forçado ou ao teste do campo aberto. Outro grupo de animais recebeu microinjeção (intra PL ou IL) do agonista de receptores 5-HT1A, 8-OH-DPAT (5, 10nmol/0,2µl) e foram submetidos aos mesmos testes. Um grupo adicional recebeu um antagonista 5-HT1A, WAY1006365 (10, 30nmol/0,2µl), seguido pela administração de 8-OH-DPAT (10nmol0,2µl) ou CBD (10 nmol0,2µl) intra-PL, ou 8-OH-DPAT (10nmol0,2µl) ou CBD (45 nmol0,2µl) intra-IL, e avaliados no teste do nado forçado. Os resultados demonstraram que a administração de CBD e de 8-OH-DPAT, intra-PL e intra-IL, reduziu significativamente o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, um efeito tipo-antidepressivo, sem alterar a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto. Além disso, a administração de WAY100635 intra-PL e intra-IL não alterou o tempo de imobilidade per se, mas foi capaz de bloquear os efeitos da administração do CBD e do 8-OH-DPAT. Esses resultados sugerem que a administração local do CBD no CPFmv induz efeito tipo-antidepressivo por meio da ativação de receptores 5-HT1A. Portanto, é possível que o CPFmv esteja envolvido no efeito tipo-antidepressivo induzido pelo CBD.

Palavras-chave: canabidol, córtex pré-frontal medial ventral, depressão.

ABSTRACT

SARTIM, A. G. **Effects of cannabidiol administration into the vmPFC of rats submitted to the forced swimming test**. 2013. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Systemic administration of cannabidiol (CBD), the main non-psychotomimetic constituent of *Cannabis sativa*, induces antidepressant-like effects in pre-clinical models. The mechanism of action of Cannabidiol, which remains poorly understood, may involve serotonergic type 1A receptors activation (5-HT1A). Furthermore, the brain structures involved in these effects are still unknown. The ventral medial prefrontal cortex (vmPFC), divided in infra-limbic (IL) and pre-limbic (PL) subregions, receives dense serotonergic innervation and plays an important role in the modulation of emotional responses to stress and in the neurobiology of depression. Thus, the aim of this study was evaluate the hypothesis that the administration of cannabidiol into the vmPFC, differentiated into IL and PL, would induce antidepressant-like effect by activating 5-HT1A receptors. Therefore, male Wistar rats with cannulae bilaterally implanted into the Il and PL were given CBD (10, 30, 45, 60 nmol/0,2µl) or vehicle and were submitted to the forced swimming test or to the open field test. Another group of animals received microinjections (intra PL or IL) of the 5-HT1A agonist 8-OH-DPAT (5, 10nmol/0,2µl) and was submitted to the same tests. An additional group received an 5-HT1A antagonist, WAY100635 (10, 30 nmol/0,2µl.), followed by the administration of 8-OH-DPAT (10 nmol/0,2µl) or CBD (10 nmol0,2µl) intra-PL, or 8-OH-DPAT (10nmol0,2µl) or CBD (45 nmol0,2µl) intra-IL, and avaluated in the forced swimming test. The results showed that CBD and 8-OH-DPAT administration, intra-PL and intra-IL, significantly reduced the immobility time in the forced swimming test, an antidepressant-like effect, without changing the locomotor activity of the animals in the open field test. Moreover, the administration of WAY100635, intra-PL and intra-IL, did not change the immobility time per se, but blocked the CBD- and 8-OH-DPAT-induced effects. These results suggest that the local administration of CBD into the vmPFC induces antidepressant-like effects through the activation of 5-HT1A receptors. Therefore, it is possible that the vmPFC is involved in CBD-induced antidepressant-like effect.

Keywords: cannabidiol, ventromedial prefrontal córtex, depression

LISTA DE ABREVIATURAS

AEA – anandamida

2-AG – 2-araquidonoilglicerol

CBD – canabidiol

CB1 – receptores canabinóides do tipo 1

CB2 - receptores canabinóides do tipo 2

CPFm – córtex pré-frontal medial

CPFmv – córtex pré-frontal medial ventral

Eixo HPA – eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

FCFRP-USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

GABA – ácido gama-amino-butírico

5-HT - serotonina

5-HT1A – receptores serotoninérgicos do tipo 1A

IL – infra-límbico

ISRS – inibidores seletivos da recatação de serotonina

NMDA – n-metil-d-aspartato

PL – pré-límbico

SNC – sistema nervoso central

Δ9-THC - Δ9-tetrahidrocanabinol

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Representação da região de microinjeção no córtex pré-frontal medial ventral, pré-límbico e infra-límbico, baseado no atlas Paxinos e Watson 2005.....27

Fig. 2. Efeitos da administração de CBD, intra-PL, nas doses de 10, 30 e 60 nmol/0,2µl/lado (7-13 animais por grupo) sobre o tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado 28

Fig. 3. Efeitos da administração de CBD, intra-IL, nas doses de 30, 45 e 60 nmol/0,2µl/lado (7-10 animais por grupo) sobre o tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado 29

Fig. 4. Efeitos da administração de canabidiol (10, 30, 60 nmol/0,2µl/lado), intra-PL, sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto 30

Fig. 5. Efeitos da administração de canabidiol (30, 45 e 60 nmol/0,2µl/lado), intra-IL, sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto 31

Fig. 6. Efeitos da administração de 8-OH-DPAT, nas dose de 5 e10nmol/0,2µl/lado, intra-PL (5-8 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado 32

Fig. 7. Efeitos da administração de 8-OH-DPAT, nas doses de 5 e10nmol/0,2µl/lado, intra-IL (4-6 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado 33

Fig. 8. Efeitos do pré-tratamento com WAY 100635, nas doses de 10 e 30 nmol/0,2µl/lado sobre os efeitos do 8-OH-DPAT (10 nmol/0,2µl/lado), intra-PL, no tempo de imibilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado.....34

Fig. 9. Efeitos do pré-tratamento com WAY 100635, nas doses de 10 e 30 nmol/0,2µl/lado sobre os efeitos do 8-OH-DPAT (10 nmol/0,2µl/lado), intra-IL, no tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado 35

Fig. 10. Efeitos da administração de 8-OH-DPAT, nas dose de 5 e10nmol/0,2µl/lado, ou WAY100635, na dose de 30 nmol/0,2µl/lado, intra-PL, sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto 36

Fig. 11. Efeitos da administração de 8-OH-DPAT, na dose 10nmol/0,2µl/lado, ou WAY100635, na dose de 30 nmol/0,2µl/lado, intra-IL, sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto 37

Fig. 12. Efeitos do pré-tratamento com WAY 100635, nas doses de 10 e 30 nmol/0,2µl/lado sobre os efeitos do CBD (10 nmol/0,2µl/lado), intra-PL, no tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado 38

Fig. 13. Efeitos do pré-tratamento com WAY 100635, na dose de 30 nmol/0,2µl/lado sobre os efeitos do CBD (45 nmol/0,2µl/lado), intra-IL, no tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado 39

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO 2
1.1 *Cannabis sativa* e canabidiol 2
1.2 Estresse e depressão 5
1.3 Modelos animais de depressão 8
1.3.1 Teste do nado forçado 9
1.4 Córtex pré-frontal medial ventral e depressão 10
1.5 Sistema serotoninérgico e depressão 12
1.6 Hipótese 15

2 OBJETIVOS 18
2.1 Objetivo geral 18
2.2 Objetivos específicos 18

3 MATERIAL E METODOS 20
3.1 Animais 20
3.2 Drogas 20
3.3 Procedimentos experimentais 21
3.3.1 Cirurgia estereotáxica e administração intracerebral de drogas 21
3.3.2 Análise histológica do sítio de injeção 21
3.3.3 Teste do nado forçado 22
3.3.4 Teste do campo aberto 22
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL 23
3.5 Análise estatística 25

4 RESULTADOS 27
4.1 Localização dos sítios de injeção 27
4.2 Experimento 1: efeitos da administração de canabidiol (10, 30, 45 e 60nmol) no PL e no IL de animais submetidos ao teste do nado forçado 28
4.3 Experimento 2: efeitos da administração de canabidiol no PL e no IL sobre a atividade locomotora de animais submetidos ao teste do campo aberto 30
4.4 Experimento 3: efeitos da administração de agonista 5-HT1A no PL e no IL sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado 32

4.5 Experimento 4: efeito do pré-tratamento com antagonista 5-HT1A no CPFmv, PL e IL, sobre o efeito induzido pela administração local de agonista desses receptores, em ratos submetidos ao teste do nado forçado.....34

4.6 Experimento 5: efeitos da administração de 8-OH-DPAT e de WAY100635, no PL e IL, sobre a atividade motora de animais submetidos ao teste do campo aberto 36

4.7 Experimento 6: participação de receptores 5HT1A nos efeitos induzidos pela administração de canabidiol no PL e IL.....38

5 DISCUSSÃO 40

6 CONCLUSÃO 50

REFERÊNCIAS.....52

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Cannabis sativa* e canabidiol

A planta *Cannabis sativa* vem sendo usada para fins medicinais há milhares de anos (Zuardi, 2006). Relatos indicam que cerca de mil anos antes de Cristo os indianos já usavam a planta para o tratamento de ansiedade, mania, histeria e depressão (Mechoulam, 1970; Russo and Guy, 2006). Seu uso difundiu-se gradualmente para o Oriente Médio, chegando à Europa nos fins do século XVIII, passando pelo norte da África e atingindo as Américas (Moreau, 2003). No início do século XX, na América do Norte e Europa, ocorreu um aumento repentino e relevante de seu consumo com finalidade recreativa entre os jovens da sociedade (Bonfá et al., 2008). Paralelamente, no decorrer desse período, ocorreu o declínio do uso da droga para fins terapêuticos devido ao fato de que os princípios ativos da planta ainda não haviam sido isolados e os extratos variavam em potência e composição, gerando, muitas vezes, efeitos indesejáveis (Zuardi, 2006). No entanto, o interesse científico pela planta foi renovado na década de 60 quando o Δ9-tetrahidrocanabinol (Δ9-THC) foi isolado e identificado quimicamente como o principal componente psicoativo da *Cannabis sativa* (Gaoni and Mechoulam, 1964). Além disso, na década de 90, a descoberta de receptores canabinóides, onde o Δ9-THC atua para promover seus efeitos, impulsionou novos estudos sobre a existência de ligantes endógenos naturais para esses receptores, levando, assim, à identificação do sistema endocanabinóide no encéfalo (Devane et al., 1988; Moreau, 2003; Zuardi, 2006). Assim, o melhor entendimento das bases moleculares e das funções da sinalização do sistema endocanabinóide, impulsionou o interesse em avaliar o potencial terapêutico de substâncias canabinóides (Castillo et al., 2012; Moreau, 2003).

Atualmente sabe-se que o sistema endocanabinóide é constituído por pelo menos dois receptores acoplados à proteína G, denominados CB1 e CB2; agonistas endógenos desses receptores, especialmente anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG); e enzimas de síntese e degradação que controlam os níveis endógenos dos endocanabinóides (Castillo et al., 2012). Os endocanabinóides, além de ativarem receptores CB1 e CB2, também são capazes de se ligar a outros alvos farmacológicos como receptores vanilóides (especialmente

TRPV1) e receptores acoplados à proteína G55 (GPR55) (Ross, 2003; Baker et al., 2006).

Os endocanabinóides pertencem à classe dos neurotransmissores atípicos. São sintetizados na membrana neuronal pós-sináptica e liberados, sob demanda, em resposta a um estímulo fisiológico, como a despolarização neuronal. Uma vez liberados na fenda sináptica, os endocanabinoídes atuam de maneira retrógrada, como agonistas em receptores CB1 localizados no terminal pré-sináptico (Christie and Vaughan, 2001). Uma vez que esses receptores são acoplados à proteína G inibitória, o resultado final da sua ativação é a inibição da despolarização neuronal e diminuição da liberação de neurotrasmissores, tanto inibitórios (ex. ácido gama-amino-butírico - GABA) quanto excitatórios (ex. glutamato) (Katona et al., 1999; Maejina et al., 2001). Dessa forma, o sistema endocanabinoíde atua como um regulador de funções sinápticas através de todo o sistema nervoso central (SNC), sendo que a sua desregulação pode favorecer o aparecimento de condições neuropsiquiátricas como depressão e ansiedade (Bambico et al, 2007; Kathuria et al., 2003).

A *Cannabis sativa* é composta por mais de 400 diferentes compostos, sendo 61 da classe dos canabinóides, dos quais o Δ9-THC e o canabidiol são os que se apresentam em maior quantidade (Mechoulam et al, 1970; Ameri, 1999; Moreau, 2003; Mechoulam, 2010).

A farmacologia do Δ9-THC tem sido amplamente estudada, sendo que a maioria dos seus efeitos é atribuída, especialmente, à ativação de receptores canabinóides (CB1), um subtipo de receptores acoplados à proteína Gi, localizados pré-sinapticamente, capazes de modular neurotransmissões centrais e periféricas (Mechoulam and Lichtman, 2003; Braida et al., 2007). A ativação desses receptores leva a inibição da enzima adenilato ciclase e consequente diminuição da produção do segundo menssageiro AMP cíclico, além de promover o fechamento de canais de Ca^{2+} e abertura dos canais de potássio nos terminais axônicos, hiperpolarizando o terminal pré-sináptico e levando à diminuição da liberação de vários neurotransmissores (Ameri, 1999). Os receptores CB1 são os principais receptores canabinóides expressos em neurônios sendo amplamente distribuídos pelo SNC. Regiões encefálicas como o estriado, o cerebelo e estruturas límbicas como o hipocampo e o córtex, possuem alta densidade de receptores CB1 (Ameri, 1999). O

córtex, em especial, possui elevados níveis de receptores CB1 em todas as suas subáreas, como o neocórtex e o córtex pré-frontal (Matsuda et al., 1993).

O canabidiol, por outro lado, é o principal constituinte não psicomimético da *Cannabis sativa* que, além de promover efeitos diferentes dos induzidos pela administração de Δ9-THC, ainda é capaz de inibir algumas alterações comportamentais induzidos pelo Δ9-THC, como a catalepsia em ratos e efeitos ansiogênicos em humanos (Zuardi et al., 1982; Russo and Mcpartland, 2003). Além disso, o CBD possui diversos efeitos farmacológicos sendo, por isso, bastante explorado para aplicações terapêuticas (Pertwee, 2004).

Em 1990, Guimarães e colaboradores investigaram o potencial ansiolítico do CBD em animais submetidos ao modelo animal do labirinto em cruz elevado e demonstraram que a administração sistêmica desse composto promove efeito ansiolítico (Guimarães et al, 1990). Corroborando essa hipótese, Resstel e cols. (2009) demonstraram que a administração sistêmica de CBD reduz as respostas fisiológicas e emocionais associadas ao estresse por restrição. Além disso, Zuardi e colaboradores, em 1993, demonstraram, também em humanos, que o CBD alivia a ansiedade induzida pelo teste de simulação de falar em público (Zuardi et al, 1993). Há evidências de que o efeito ansiolítico produzido pelo CBD em humanos seja mediado por áreas cerebrais límbicas e paralímbicas (Cripa et al, 2004). Além de ansiolítico, o CBD também induz efeito neuroprotetor, analgésico e anti-inflamatório (Hampson et al. 1998; Karst et al. 2003; Malfait et al. 2000; Guimarães et al, 1990). Mais recentemente, nosso grupo demonstrou que a administração sistêmica de CBD induz efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos ao teste do nado forçado (Zanelati et al, 2010), indicando dessa forma, um elevado potencial terapêutico no tratamento da depressão, o que impulsiona a investigação das vias neurais e mecanismos de ação envolvidos nessa resposta.

O mecanismo de ação do canabidiol é complexo e ainda não está completamente entendido. Particularmente, o CBD possui pequena afinidade por receptores CB1 e há evidências de que possa se comportar como um antagonista ou agonista inverso nesses receptores (Thomas et al, 1998; Petitet et al., 1998). No entanto, o CBD, parece ser capaz de facilitar a neurotransmissão endocanabinóide por bloquear a recaptação e impedir a hidrólise da anandamida (Bisogno et al, 2001). Além disso, o CBD atua como um antagonista de receptores de adenosina A2A (Magen et al., 2009) e ainda é capaz de afetar a excitabilidade neuronal por

modular canais iônicos voltagem-dependentes (Ross et al., 2008). Recentes estudos têm destacado que o CBD também ativa canais TRPV1 e TRPV2 (Costa et al., 2004; Qin et al., 2008). O CBD demonstra, ainda, capacidade de se ligar em receptores serotoninérgicos do tipo 1A (5HT1A), onde atua como agonista (Russo et al, 2005; Hayakawa et al., 2007; Campos and Guimarães, 2008; Resstel et al., 2009).

Em relação a respostas comportamentais, Casarotto e colaboradores, em 2010, demonstraram que a atenuação do comportamento compulsivo, decorrente da administração sistêmica de CBD, em ratos submetidos ao teste do marble-burying, envolve a ativação de receptores canabinóides CB1 (Casarotto et al., 2010). Enquanto que, por outro lado, Resstel e colaboradores em 2009 observaram que o efeito ansiolítico decorrente da administração sistêmica de CBD, em ratos submetidos ao teste de estresse de restrição agudo, depende da ativação de receptores serotoninérgicos 5-HT1A. Nesse mesmo sentido, Zanelati e colaboradores (2010) relataram que o efeito tipo antidepressivo do CBD, quando administrado sistemicamente a animais submetidos ao teste do nado forçado é bloqueado pelo pré-tratamento com antagonista 5-HT1A, ficando evidenciada uma possível interação entre CBD e 5HT1A na mediação de seus efeitos antidepressivos (Zanelati et al, 2010).

1.2 Estresse e depressão

A depressão representa a desordem de humor mais comum, se diferenciando de uma simples tristeza pela presença e duração de sintomas específicos (Willner et al., 2012). Segundo o DSM-IV-TR (Manual de Diagnóstico e Estatísticas de Doenças Mentais - Quarta edição – Texto Revisado), os principais sintomas da depressão incluem: anedonia, alteração no apetite, dificuldade de se concentrar, sentimento de culpa e pensamento suicida. São classificados como indivíduos deprimidos aqueles que apresentam pelo menos quatro dos sintomas acima listados, com uma durabilidade de pelo menos 2 semanas consecutivas.

A depressão maior é um transtorno afetivo que está entre as dez maiores causas de debilitação no mundo, sendo classificada pela Organização Mundial da Saúde como a quarta maior causa de incapacitação (Kalia, 2005).

A vulnerabilidade à depressão varia consideravelmente entre indivíduos de uma população, porque tal desordem depende da associação entre fatores

genéticos e ambientais (Nestler et al, 2002). Tal desordem é considerada hereditária, uma vez que cerca de 40-50% do risco para depressão é genético, apesar de ser fortemente modulada pelo ambiente (Sanders et al, 1999) . Diversos fatores ambientais influenciam no desencadeamento da doença, sendo que o estresse, especialmente de origem psicosocial, parece ser um dos principais. Em mais da metade dos casos, as crises depressivas são precedidas pela exposição a evento estressante (Post, 1992).

Desde a década de 1970 estudos destacam a importância de eventos estressantes como desencadeadores da depressão em indivíduos predispostos a desenvolver a desordem (Brown and Harris, 1978). O estresse, de qualquer origem, química, física ou psicológica, induz alterações fisiológicas no organismo com o objetivo de promover adaptação. Se a exposição a esse evento for prolongada ou muito severa, as adaptações podem não ocorrer e desencadear distúrbios psiquiátricos, como a depressão (McEwen, 2000; Joca et al., 2003). Além disso, pacientes pré-dispostos geneticamente a desenvolver depressão, parecem ter um aumento na sensibilidade a eventos estressantes (Kendler et al., 1995).

A exposição do indivíduo a agentes estressantes leva a alterações funcionais em diferentes sistemas de neurotransmissão, peptídeos e hormônios de manter a homeostase do organismo (Castren 2005, Wurtman 2005, Joëls and Baram 2009, Price and Drevets 2010). Um dos principais sistemas mobilizados sob essas condições é o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA) (Schwabe, 2011). Dentre as respostas da ativação do eixo HPA, está a liberação de glicocorticoides, a partir da glândula adrenal, que prepara o organismo para alterações fisiológicas necessárias durante o estresse e que otimizam o desempenho do indivíduo frente ao mesmo (Peeters and Broekkamp, 1994). Essa resposta está sob controle inibitório dos próprios glicocorticóides que realizam retroalimentação negativa sobre a atividade do eixo através da ativação de receptores específicos (GR e MR) localizados em diferentes locais do SNC. No entanto, a exposição prolongada ao estresse e/ou comprometimento do controle da atividade do eixo HPA pode levar a níveis excessivos de glicocorticóides e outros mediadores da resposta ao estresse e ocasionar prejuízos funcionais e alterações plásticas em estruturas que são importantes para a regulação do afeto e do humor. Como consequência de todo esse processo, o estresse pode exercer diversos efeitos na emoção e cognição (Holsboer et al., 1995).

Nesse sentido, inúmeras evidências tem revelado que a exposição ao estresse pode comprometer o funcionamento de vias monoaminérgicas no SNC, bem como promover alterações plásticas em estruturas límbicas, tais como redução da arborização dendrítica no córtex pré-frontal (CPF) e no hipocampo, redução da neurogênese no hipocampo e alterações na plasticidade sináptica no CPF, no hipocampo e na amígdala (Huether et al., 1999; Post, 1992). Há dados indicando que tais alterações seriam dependentes da liberação de glicocorticóides que ocorre durante a exposição ao estresse (Herman and Cullinan, 1997). Acredita-se que tais alterações estariam relacionadas a ocorrência de disfunções nessas estruturas límbicas que, consequentemente, comprometeriam a regulação dos diferentes estados emocionais, do afeto e do humor e, dessa maneira, tornaria o indivíduo mais susceptível ao desenvolvimento da depressão e outras desordens psiquiátricas (Castren, 2005; Price e Drevets, 2010).

Corroborando essa ideia, observa-se que a depressão é uma doença de elevada complexidade, estando associada a sintomas heterogêneos, além de envolver múltiplos circuitos cerebrais, corticais e subcorticais (Drevets, 2001). Estudos em animais e humanos têm relacionado diversas alterações à fisiopatologia da depressão, dentre elas: disfunções nas neurotransmissões serotoninérgica e noradrenérgica (Ruhe et al., 2007), aumento de citocinas pró-inflamatórias e desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA) (Lopez-Duran et al., 2009), além de mudanças estruturais e funcionais de regiões cerebrais como o hipocampo e CPF (Palazidou, 2012). Devido à influência desse conjunto de fatores, a depressão constitui uma desordem de difícil caracterização. Apesar disso, o desenvolvimento de novas ferramentas, como métodos de neuroimagem, favorece a identificação *in vivo* de alguns aspectos anatômicos, fisiológicos e neuroquímicos (Price and Drevets, 2010). Sabe-se que a depressão está associada a alterações funcionais e estruturais em diversas regiões cerebrais, além de sistemas de sinalização, neuroplasticidade e neuro-inflamação (Price and Drevets, 2010; Pittenger and Duman, 2008; Kubera et al., 2011; Marsden, 2011). De particular interesse para o presente trabalho, há evidências recentes indicando que tais alterações ocorrem frequentemente no CPF, onde teriam um papel determinante para o desenvolvimento da depressão.

1.3 Modelos animais de depressão

Os modelos animais de doenças mentais estão entre os modelos experimentais mais utilizados, uma vez que a abordagem clínica dessas desordens costuma ser difícil, além de o estudo dos fenômenos ser de extrema necessidade (Guimarães, 1993). Apesar da dificuldade de validação, atualmente são utilizados, na pesquisa, diversos modelos animais de depressão, para testar hipóteses fundamentais relativas à sua fisiopatologia.

O desenvolvimento de modelos animais é importante para favorecer o entendimento das bases moleculares, genéticas e epigenéticas que podem desencadear a depressão, além de possibilitar o entendimento da relação entre alterações genéticas e ambientais na patofisiologia da depressão. Assim, o uso desses modelos ainda é indispensável para a identificação de novas terapias para a depressão (Nestler et al, 2002).

Um dos maiores problemas para se desenvolver um modelo animal de depressão é a dificuldade, ou até mesmo a impossibilidade, de simular todas as mudanças comportamentais de humanos nos animais, uma vez que a depressão é uma desordem heterogênea e com sintomas centrais subjetivos (McArthur and Borsini, 2006). Por isso, foram estabelecidos critérios para validar os modelos animais de desordens psiquiátricas, que se dividem em: 1) Validade de face ou semelhança: similaridade entre o comportamento exibido pelo animal e sintomas específicos da desordem em humanos; 2) Validade de constructo: semelhança entre a interpretação teórica do modelo e os conhecimentos sobre a neurobiologia do distúrbio; 3) Validade preditiva: baseia-se no isoformismo farmacológico, quando um fármaco é efetivo na clínica e também no modelo animal (Markou et al., 1995).

A maioria dos modelos animais de depressão se baseia na exposição do animal a evento estressante. Nesta situação, alterações comportamentais são induzidas em animais pela exposição a uma situação aversiva incontrolável. Como resultado desse procedimento, o animal se torna desmotivado e apresenta alterações comportamentais, manifestadas por baixa capacidade de reação frente a nova situação aversiva, como a imobilidade no nado forçado ou falha em escapar de choques (Overmier and Seligman, 1967; Seligman and Beagly, 1975; Porsolt et al., 1977, 1978). O tratamento farmacológico com antidepressivos reduz tais mudanças comportamentais (Sherman et al., 1979; Porsolt et al., 1977, 1978).

É importante destacar que existem diferenças entre modelos e testes usados em animais. Para ser denominado modelo, o procedimento utilizado deve ser capaz de reproduzir no animal aspectos patológicos humanos, além de ter validade preditiva. Já o teste, por outro lado, demonstra apenas uma medida comportamental utilizada para avaliar os efeitos de uma manipulação farmacológica ou ambiental (Urani et al., 2005).

1.3.1 Teste do nado forçado

Dentre os testes comportamentais que avaliam o efeito tipo-antidepressivo, o teste do nado forçado é um dos mais amplamente utilizados, devido à sua elevada validade preditiva, além de baixo custo e fácil execução (Slattery and Cryan, 2012). O teste foi desenvolvido inicialmente por Porsolt e colaboradores baseado na observação de que animais expostos a um cilindro cheio de água, e na impossibilidade de sair, assumem, após um período inicial de comportamento de escape intenso, uma postura passiva de comportamento imóvel (Porsolt et al, 1977). Além disso, interessantemente, eles observaram que especificamente drogas antidepressivas eram capazes de reduzir o tempo de imobilidade dos animais, aumentando o comportamento de escape (Porsolt et al, 1977).

O protocolo do nado forçado tradicional desenvolvido por Porsolt era sensível a quase todos os antidepressivos, com exceção dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS). Devido a esse viés, Lucki e colaboradores promoveram algumas alterações nos parâmetros do teste a fim de aumentar a sensibilidade aos ISRSs (Lucki, 1997). Dessa forma, passou-se a distinguir entre dois tipos de comportamento de escape do animal durante o teste: a) climbing – movimentos verticais das patas dianteiras; b) swimming – movimentos horizontais através da natação (Detke and Lucki, 1996).

Além disso, estudos utilizando esse novo protocolo de teste detectaram que o comportamento ativo predominante adotado pelo rato estava sobre controle de diferentes sistemas de neurotransmissores. Observou-se que antidepressivos noradrenérgicos aumentavam o comportamento de climbing, enquanto que drogas serotoninérgicas aumentavam o comportamento de swimming (Cryan et al., 2002; Cryan et al., 2005; Detke and Lucki, 1996; Lucki, 1997). Dessa forma, o nado forçado modificado fornece uma informação adicional em relação ao possível novo

fármaco antidepressivo testado, sugerindo qual sistema neurotransmissor estaria predominantemente sendo modulado.

1.4 Córtex pré-frontal medial ventral e depressão

Os sistemas neurais e as estruturas cerebrais envolvidos em distúrbios de humor, como a depressão, são complexos e compreendem muitos locais no sistema nervoso central.

Por volta de 1930 e 1940 o circuito de controle emocional começou a ser identificado, sendo que o conjunto de estruturas cerebrais responsável pela expressão de emoções recebeu a denominação de “sistema límbico” (Price and Drevets, 2010). Inicialmente sabia-se que fazia parte deste sistema o hipocampo, amígdala, tálamo, giro cingulado e hipotálamo (Price and Drevets, 2010). Algum tempo depois, com o desenvolvimento de novos métodos de marcação e transporte axonal, ficou identificado que outras estruturas do SNC, como o córtex, são importantes no controle emocional, por possuir intensas e difusas conexões com estruturas do sistema límbico (Krettek and Price, 1977b). Atualmente sabe-se que o córtex pré-frontal medial (CPFm) é a região cortical mais amplamente conectada com o sistema límbico e, consequentemente, relacionado a desordens de humor (Carmichael and Price, 1995; Kondo et al, 2005). Nesse sentido, estudos de neuroimagem funcional e estrutural identificam estruturas como a amígdala, hipocampo, hipotálamo e CPFm como partes centrais de controle emocional (Price & Drevets, 2010). Dentre elas, o CPFm tem recebido especial atenção recentemente, estando envolvido na modulação autonômica e endócrina de respostas ao estresse (Czeh et al, 2008).

O CPFm de indivíduos com depressão demonstra alterações no volume de massa cinzenta, elementos celulares, atividade neurofisiológica, receptores farmacológicos e expressão gênica (Price and Drevets, 2010). Nesse sentido, estudos demonstram que indivíduos deprimidos apresentam um aumento nos níveis de atividade cerebral no córtex pré-frontal medial ventral (CPFMv) (Drevets, 1992; Biver, 1994; Mayberg, 2005; Greicius, 2007), que é demonstrada pelo aumento do metabolismo de glicose, que está intimamente relacionado ao aumento da transmissão glutamatérgica (Drevets et al, 2008). Paralelamente, observa-se uma redução no volume da substância cinzenta e elementos celulares (Drevets et al,

2008). Dados indicam que a redução do volume da matéria cinzenta ocorre em decorrência do hipermetabolismo da estrutura, uma vez que o excesso de neurotransmissão glutamatérgica pode ocasionar neurotoxicidade e desempenha um importante papel na neuropatologia da depressão (Drevets et al, 2012). Além disso, durante o tratamento com medicamentos antidepressivos, a recuperação dos sintomas está associada a uma diminuição na atividade do CPFmv (Mayberg, 2005; Brody et al., 2001; Mayberg et al., 1999; Mayberg et al., 2000). Ademais, pacientes com desordens de humor manifestam alterações morfológicas e funcionais no córtex pré-frontal medial (CPFm) (Drevets et al., 2008).

Analogamente, animais expostos a modelos de depressão, que envolvem a apresentação de estresse inescapável, apresentam alterações neuroquímicas e morfológicas no CPFm, as quais parecem estar associadas às alterações comportamentais observadas nesses animais, tais como a anedonia (Zanelati et al., 2010; Silva et al., 2012; Quan et al., 2011)

O córtex pré-frontal de ratos é usualmente dividido em três sub-regiões anatômica e funcionalmente distintas: (1) o córtex pré-frontal medial, (2) o córtex órbito-frontal e (3) córtex pré-frontal lateral (Groenewegen, 1988; Krettek and Price, 1977). O CPFm pode ser dividido em porção ventral e dorsal, sendo que as suas quatro regiões principais que são o córtex agranular medial, córtex cingulado anterior, pré-límbico e infra-límbico (Kesner and Churchwell, 2011). A região dorsal do CPFm está envolvida com diversos comportamentos motores, e a região ventral (PL e IL) tem sido associada a processos de cognição como aprendizagem, tomada de decisão e memória, estando anatômica e funcionalmente ligado ao sistema límbico (Verts, 2004).

As conexões aferentes primárias do CPFmv (PL e IL) incluem o tálamo, córtex entorrinal, hipocampo e amígdala (Kesner and Churchwell, 2011). Por outro lado, as conexões eferentes do PL incluem a parte ventro-medial do caudado-putamen, o centro do núcleo acúmbens e amígdala, enquanto que as projeções do IL se direcionam para a região medial do núcleo acúmbens e amígdala (Kesner and Churchwell, 2011). Nesse sentido, trabalhos recentes evidenciam que sendo citoarquitetonicamente diferentes, o PL e IL podem desempenhar papéis diferentes na resposta emocional, endócrina, autonômica e cognitiva ao estresse (Vertes, 2004; Barbas 1995; Hamani, 2010; Vidal-Gonzalez, 2006; Tavares, 2009; Radley, 2006; Marquis, 2007).

Diante de tais evidências, nosso grupo investigou os efeitos da inativação aguda temporária da transmissão sináptica no IL ou no PL na modulação das conseqüências comportamentais do estresse induzido pelo nado forçado em ratos. Os resultados obtidos demonstraram que a inativação do IL ou do PL induzem efeito tipo antidepressivo (Scopinho et al., 2010). Além disso, Hamani e colaboradores (2010) demonstraram que a inativação do córtex pré-frontal medial ventral leva a diminuição do tempo de imobilidade, em ratos submetidos ao modelo animal do nado forçado, um efeito tipo antidepressivo nesse modelo. A integridade do sistema serotoninérgico parece desempenhar um papel importante nesse efeito, uma vez que os efeitos da inativação do CPFmv foram completamente abolidos em animais com lesão das vias serotoninérgicas (Hamani et al, 2010). Assim, esses resultados sugerem que a ativação do CPFmv durante situações estressantes favorece o desenvolvimento de alterações comportamentais e que o aumento local de serotonina seja capaz de modular esse processo.

Devido ao possível envolvimento do CPFmv e da neurotransmissão serotoninérgica local na modulação de respostas comportamentais/emocionais envolvidas na neurobiologia de transtornos psiquiátricos, acredita-se que essa estrutura seja um importante sítio de ação do CBD. Entretanto, ainda pouco se conhece sobre os efeitos do canabidiol no CPFmv, sobretudo relacionado à depressão.

1.5 Sistema serotoninérgico e depressão

Desde a década de 1940 sabia-se que a serotonina desempenhava importante papel em diferentes funções do SNC e, particularmente, em repostas comportamentais (Puig and Gulledge, 2011).

A primeira teoria para explicar a neurobiologia da depressão surgiu na década de 60, sendo denominada “Teoria Monoaminérgica Clássica da Depressão” que destacava a deficiência de monoaminas (noradrenalina, serotonina ou ambas) como a principal causa da depressão, que seria restaurada pelo tratamento com antidepressivos (Schildkraut, 1965). Posteriormente, surgiram diversas outras hipóteses para explicar a neurobiologia da depressão, mas, ainda hoje, um amplo corpo de estudos suporta a hipótese de que a atividade serotoninérgica ou noradrenérgica esteja alterada na depressão (Ruhe et al, 2007). Além disso, todas

as drogas antidepressivas usadas na clínica atualmente aumentam a atividade de um ou ambos os sistemas neurotransmissores (Palazidou, 2012). Ambas as vias, serotoninérgica e noradrenérgica, emitem projeções dos seus núcleos no mesencéfalo para áreas límbicas e pré-frontais relacionadas ao controle da depressão (Palazidou, 2012).

Os corpos celulares de neurônios serotoninérgicos se localizam nos núcleos dorsal e mediano da rafe, no tronco encefálico, de onde emitem projeções para diversas regiões prosencefálicas. Dentre elas, diferentes sub-regiões do córtex pré-frontal como o pré-límbico e o infra-límbico (Groenewegen and Uylings, 2000). Além disso, estudos anatômicos relatam que tais estruturas também enviam projeções de volta para os núcleos da rafe, podendo atuar como um controle negativo sobre a liberação de serotonina (Hajós et al, 1998). As intensas conexões entre o CPF e os núcleos da rafe indicam que a serotonina desempenha um importante papel na modulação de funções de alta ordem desempenhadas pelo córtex (Puig and Gulledge, 2011).

A serotonina não atravessa a barreira hematoencefálica e, por isso, precisa ser sintetizada localmente no SNC para desempenhar suas funções como neurotransmissor. O primeiro passo na síntese de serotonina é a captação do aminoácido triptofano a partir do plasma, que é convertido, no interior da célula nervosa, à serotonina em dois passos principais. Posteriormente, a 5-HT é armazenada em vesículas e a chegada do impulso nervoso promove sua liberação na fenda sináptica (Graeff, 1997).

O sistema serotoninérgico é constituído de 7 famílias de receptores (1,2,3,4,5,6,7) com subtipos denominados de a, b e c (Adayev et al, 2005). Os subtipos de receptores são, em sua grande maioria, acoplados à proteína G, sendo capazes de ativar ou inibir diversas cascatas bioquímicas (Adayev et al, 2005). Alguns desses receptores se relacionam ao desenvolvimento de doenças psiquiátricas, sendo que, no caso mais específico de desordens de humor e depressão, o receptor serotoninérgico que tem recebido maior destaque é o 5-HT1A (Savitz et al.,2009).

O receptor 5-HT1A é o mais bem caracterizado e identificado como mediador chave da neurotransmissão serotoninérgica no sistema nervoso central. Tais receptores podem se localizar pré-sinapticamente em neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe, inibindo o disparo neuronal, a síntese de serotonina e a sua

liberação nos terminais sinápticos (Carr and Lucki, 2010). Além disso, estão amplamente distribuídos no SNC, em regiões que recebem projeções dos núcleos da rafe. A maior densidade de receptores 5-HT1A é encontrada em áreas do sistema límbico como, hipocampo, córtex e amígdala, onde se localizam pós-sinapticamente em neurônios glutamatérgicos, colinérgicos, noradrenérgicos ou gabaérgicos (Carr and Lucki, 2010; Barnes and Sharp, 1999). Mais especificamente no CPF, existe intensa concentração desse subtipo de receptor serotoninérgico (Pompeiano et al, 1992). A ativação de receptores 5HT1A promove hiperpolarização e diminuição do disparo celular, modulando diversas neurotransmissões como a glutamatérgica, a colinérgica e a dopaminérgica (Jeltsch-David et al. 2008; Lopez-Gil et al. 2010; Di Matteo et al. 2008).

Uma das principais vias de sinalização alterada pela ativação de receptores serotoninérgicos é a atividade da adenilato ciclase e PKA (Dargo et al, 2011). Por serem acoplados a uma proteína G inibitória, os receptores 5-HT1A inibem a adenilato ciclase e, consequentemente, diminuem os níveis de AMPc. PKA é uma proteína kinase A cuja atividade é dependente dos níveis de AMPc, sendo que a ativação de 5-HT1A, por diminir a produção de AMPc, está associado à diminuição da atividade de PKA (Drago et al., 2011). Uma vez que a PKA é ativada, ela forforila diversas outras proteínas, incluindo fatores de transcrição (ex. CREB) que regulam a expressão gênica. A atividade da PKA está diminuída na córtex pré-frontal de pacientes deprimidos vítimas de suicídio (Dwivedi et al., 2004). Paralelamente, receptores 5-HT1A ativam a enzima fosfolipase C, aumentando a liberação de cálcio do retículo endoplasmático. O aumento de cálcio intracelular estimula a proteína kinase C (PKC), a via da MAP kinase (MAPK) e canais de potássio (Drago et al., 2011).

Há evidências de que disfunções do sistema serotoninérgico são fatores de vulnerabilidade à depressão maior e a outras formas de doenças afetivas (Jans et al., 2006). Corroborando esses dados, trabalhos demonstram que indivíduos deprimidos apresentam uma dessensibilização ou diminuição na quantidade de receptores 5-HT1A em diversas regiões prosencefálicas, como o CPFm e o hipocampo (Bowen et al, 1989; Cheetham et al, 1990; Boldrini et al, 2008). Por outro lado, estudos farmacológicos utilizando agonista seletivo para o subtipo de receptor 5-HT1A demonstram uma melhora do humor em pacientes deprimidos tratados com essas drogas (Hamani, 2010). Além disso, a maioria dos antidepressivos disponíveis

atualmente aumenta a quantidade de serotonina em regiões límbicas ou reforça a transmissão/função mediada por receptores 5-HT1A pós-sinápticos (Detke et al., 1995; Haddjeri et al., 1998). Todos esses dados reforçam a importância dos receptores 5-HT1A pós-sinápticos na neurobiologia da depressão e na resposta antidepressiva a fármacos.

No mesmo sentido dos estudos em humanos, testes em animais evidenciam que agonistas de receptores 5-HT1A produzem efeito tipo-antidepressivo em diferentes modelos (Blier and Ward, 2003; De Vry, 1995). No teste do nado forçado, o agonista pleno, 8-OH-DPAT, e o parcial, buspirona, evidenciam efeito tipo-antidepressivo, que é revertido pela pré-administração do antagonista de receptores 5-HT1A, WAY100635 (Singh and Lucki, 1993; Cryan et al, 2005). No modelo animal do desamparo aprendido, a ativação de receptores 5-HT1A no hipocampo induz efeito tipo-antidepressivo (Joca et al., 2003). No entanto, no CPFm o envolvimento desses receptores na modulação do efeito antidepressivo de fármacos permanece não investigado.

Diversos estudos demonstram a importância da ativação de receptores 5-HT1A em respostas comportamentais ao estresse, sendo que a ocorrência de evento estressante pode reduzir os níveis de receptores 5-HT1A em estruturas límbicas como o hipocampo (Watanabe et al., 1993) . Nesse sentido, camundongos geneticamente modificados, com deficiência em receptores 5-HT1A, demonstram um fenótipo tipo-ansioso (Toth, 2003). Esses animais possuem elevada reatividade a estressores, representada pelo aumento de congelamento decorrente da apresentação a estímulos aversivos, como o choque elétrico nas patas (Gross et al., 2000).

Em conjunto, esses dados dão sustentação para a idéia de que os receptores 5-HT1A teriam um papel importante na modulação da resposta emocional ao estresse e no mecanismo de ação de fármacos antidepressivos.

1.6 Hipótese

Considerando-se o conjunto de dados acima citados, acredita-se que o canabidiol, quando administrado no CPFmv, interfere na neurotransmissão serotoninérgica local, através da ativação de receptores 5-HT1A, promovendo efeito tipo-antidepressivo.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a participação do CPFMv, diferenciado em IL e PL, no efeito tipo antidepressivo do canabidiol e o possível envolvimento de receptores 5HT1A nessa resposta. Para isso, investigamos os efeitos da administração direta no CPFMv, IL e PL, de canabidiol, de agonista e de antagonista de receptores 5HT1A em ratos submetidos ao teste de nado forçado.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Testar a hipótese de que a administração de CBD no CPFMv, IL e PL, induz efeito tipo antidepressivo e que esse efeito seria mediado pela ativação de receptores 5HT1A.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da administração de canabidiol no córtex pré-límbico e infra-límbico de ratos submetidos ao teste do nado forçado.
- Investigar se a administração de agonista de receptores 5-HT1A no CPFmv, PL e IL, promove efeito tipo antidepressivo.
- Investigar o envolvimento de receptores 5HT1A no efeito induzido pela administração intra-PL ou IL de canabidiol- através da administração de um antagonista de receptores 5HT1A.
- Avaliar se os efeitos da administração das drogas no PL e IL seriam decorrentes de alterações motoras inespecíficas.

Material e Métodos

3 MATERIAL E METODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, 230 a 270 gramas, provenientes do Biotério Central da USP, Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos aos pares, em caixas de acrílico (570 cm2), no Laboratório de Farmacologia da Faculdade Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), em condições controladas: temperatura (24 ± 1˚C), ciclo de luz claro-escuro de 12 horas, sem privação de alimento e água exceto durante a realização do experimento.

A manipulação e tratamento dos animais foram realizados de acordo com protocolos experimentais adotando as normas e aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA- protocolo Nº 11.1.459.53.7) do Campus de Ribeirão Preto - USP. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

3.2 Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas nos experimentos:

- Canabidiol (Hebrew University, Jerusalem, Israel): dissolvido em óleo de semente de uva, administrado através de injeção intracortical, infra-límbica ou pré-límbica, bilateral, nas doses de 10, 30 ou 60 nmol, em um volume de 0,2µl por sítio de injeção intracerebral (Campos and Guimarães, 2008; Lemos et al, 2010).
- WAY 100635 (Sigma-Aldritch, USA): antagonista de receptores 5-HT1A, dissolvido em salina isotônica estéril, administrado através de injeção intracortical, infra-límbica ou pré-límbica, bilateral, nas doses de 10 e 30 nmol, em um volume de 0,2µl por sítio de injeção intracerebral (Joca et al, 2003).
- 8-OH-DPAT (RBI): agonista de receptores 5HT1A, dissolvido em salina estéril, administrado através de injeção intracortical , IL ou PL, bilateral, nas doses de 5 e 10 nmol, em um volume de 0,2µl por sítio de injeção intracerebral (Joca et al, 2003).

Além disso, foram utilizados durante os procedimentos cirúrgicos: tribromoetanol (1 mL/100g); Banamine (Schering-Plough, 0,25%, 0,1 mL/100g), Lidocaína (PROBEM 3%, 0,2 ml); e pentabiotico veterinário, (Fort Dodge, 1.200.000UI), Benzilpenicilina benzatina 600.000UI, Benzilpenicilina procaína

300.000UI, Benzilpenicilina potassica 300.000UI, Diidroestreptomicina base (sulfato) 250mg e Estreptomicina base (sulfato) 250mg), 0,1ml/100g.

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Cirurgia estereotáxica e administração intracerebral de drogas

Os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (intraperitonial - i.p.) na dose de 1ml/100g e fixados na armação estereotáxica. Cânulas de aço inoxidável (0,11mm OD) foram implantadas bilateralmente e direcionadas para o córtex pré-frontal medial pré-límbico (coordenadas: Antero-posterior (AP): +3,3mm, lateral (L): +1,9mm, vertical (V): -2,4mm do crânio com uma inclinação lateral de 22º) e córtex pré-frontal medial infra-límbico (coordenadas: AP: +3,3mm, L: +2,7mm, V: -3,2mm do crânio com uma inclinação lateral de 24º), de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1997). As cânulas foram fixadas ao osso do crânio por parafusos de aço inoxidável e cimento acrílico. A obstrução das cânulas foi prevenida através da inserção de maldril em seu interior. Os animais receberam administração de pentabiótico veterinário (i.m., 0,1mL/100g) e do antiinflamatório Banamine (0,1mL/100g), com o objetivo de evitar quadros infecciosos e reduzir a dor pós-operatória. . Ao final da cirurgia, os animais foram acondicionados em uma gaiola com aquecimento, onde permaneceram sob observação por 30 minutos. Depois de 5 a 7 dias da cirurgia foram realizados os experimentos.

As injeções intracerebrais foram realizadas com o auxílio de agulha fina dental (0,3 mm OD) que foi introduzida através da cânula até que sua ponta fosse 1.0mm abaixo do fim da cânula. Foi injetado um volume de 0.2µL/lado, durante 1 minuto, usando uma microseringa (Hamilton, USA) controlada por uma bomba de infusão. Um cateter de polietileno foi colocado entre a extremidade superior da agulha dental e a microseringa. O movimento de uma bolha de ar dentro do cateter confirma o fluxo da droga.

3.3.2 Análise histológica do sítio de injeção

Depois dos experimentos comportamentais, os ratos foram anestesiados com Ketamina/xilasina e perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com

salina isotônica seguida por solução de formol a 10%. Após a perfusão, uma agulha foi inserida através da cânula e 0.2µl do corante de *fast green* foi injetado bilateralmente. Os cérebros foram removidos e depois de no mínimo 3 dias imersos em solução de formol a 10%, foram obtidas secções de 40µm através do criostato. Os sítios das injeções foram registrados em diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (1997), sendo desconsiderados da análise estatística os dados dos animais cujo local da injeção se encontrou fora do córtex pré-frontal medial pré-límbico ou do córtex pré-frontal medial infra-límbico.

3.3.3 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado, um dos modelos animais mais usados atualmente para a detecção de alterações comportamentais induzidas por drogas antidepressivas, foi realizado com procedimentos similares aqueles descritos por Detke and Lucki (1996). O modelo consiste em colocar os animais para nadar, individualmente, em um cilindro de plástico (30cm de diâmetro, 40cm de altura, contendo 25cm de água com temperatura de 24±1ºC, de acordo com Joca e Guimarães, 2006, por um período de 15min (pré-teste). Após esse período, os animais foram retirados e colocados, separadamente, para secar, antes de retornarem para suas caixas de origem. Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos a sessões de 5 minutos de nado forçado, quando se registrou o tempo total de imobilidade (o animal permanece parado, realizando apenas pequenos movimentos necessários para a flutuação), de maneira cega. A água foi trocada entre as sessões de nado para evitar a influência de substancias de alarme (ABEL E BILITZKE, 1990).

3.3.4 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto é um modelo animal amplamente utilizado para se verificar efeitos locomotores induzidos por drogas ou condições experimentais. O modelo consiste em colocar os animais para se locomoverem livremente, individualmente, no centro de uma caixa quadrada de madeira (72cm x 72cm, 40cm de altura), dividida em 16 quadrantes (18cm x 18cm), por um período de 5 min. Durante esse período, são contados os números de cruzamentos que o animal faz

entre os quadrantes, sendo que cada cruzamento só é contado quando o animal atravessa com as quatro patas de um quadrante para o outro. O número de cruzamentos realizado por cada animal nesse período serviu como índice de sua atividade locomotora.

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

***Experimento 1**: efeitos da administração de canabidiol (10, 30, 45 e 60 nmol) no PL e no IL de animais submetidos ao teste do nado forçado*

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, 5-7 dias depois, ao pré-teste (15 min). Vinte e quatro horas depois, os animais receberam injeção bilateral de canabidiol intra-PL (10, 30 e 60nmol) ou intra-IL (30, 45 e 60nmol) ou salina e, após 10 minutos, foram submetidos ao teste do nado forçado. Após o término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção. A menor dose que diminuiu o tempo de imobilidade foi utilizada nos experimentos seguintes.

***Experimento 2:** efeitos da administração de canabidiol no PL e IL sobre a atividade locomotora de animais submetidos ao teste do campo aberto*

O experimento teve por objetivo avaliar as possíveis alterações motoras decorrentes da administração de canabidiol no PL ou IL.

Grupos independentes de ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, 5-7 dias depois, ao teste no **campo aberto**. Dez minutos antes de serem expostos ao campo aberto, os animais receberam injeção bilateral de veículo ou canabidiol (10, 30, 60nmol) intra-PL, ou veículo ou canabidiol (30, 45, 60 nmol) intra-IL. Após o término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção.

***Experimento 3**:efeitos da administração de agonista 5-HT1A no PL e no IL sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado*

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, 5-7 dias depois, ao pré-teste (15 min). Vinte e quatro horas depois, os animais receberam injeção bilateral intra-PL e intra-IL de 8-OH-DPAT (5 e 10nmol/0,2µl) ou salina e, após 10 minutos, foram submetidos ao teste do nado forçado. Após o término do teste, os animais

foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção. A dose que diminuiu o tempo de imobilidade foi utilizada nos experimentos seguintes.

Experimento 4: efeito do pré-tratamento com antagonista *5-HT1A no CPFMv, PL e IL , sobre o efeito induzido pela administração local de agonista desses receptores, em ratos submetidos ao teste do nado forçado.*

O experimento teve por objetivo encontrar a dose de antagonista 5-HT1A suficiente para inibir os efeitos de um agonista 5HT1A no CPFMv.

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, 5-7 dias depois, ao pré-teste (15 min). Vinte e quatro horas depois os animais foram submetidos ao teste do nado forçado. 10 minutos antes do teste, os animais receberam uma primeira injeção bilateral intra-PL ou IL de salina ou WAY100635 nas doses de 10 ou 30nmol, e, 5 min depois, injeção bilateral de salina ou 8-OH-PDAT na dose de 10nmol. Após o término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção.

Experimento 5: *efeitos da administração de 8-OH-DPAT e de WAY100635,no PL e no IL, sobre a atividade motora de animais submetidos ao teste do campo aberto*

O experimento teve por objetivo detectar possíveis alterações motoras decorrentes da administração de agonista e antagonista de receptores 5-HT_{1A} no PL ou IL.

Grupos independentes de ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, 5-7 dias depois, ao teste no campo aberto. Dez minutos antes de serem expostos ao campo aberto, os animais receberam injeção bilateral intra-PL ou IL de 8-OH-PDAT. Outro grupo de animais recebeu injeção bilateral, no PL ou IL, de WAY100635. Após o término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção.

Experimento 6: *participação de receptores $5HT_{1A}$ nos efeitos induzidos pela administração de canabidiol no PL e IL*

O experimento teve por objetivo avaliar os efeitos da administração de um antagonista de receptores 5-HT_{1A} antes da administração de canabidiol a fim de

investigar a participação de tais receptores na resposta comportamental induzida pelo CBD.

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, 5-7 dias depois, ao pré-teste (15 min). Vinte e quatro horas depois os animais foram submetidos ao teste do nado forçado. Os animais receberam injeção bilateral intra-PL ou IL de salina ou WAY100635 nas doses de 10 e 30nmol,e, 5minutos depois, injeção bilateral de veículo ou canabidiol (10nmol). Após o término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção.

Todos os experimentos foram realizados de forma cega e repetidos a fim de obter um número final de 6-8 animais/grupo.

3.5 Análise estatística

O resultado comportamental, tempo de imobilidade, nos experimentos do teste do nado forçado, foi analisado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett. A análise dos resultados dos experimentos utilizando o teste do campo aberto foi realizada por ANOVA de duas vias com medidas repetidas (tratamento X tempo). Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Localização dos sítios de injeção

Os sítios das injeções das drogas e de veículo foram analisados no microscópio e identificados com o auxílio do Atlas de Paxinos e Watson (2005). Os dados dos animais cujos sítios de injeção estavam fora do CPFMv, PL ou IL, foram excluídos dos resultados obtidos nos protocolos experimentais e representados no gráfico como o grupo “OUT”.

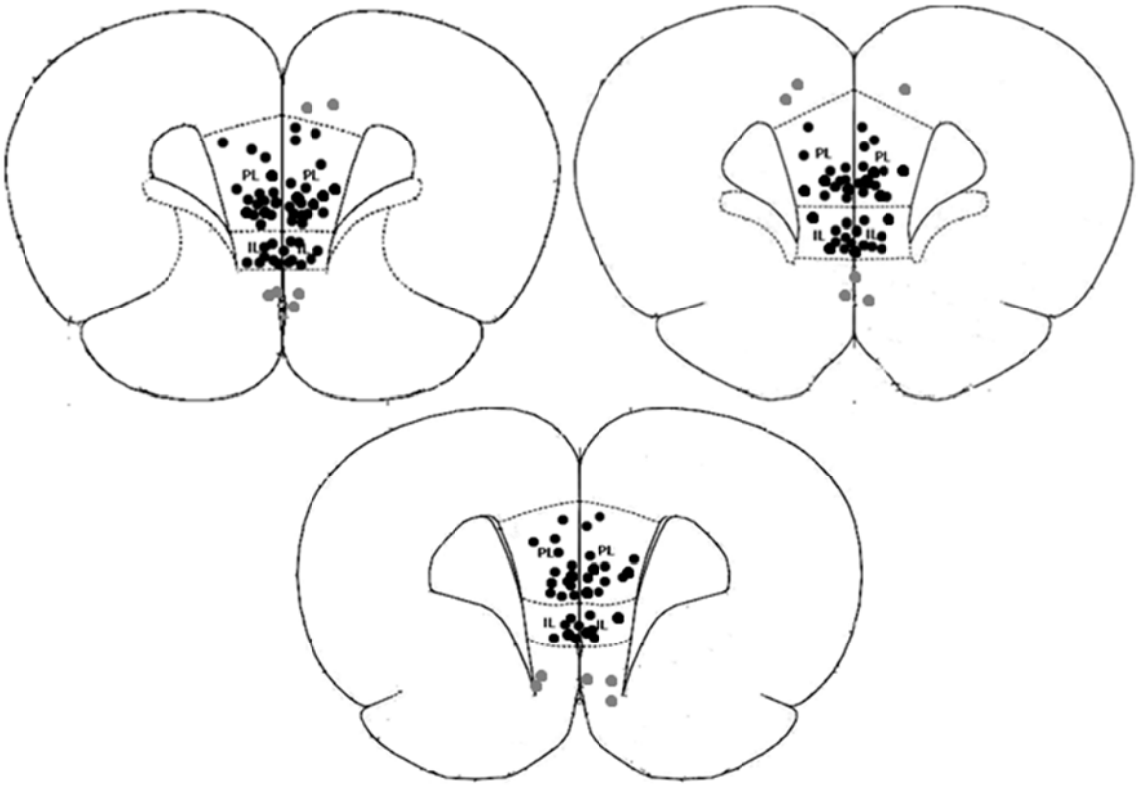

Fig. 1. Representação da região de microinjeção no córtex pré-frontal medial ventral, pré-límbico (PL) e infra-límbico (IL), baseado no atlas Paxinos e Watson 2005. Círculos pretos representam as injeções localizadas no CPFmv. Círculos cinzas representam as injeções fora do CPFmv (distância do Bregma de 3.72, 3,24 e 3,0).

4.2 Experimento 1: efeitos da administração de canabidiol (10, 30, 45 e 60nmol) no PL e no IL de animais submetidos ao teste do nado forçado

A administração de CBD (10, 30, 60nmol/0,2µl/lado) reduziu significativamente o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, em comparação ao grupo controle ($F_{4,50}=6,142$ $P<0,05$). Além disso, o grupo OUT, que recebeu administração de CBD 10, 30 ou 60nmol/0,2µl/lado fora do córtex (PL), não demonstrou diferença significativa em relação ao grupo que recebeu veículo (n=7-13, Dunnett $P<0,05$, Figura.2).

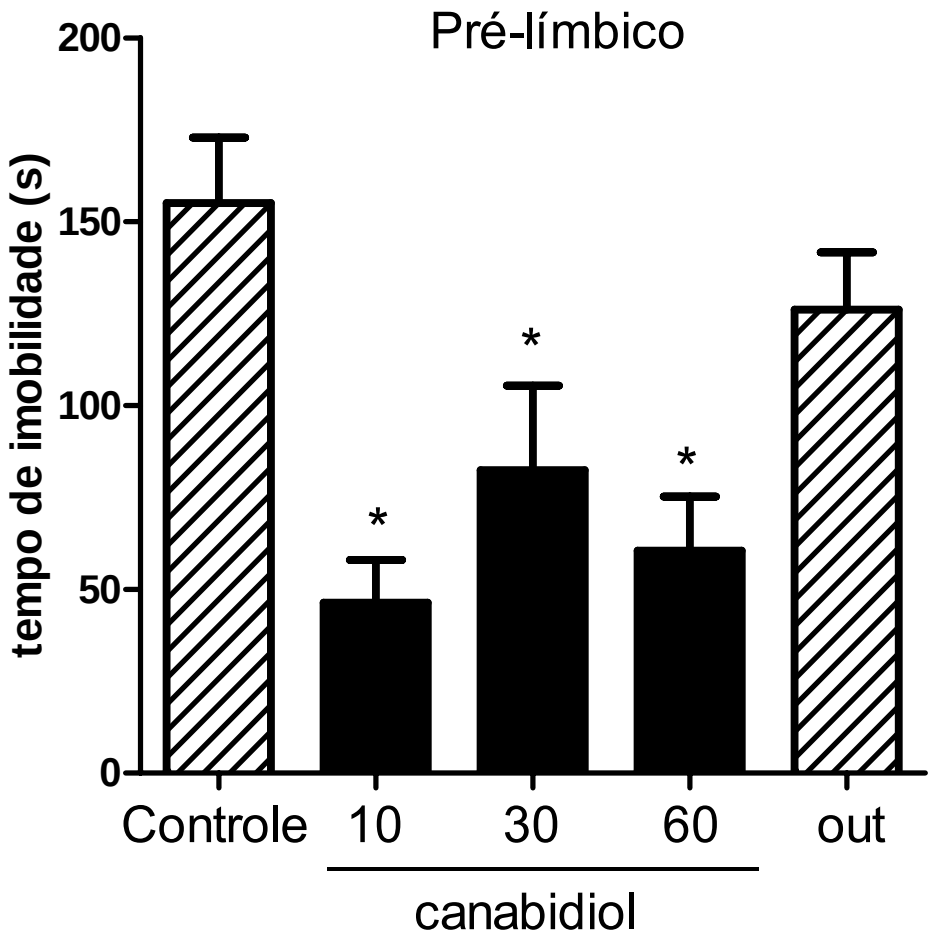

Fig. 2. Efeitos da administração de CBD, intra-PL, nas doses de 10, 30 e 60 nmol/0,2µl/lado (7-13 animais por grupo) sobre o tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado. * Dados representam média +/- EPM *Indica $p<0,05$ (one-way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett).

A administração de CBD nas doses de 45 e 60 nmol/0,2µl/lado, no IL, reduziu significantemente o tempo de imobilidade no teste do nado forçado ($F_{4,38}=8,605$ $P<0,05$) quando comparado ao grupo controle (n=7-10, Dunnett $P<0,05$, figura 3). Já a dose de 30 nmol/0,2µl/lado não foi diferente do grupo tratado com veículo (Dunnett, $P>0,05$).

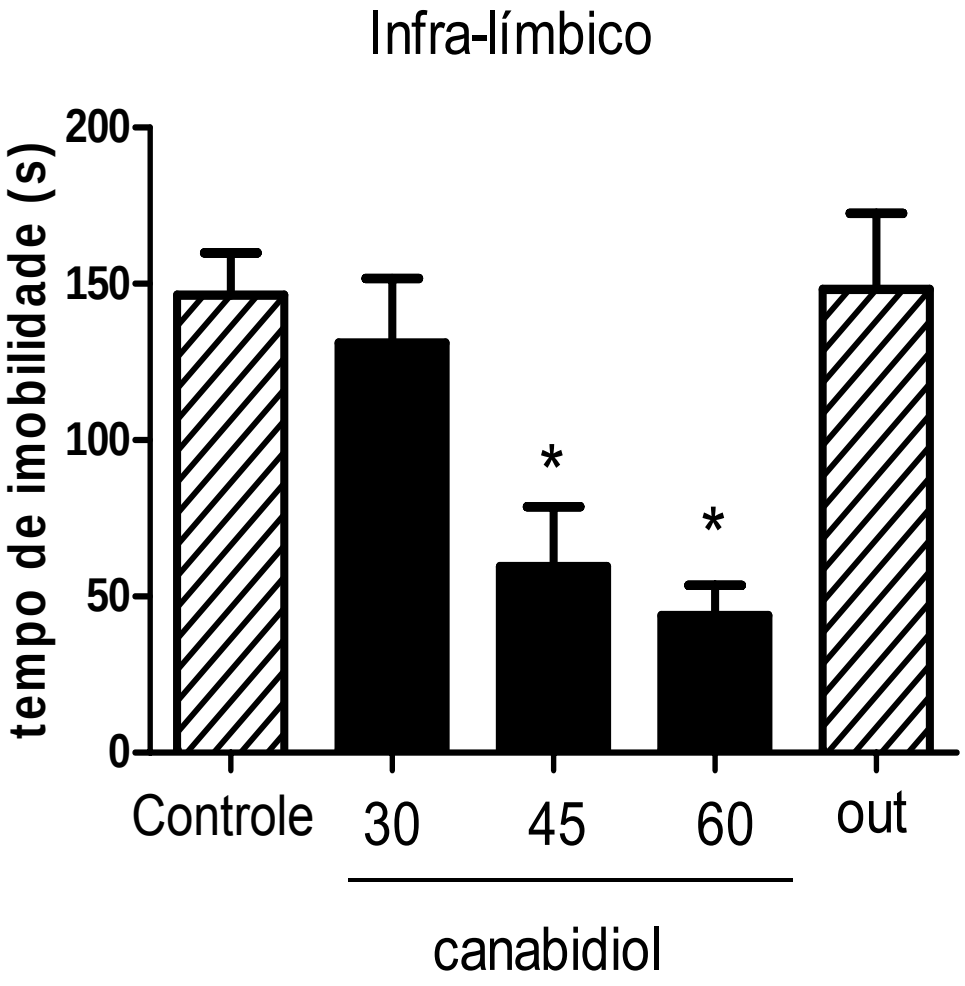

Fig. 3. Efeitos da administração de CBD, intra-IL, nas doses de 30, 45 e 60 nmol/0,2µl/lado (7-10 animais por grupo) sobre o tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado. * Dados representam média +/- EPM * indica $p<0,05$ (one-way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett).

4.3 Experimento 2: efeitos da administração de canabidiol no PL e no IL sobre a atividade locomotora de animais submetidos ao teste do campo aberto

Não ocorreu alteração na atividade locomotora entre os animais tratados com canabidiol ou veículo em nenhuma das doses testadas, em ambas as estruturas, PL ($F_{3,32}=4,626$; $p>0,05$) e IL ($F_{3,18}=1,767$; $p>0,05$). Ocorreu um efeito significativo do tempo no PL ($F_{4,32}=114,1$; $p<0,0001$) e no IL ($F_{4,18}=75,16$; $p<0,0001$). Além disso, não foi observada interação entre o efeito do tempo e o tratamento no PL ($F_{12, 32}= 1,387$; $p>0,05$, figura 4) e IL ($F_{12,18}=1,274$; $p>0,05$, figura 5).

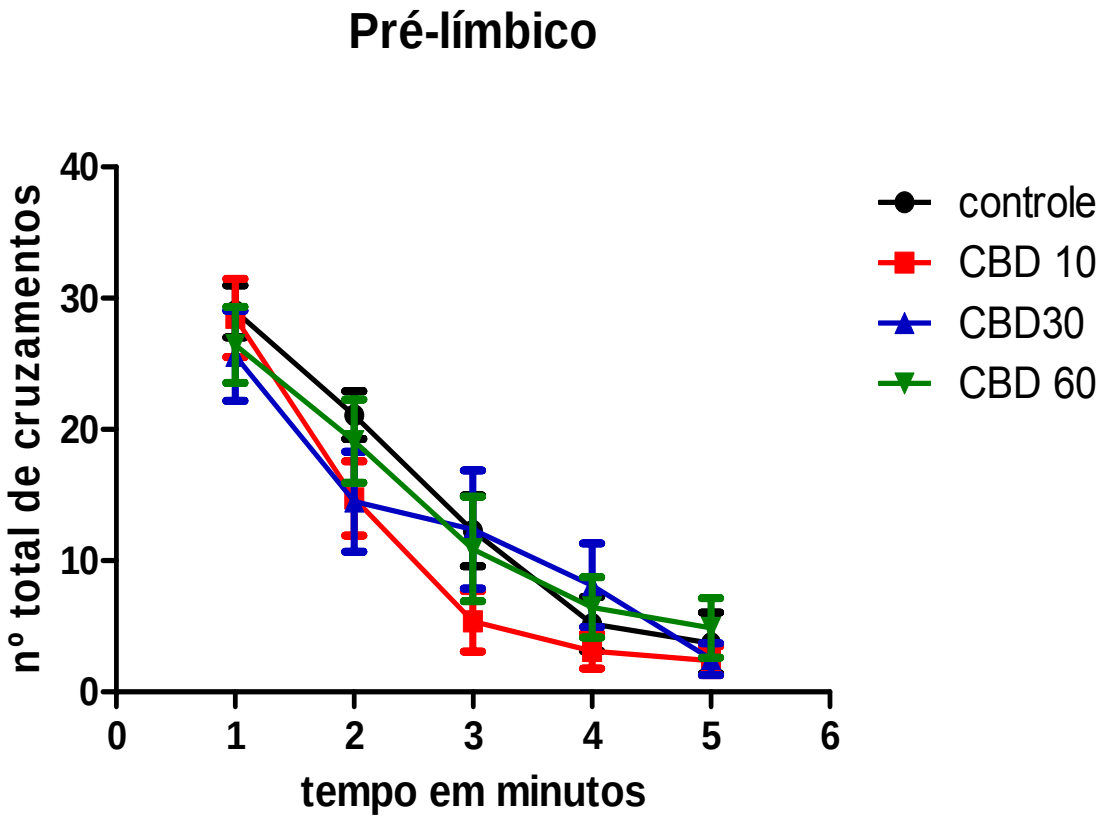

Fig. 4. Efeitos da administração de canabidiol (10, 30, 60 nmol/0,2µl/lado), intra-PL, sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto. Dados representam a média +/- erro padrão, (5-11 animais por grupo) (Anova de medidas repetidas, $p>0.05$ para efeito do tratamento).

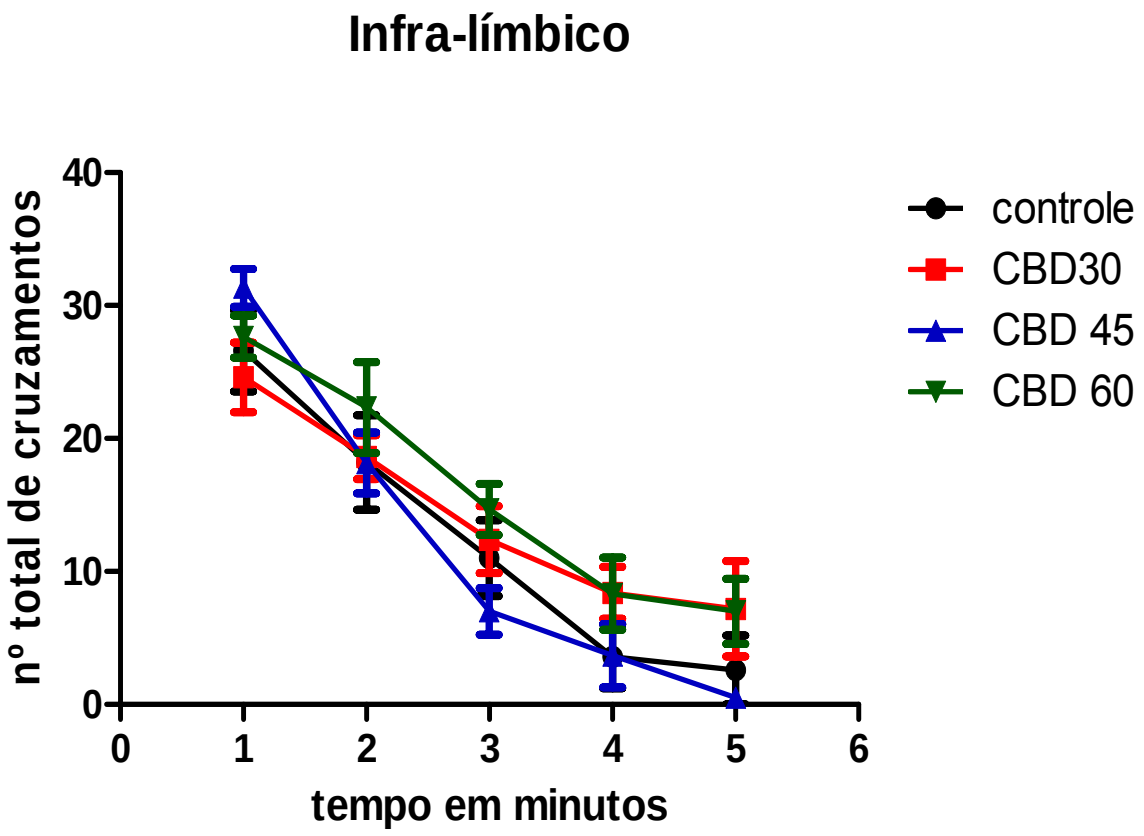

Fig. 5. Efeitos da administração de canabidiol (30, 45 e 60 nmol/0,2µl/lado),intra-IL, sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto. Dados representam a média +/- erro padrão. (5-11 animais por grupo) (Anova de medidas repetidas, p>0.05 para efeito do tratamento).

4.4 Experimento 3: efeitos da administração de agonista 5-HT1A no PL e no IL sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado

A administração de 8-OH-DPAT na dose de 10 nmol/0,2µl/lado, intra-PL, reduziu significantemente o tempo de imobilidade no teste do nado forçado ($F_{2,16}=3,593$, $P<0,05$) quando comparado ao grupo controle (n=5-8, Dunnett $P<0,05$, figura 6). Já a dose de 5 nmol/0,2µl/lado não foi significativamente diferente do grupo tratado com veículo.

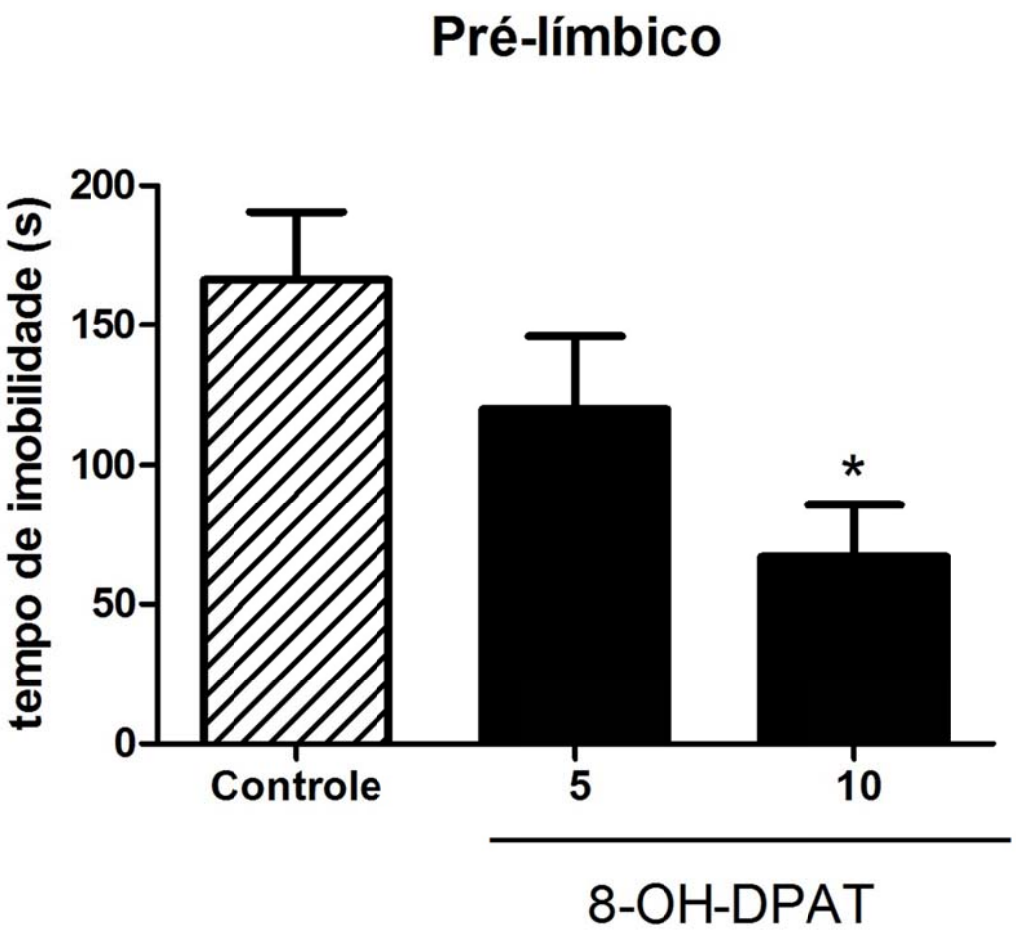

Fig. 6. Efeitos da administração de 8-OH-DPAT, nas dose de 5 e10nmol/0,2µl/lado, intra-PL (5-8 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado. Os dados são representados pela média +/- erro. *indica p < 0,05 (one-way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett).

A administração de 8-OH-DPAT na dose de 10 nmol/0,2µl/lado, intra-PL, reduziu significantemente o tempo de imobilidade no teste do nado forçado ($F_{2,11}=4,674$, $P<0,05$) quando comparado ao grupo controle (n=4-6, Dunnett $P<0,05$, figura 7). Já a dose de 5 nmol/0,2µl/lado não foi significativamnete diferente do grupo tratado com veículo.

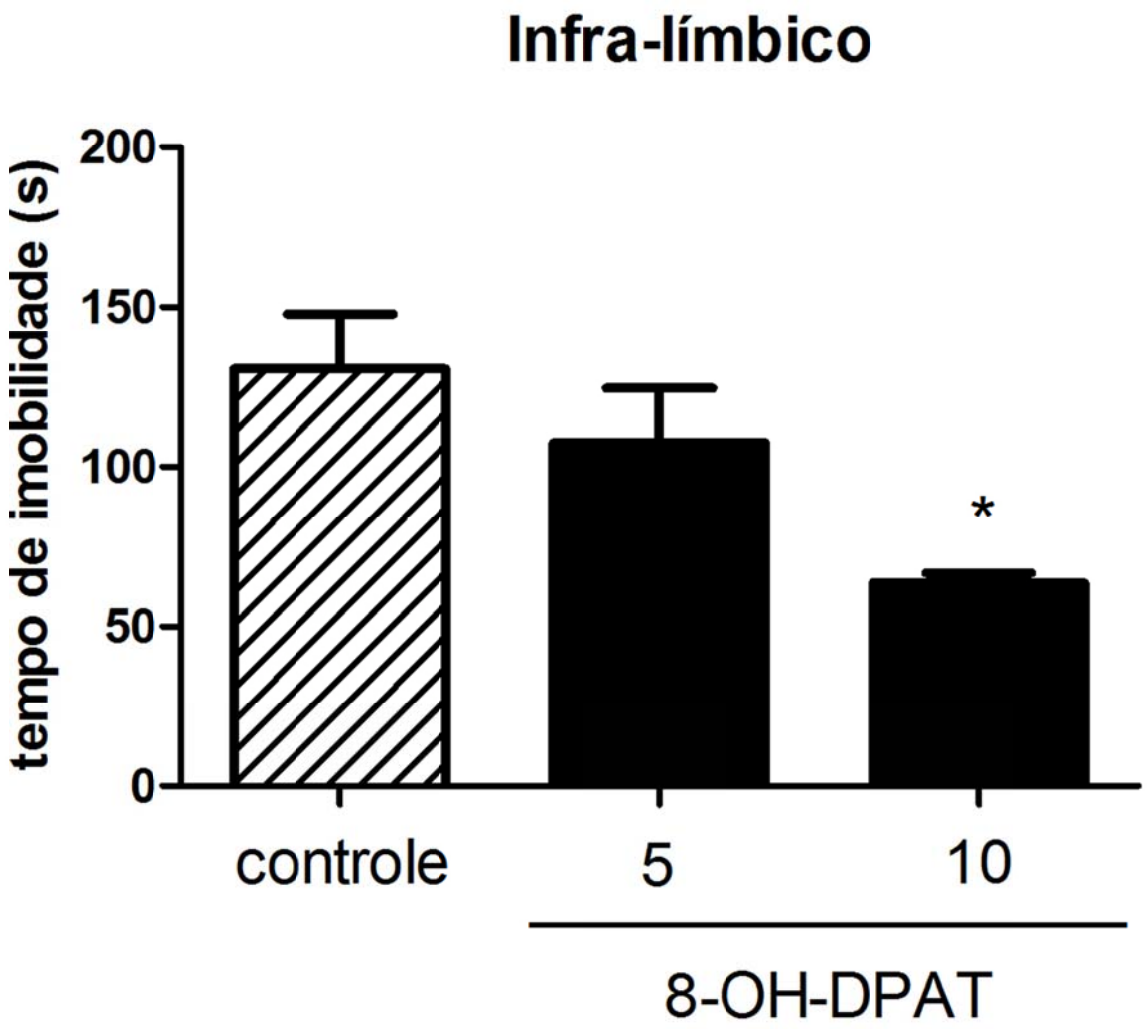

Fig. 7. Efeitos da administração de 8-OH-DPAT, nas doses de 5 e10nmol/0,2µl/lado, intra-IL (4-6 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado. Os dados são representados pela média +/- erro. *indica p < 0,05 (one-way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett.

4.5 Experimento 4: efeito do pré-tratamento com antagonista 5-HT1A no CPFmv, PL e IL, sobre o efeito induzido pela administração local de agonista desses receptores, em ratos submetidos ao teste do nado forçado

Confirmando os resultados obtidos no experimento anterior, o tratamento com 8-OH-DPAT reduziu o tempo de imobilidade na dose de 10nmol/0,2µl/lado ($F_{5,24}=5,806$, $P<0,05$, figura 7). Além disso, a pré-administração de WAY100635 na dose de 30nmol/0,2µl/lado, no PL, foi capaz de reverter os efeitos do 8-OH-DPAT (10nmol/0,2µl/lado) (Dunnets, $p>0,05$). Por outro lado, o WAY100635 na dose de 10nmol/0,2µl/lado falhou em reverter esse efeito.

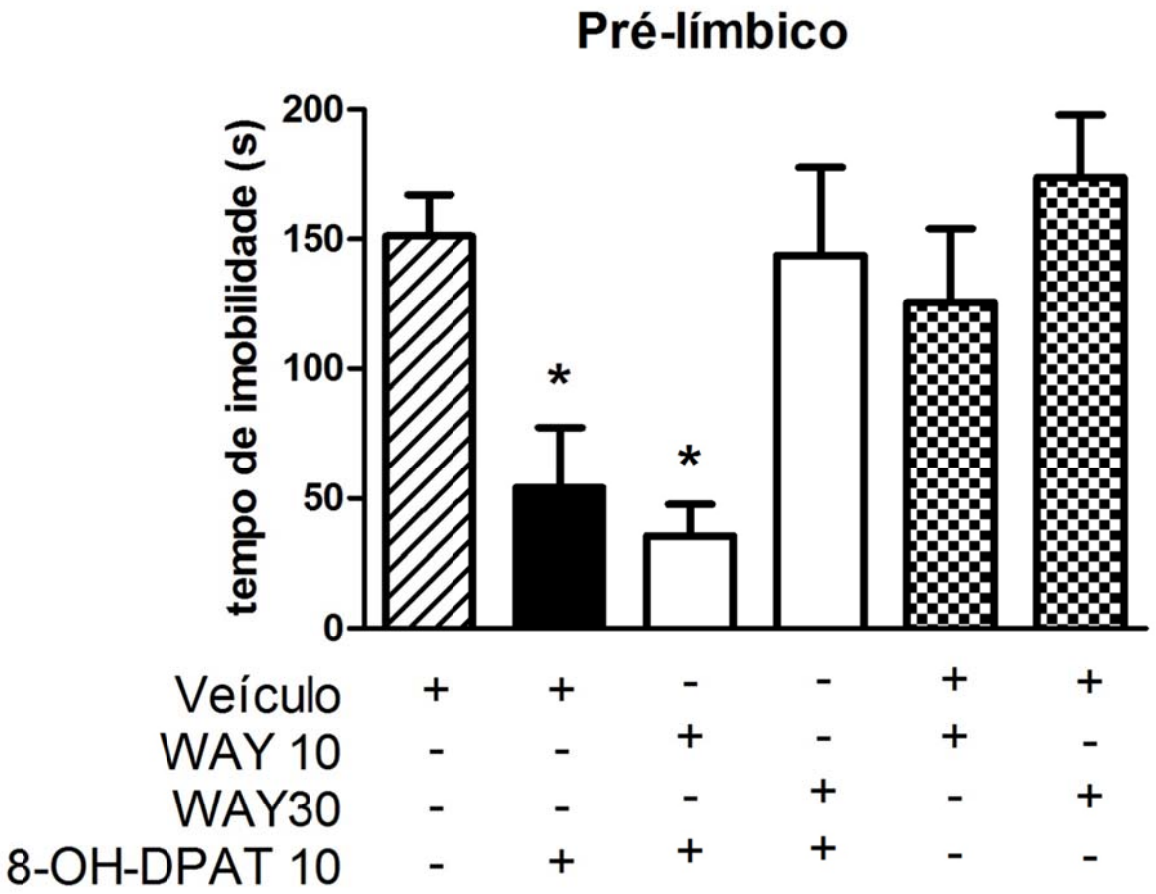

Fig. 8. Efeitos do pré-tratamento com WAY 100635, nas doses de 10 e 30 nmol/0,2µl/lado sobre os efeitos do 8-OH-DPAT (10 nmol/0,2µl/lado), intra-PL, no tempo de imibilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado (n 4-8 por grupo). Os dados são representados pela média +/- erro padrão. *p<0,05 (one-way ANOVA, seguido de Dunnets).

Confirmando os resultados obtidos no experimento anterior, a administração de 8-OH-DPAT reduziu o tempo de imobilidade na dose de 10nmol/0,2µl/lado ($F_{3,23}=3,261$, $P<0,05$, figura 9) quando administrado no IL. Além disso, a pré-administração de WAY100635 na dose de 30nmol/0,2µl/lado, no IL, foi capaz de reverter os efeitos do 8-OH-DPAT (10nmol/0,2µl/lado) (Dunnets, $p>0,05$).

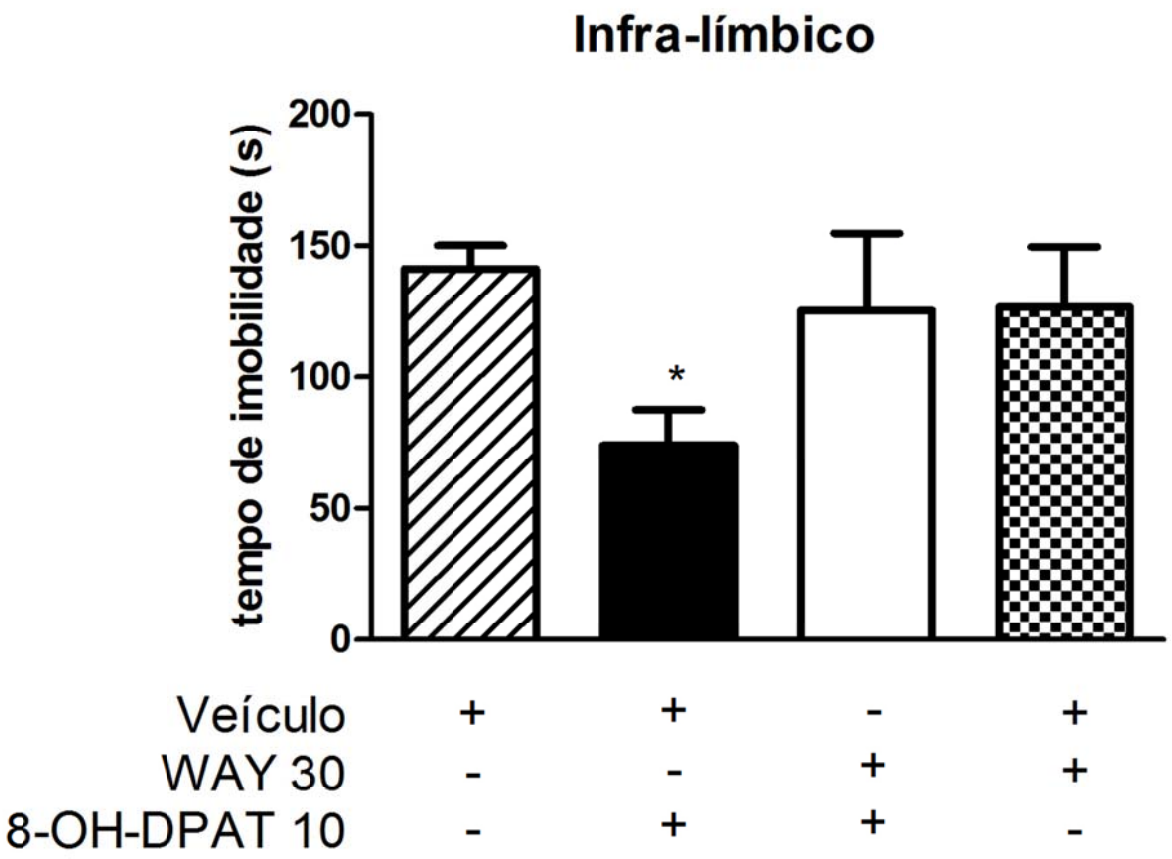

Fig. 9. Efeitos do pré-tratamento com WAY 100635, nas doses de 10 e 30 nmol/0,2µl/lado sobre os efeitos do 8-OH-DPAT (10 nmol/0,2µl/lado), intra-IL, no tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado (n 5-8 por grupo). Os dados são representados pela média +/- erro padrão. *$p<0,05$ (one-way ANOVA, seguido de Dunnets).

4.6 Experimento 5: efeitos da administração de 8-OH-DPAT e de WAY100635, no PL e IL, sobre a atividade motora de animais submetidos ao teste do campo aberto

Não ocorreu diferença significativa na distância percorrida entre os animais tratados com 8-OH-DPAT (10nmol/0,2µl/lado), WAY100635 (30nmol/0,2µl/lado) ou veículo em nenhuma das doses testadas, quando administradas no PL ($F_{3,20}=0,3532$; $p>0,05$). Ocorreu um efeito significativo do tempo ($F_{4,20}=31,94$; $p<0,0001$) Além disso, não foi observada interação entre o efeito do tempo e o tratamento ($P_{12,20}=1,807$, $p>0,05$, figura 8).

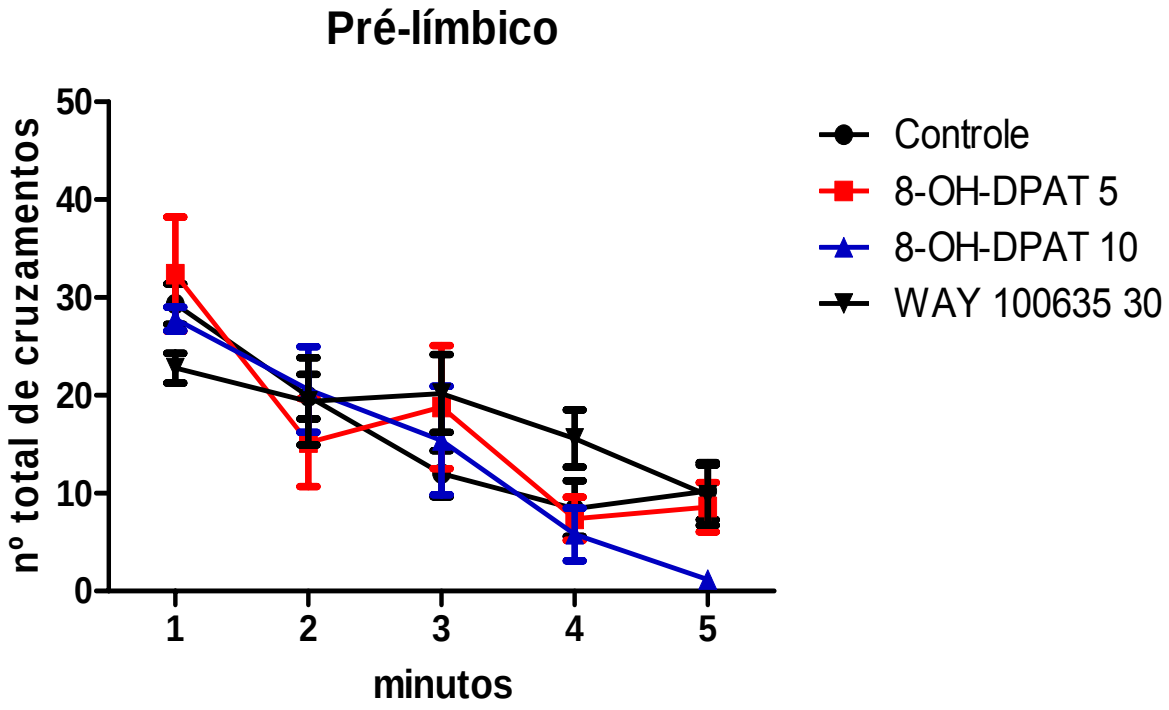

Fig. 10. Efeitos da administração de 8-OH-DPAT, nas dose de 5 e10nmol/0,2µl/lado, ou WAY100635, na dose de 30 nmol/0,2µl/lado, intra-PL, sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto. Dados representam a média +/- erro padrão, (5-9 animais por grupo) (Anova de medidas repetidas, $p>0.05$ para efeito do tratamento).

Não ocorreu diferença significativa na distância percorrida entre os animais tratados com 8-OH-DPAT (10nmol/0,2µl/lado), WAY100635 (30nmol/0,2µl/lado) ou veículo em nenhuma das doses testadas, quando administradas no IL ($F_{2,12}=1,896$; $p>0,05$). Ocorreu um efeito significativo do tempo no PL ($F_{4,12}=30,93$; $p<0,0001$). Além disso, não foi observada interação entre o efeito do tempo e o tratamento ($P_{8,12}=0,7064$, $p>0,05$, figura 10).

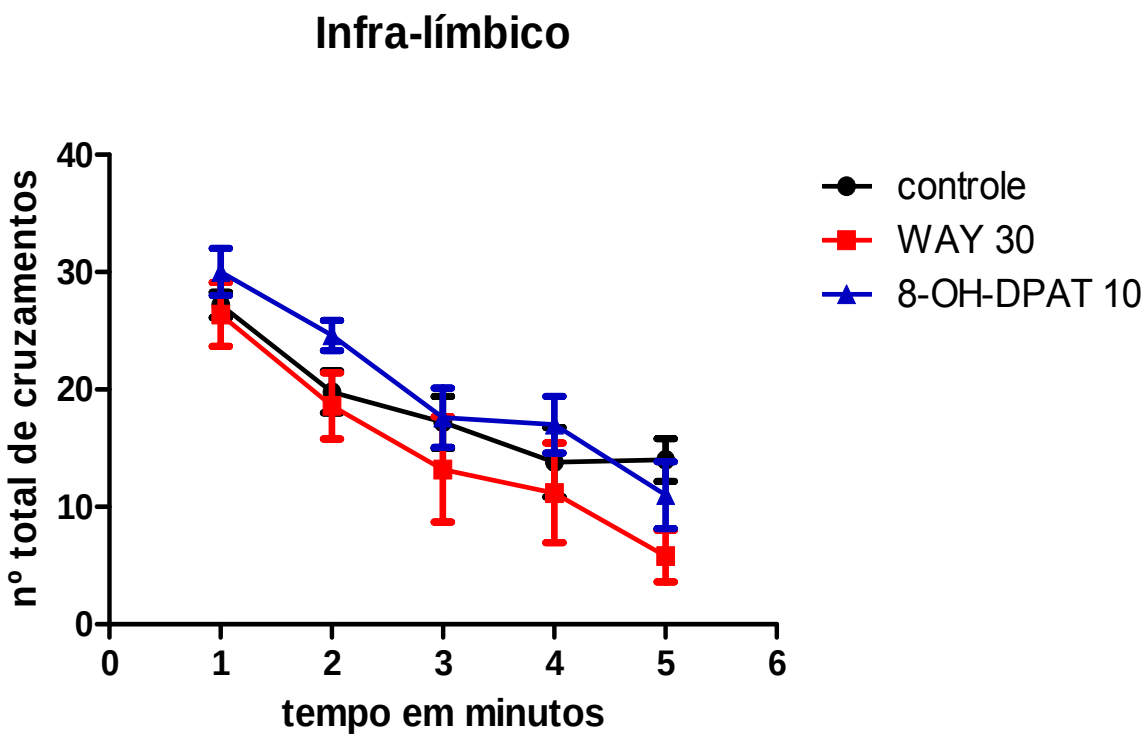

Fig. 11. Efeitos da administração de 8-OH-DPAT, na dose 10nmol/0,2µl/lado, ou WAY100635, na dose de 30 nmol/0,2µl/lado, intra-IL, sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto. Dados representam a média +/- erro padrão, (5 animais por grupo) (Anova de medidas repetidas, p>0.05 para efeito do tratamento).

4.7 Experimento 6: participação de receptores 5HT1A nos efeitos induzidos pela administração de canabidiol no PL e IL

Confirmando resultados do primeiro experimento, o tratamento com sal + CBD, na dose de 10nmol/0,2µl/lado, reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado quando comparado com o grupo sal + veículo ($F_{3,27}=8,933$, $P<0,05$, figura 9). Os efeitos do CBD foram revertidos pelo pré-tratamento com o antagonista 5-HT-1A, WAY100635 (30 nmol/0,2µl/lado) (Dunnett, $p>0,05$). WAY100635 30nmol + veículo não induziu alteração no tempo de imobilidade dos animais.

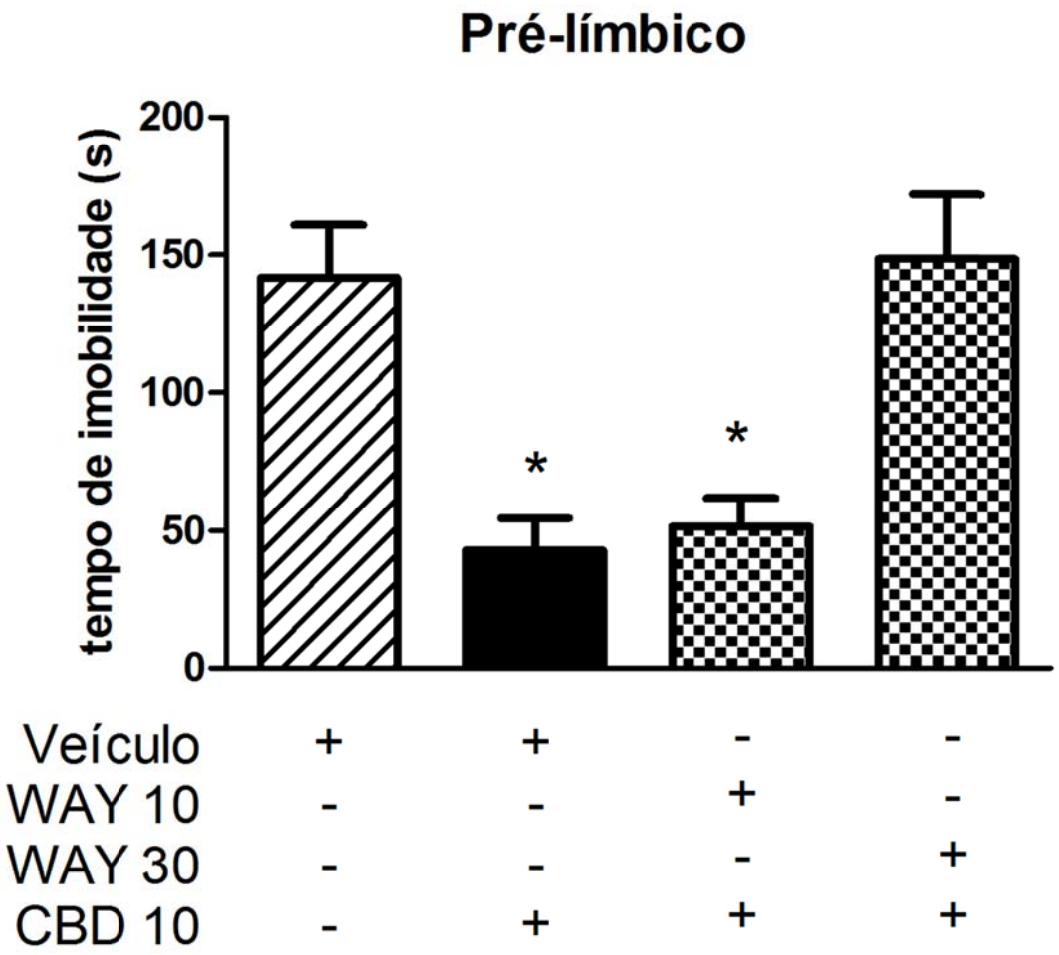

Fig. 12. Efeitos do pré-tratamento com WAY 100635, nas doses de 10 e 30 nmol/0,2µl/lado sobre os efeitos do CBD (10 nmol/0,2µl/lado), intra-PL, no tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado (n 6-10 por grupo). Os dados são representados pela média +/- erro padrão. *p<0,05 (one-way ANOVA, seguido de Dunnets

Confirmando resultados do primeiro experimento, o tratamento com sal + CBD, na dose de 10nmol/0,2µl/lado, reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado quando comparado com o grupo sal + veículo ($F_{3,22}=7,125$, $P<0,05$, figura 13). Os efeitos do CBD foram revertidos pelo pré-tratamento com o antagonista 5-HT-1A, WAY100635 (30 nmol/0,2µl/lado) (Dunnets, $p>0,05$). WAY100635 30nmol + veículo não induziu alteração no tempo de imobilidade dos animais.

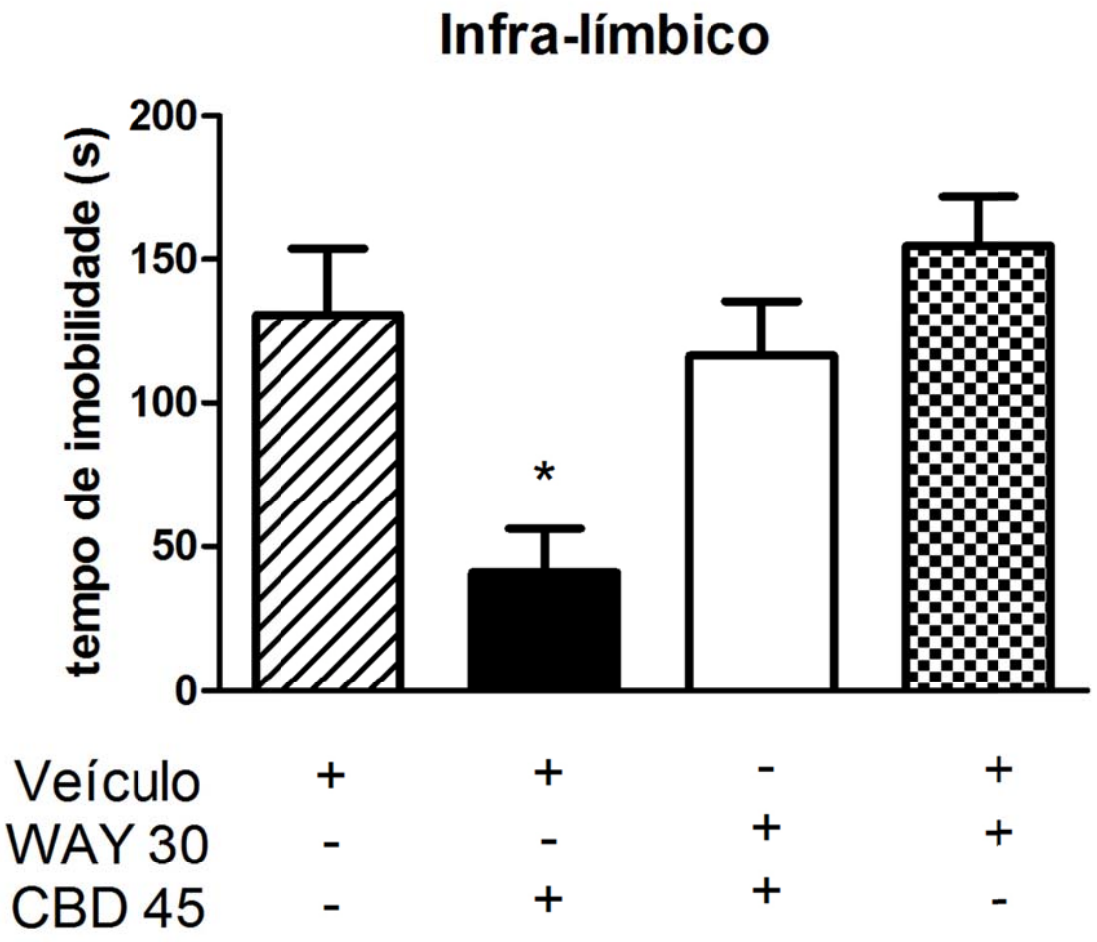

Fig. 13. Efeitos do pré-tratamento com WAY 100635, na dose de 30 nmol/0,2µl/lado sobre os efeitos do CBD (45 nmol/0,2µl/lado), intra-IL, no tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado (n 6-7 por grupo). Os dados são representados pela média +/- erro padrão. *$p<0,05$ (one-way ANOVA, seguido de Dunnets).

Discussão

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, a administração local de CBD no CPFmv, PL e IL, reduziu do tempo de imobilidade em ratos submetidos ao teste do nado forçado. Além disso, esse efeito foi prevenido pela pré-administração de WAY100635, um antagonista de receptores 5-HT1A, e mimetizado pelo tratamento com 8-OH-DPAT, um agonista 5-HT1A. Juntos, esses resultados indicam que o CBD, quando administrado no CPFmv, PL e IL, produz resposta tipo-antidepressiva e que esse efeito depende da ativação de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT1A.

O nado forçado é amplamente utilizado como teste preditivo de efeito antidepressivo. Este se baseia na observação de que ratos colocados em um cilindro com água sem possibilidade de sair assumem um perfil de imobilidade e o tratamento com antidepressivos diminui o tempo em posição imóvel (Porsolt et al 1978; Porsolt et al 1977). Esse teste, assim como a maioria dos modelos animais de depressão, se baseia na avaliação de uma consequência comportamental decorrente da exposição a evento estressante que pode ser revertido por drogas antidepressivas (Slattery e Cryan, 2012).

Considerando que o teste do nado forçado se baseia em uma avaliação da atividade motora, as drogas utilizadas nesse modelo não devem alterar a capacidade locomotora para não favorecer interpretações erradas dos dados obtidos, gerando falsos positivos. Portanto, foi realizado o teste do campo aberto em grupo independente de animais tratados com CBD nas mesmas doses e sob as mesmas condições experimentais do teste do nado forçado, para confirmar que o efeito tipo-antidepressivo do CBD não é secundário a mudança comportamental locomotora. Nossos dados corroboram trabalhos anteriores que mostraram que o CBD não é capaz de alterar a locomoção dos animais expostos ao teste do campo aberto (Burns et al 1996; Guimaraes et al 1990), demonstrando, portanto, que esse efeito seria realmente do tipo-antidepressivo e não decorrente de alteração locomotora.

Em 2010, Zanelati e colaboradores mostraram pela primeira vez, o efeito tipo-antidepressivo do CBD, após administração sistêmica, em camundongos submetidos ao teste do nado forçado. Nossos dados sugerem que o CPFmv esteja envolvido nesses efeitos, uma vez que a administração local de CBD intra-PL ou

intra-IL, promoveu uma resposta semelhante à da administração sistêmica, reduzindo o tempo de imobilidade dos animais.

O CPFmv tem sido proposto como uma importante estrutura cerebral envolvida em respostas comportamentais, sendo funcionalmente interligado ao sistema límbico. Nesse sentido, o CPFmv é fortemente conectado com o núcleo accumbens, amígdala e hipocampo (Sesack et al 1989, Hurley et al 1991, Takagishi and Chiba 1991, Gabbott et al 2003) . O CPFmv participa de diversas funções cerebrais de alta ordem, incluindo controle víscero-motor, atenção seletiva e tomada de decisão (Goldman-Rakic 1987, Petrides 1995, Fuster 2001). Além disso, parece ser a estrutura central no controle de funções superiores chamadas de “memória de trabalho”. A memória de trabalho é definida como a capacidade de armazenar um conjunto de informações, a fim de executar tarefas complexas. Para isso, é requerida a integração da memória e o processamento cognitivo (Drago et al., 2011).

A participação do PL e IL nas funções acima citadas ainda não é claramente identificada. Trabalhos demonstram participação oposta do IL e PL em respostas autonômicas, endócrinas e emocionais ao estresse (Marquis et al, 2007). Por outro lado, outros estudos sugerem a participação similar do PL e IL no controle emocional (Frysztak e Neafsey 1994, Powell et al 1994).

Scopinho et al em 2010 avaliaram os efeitos da inativação aguda temporária da transmissão sináptica no IL ou no PL na modulação das consequências comportamentais do estresse induzido pelo nado forçado em ratos. Os resultados obtidos demonstraram que a inativação do IL ou do PL induz efeito tipo-antidepressivo, indicando, portanto, uma participação similar das regiões (PL e IL) na modulação de comportamentos induzidos pelo nado forçado. Por outro lado, Hamani e colaboradores (Hamani et al 2010) demonstraram resultados contraditórios, sendo que o bloqueio do PL levou ao efeito tipo-antidepressivo, o que não foi observado no IL. Essa diferença de efeito deve estar relacionada ao protocolo experimental empregado, pois o momento do bloqueio da estrutura por Hamani foi 2 horas antes do teste e por Scopinho imediatamente antes do teste.

Devido à existência de resultados contraditórios da literatura em relação à participação do PL e IL em respostas comportamentais ao estresse, no presente trabalho foi realizada a administração de CBD no PL e IL para avaliar se as duas estruturas promoveriam respostas semelhantes no teste do nado forçado. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os de Scopinho et al, 2010, uma

vez que a administração de CBD, tanto no PL quanto no IL, reduziu o tempo de imobilidade, um efeito do tipo-antidepressivo. Quando administrado no PL, o CBD foi efetivo nas doses de 10, 30 e 60 nmol/0,2µl/lado, sendo que a intensidade do efeito foi mais proeminente nas doses de 10 e 60nMol/0,2µl/lado. Já no IL, observou-se tal efeito nas doses de 45 e 60 nmol/0,2µl/lado, sendo que a dose de 30nmol/0,2µl/lado demonstrou um perfil semelhante ao controle. Portanto, parece que o efeito tipo-antidepressivo do CBD, quando administrado no PL e IL, é dose dependente.

É importante salientar que houve uma diferença entre a menor dose efetiva nas duas estruturas. No PL a menor dose efetiva foi de 10nmol/0,2µl/lado, enquanto que no IL o efeito só foi observado com o CBD a partir da dose de 45nmol/0,2µl/lado. A diferença de efeito do CBD entre as duas estruturas demonstra uma menor sensibilidade do IL à droga quando comparado ao PL. O mecanismo que confere essa diferença entre as subregiões corticais não é conhecido, porém, possivelmente se deva as diferentes eferências do PL e IL, que geram resposta no mesmo sentido, porém com diferença de sensibilidade (Kesner and Churchwell, 2011).

O grupo controle, denominado OUT, é importante para salientar a participação do CPFmv no efeito tipo-antidepressivo do CBD, uma vez que pode-se observar que, quando a droga é administrada em regiões subjacentes ao PL e IL, o efeito tipo antidepressivo não é observado.

A neurotransmissão serotoninérgica é bastante estudada no controle emocional e tratamento da depressão, desempenhando importante papel na sua neurobiologia. A maioria das drogas utilizadas no tratamento da depressão altera a neurotransmissão serotoninérgica e, com isso, o papel desta monoamina na depressão tem sido extensamente estudado. Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, como fluoxetina e paroxetina, são a classe de antidepressivos mais utilizados na clínica por serem eficazes e seguros (Carr and Lucki, 2011). No mesmo sentido, estudos em humanos reportam uma deficiência de receptores 5-HT1A funcionais em pacientes deprimidos (Savitz et al 2009), além de que polimorfismo de um alelo na região promotora de receptores 5-HT1A (C10196) ter sido identificado como risco para desordens de ansiedade e de depressão e resistência aos efeitos dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs) (Le Francois et al, 2008). O conjunto de dados acima citados reforçam a importância da neurotransmissão serotoninérgica na neurobiologia e tratamento da depressão.

Trabalhos demonstram que a ativação de receptores 5-HT1A pós-sinápticos é essencial para o efeito antidepressivo observado por agonistas 5-HT1A e, possivelmente, pelos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (Burnet et al, 1995; Haddjeri et al 1998). No teste do nado forçado, antidepressivos que atuam no sistema serotoninérgico, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, induzem efeito tipo- antidepressivo, reduzindo o tempo de imobilidade (Detke et al., 1995). Ademais, agonistas 5-HT1A produzem efeito tipo-antidepressivo em modelos animais como o nado forçado, bulbectomia olfatória e desamparo aprendido (Cervo et al 1988, Cryan et al 1997). Tem sido sugerido que o estresse ou fatores genéticos podem alterar os efeitos mediados por receptores 5-HT1A em estruturas límbicas, como o hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala, diminuindo sua funcionalidade (Graeff et al., 1996). De fato, estudo eletrofisiológico mostra que o tratamento crônico com diferentes antidepressivos parece aumentar a ativação tônica de receptores 5-HT1A pós-sinápticos localizados no hipocampo (Haddjeri et al., 1998). Nesse mesmo sentido, a ativação de receptores 5-HT1A pós-sinápticos do hipocampo induz efeito tipo-antidepressivo no modelo animal do desamparo aprendido (Joca et al, 2003). No entanto, a participação de receptores 5-HT1A do CPFm nesses efeitos permanecia não investigado.

Assim, nossos resultados com a administração de um agonista seletivo para receptores 5-HT1A (8-OH-DPAT 10nmol/0,2µl/lado) evidenciam que a ativação desses receptores no CPFmv, tanto PL quanto IL, promove efeito do tipo-antidepressivo no teste animal do nado forçado. Este dado sugere que a neurotransmissão serotonérgica cortical via receptores 5-HT1A seja importante na neurobiologia da depressão e no mecanismo de ação de drogas antidepressivas. No entanto, ainda não é bem conhecido o mecanismo pelo qual a ativação de receptores 5-HT1A modula a resposta ao estresse ou promove efeito tipo-antidepressivo.

Também permanece pouco compreendido o mecanismo através do qual o CBD desempenha seus efeitos sobre a resposta ao estresse. Sabe-se que, dentre outros mecanismos, ele atua como antagonista ou agonista inverso de receptores CB1 (Thomas et al., 1998; Petitet et al., 1998) e, além disso, interfere na neurotransmissão endocanabinóide por inibir a recaptação e degradação de anandamida (Bisogno et al, 2001; Watanabe et al., 1998). Alguns trabalhos relatam também a atuação de CBD como agonista de receptores 5HT1A (Magen et al, 2010; Massi et al 2008). Ensaios *in vitro* mostram que o CBD possui afinidade por receptores 5-HT1A, sendo capaz de

deslocar o agonista desses receptores (8-OH-DPAT) do sítio de ligação de maneira dose-dependente. Além disso, nesse mesmo estudo, o CBD reduziu a produção de AMPc de maneira semelhante à serotonina, evidenciando portanto, a atuação do CBD como um agonista desses receptores (Russo et al., 2005).

Evidências indicam a importância da ativação de receptores 5-HT1A no efeito do CBD em diferentes respostas comportamentais ao estresse. Resstel e colaboradores demonstraram a participação desses receptores no efeito sistêmico do CBD em respostas comportamentais e cardiovasculares decorrentes do estresse de restrição. Nesse estudo, o estresse de imobilização aumentou a pressão arterial, frequência cardíaca e níveis de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado, e o CBD foi capaz de atenuar essas respostas. O pré-tratamento com WAY100635 (antagonista 5-HT1A) reverteu os efeitos do CBD (Resstel et al., 2009). Também foi demonstrado que o antagonista 5-HT1A, WAY100635, quando injetado diretamente na PAG antagoniza o efeito ansiolítico do CBD nos testes do labirinto em cruz elevado e teste do conflito de Vogel (Campos e Guimarães, 2008).

No teste do nado forçado, o efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração sistêmica de CBD foi revertido pela pré-administração de WAY100635, sendo então, dependente da ativação de receptores 5-HT1A (Zanelati et al, 2010). Os dados do presente trabalho também demonstram a participação de receptores 5-HT1A na resposta tipo-antidepressiva do canabidiol quando administrado no PL e no IL, uma vez que os efeitos do CBD foram revertidos pela pré-administração de WAY100635 (30nmol), um antagonista seletivo 5-HT1A. Esses dados são consistentes com observações anteriores de que os efeitos neuroprotetor (Hayakawa et al., 2007) e ansiolítico (Resstel et al., 2009) induzido pelo CBD são sensíveis ao pré-tratamento com antagonista de receptores 5-HT1A.

No córtex pré-frontal os receptores 5-HT1A são encontrados em neurônios piramidais glutamatérgicos pós-sinápticos, sendo que a sua estimulação reduz a excitabilidade neuronal e a liberação de glutamato (Lopez-Gil et al, 2010; Araneda e Andrade 1991), uma vez que os receptores 5-HT1A estão acoplados à proteína Gi/o, (Lopez-Gil et AL, 2010). Sabendo-se que a inativação do CPFmv (Scopinho et al, 2010), PL e IL, e o bloqueio de receptores glutamatérgicos NMDA (Pereira and Joca, 2012) dessa estrutura promove efeito do tipo-antidepressivo, o efeito tipo-antidepressivo do CBD, quando administrado no CPFmv, poderia ser decorrente da diminuição da excitabilidade de neurônios glutamatérgicos.

Uma das teorias para explicar a neurobiologia da depressão se baseia na hiperfuncionalidade glutamatérgica em diferentes estruturas cerebrais. Estudos de neuroimagem em humanos demonstram uma alteração no volume de diversas estruturas cerebrais, dentre elas o CPFmv, em pacientes com depressão (McEwen and Magarinos, 2001). Alguns trabalhos correlacionam esse fato ao aumento local da neurotransmissão glutamatérgica (McEwen and Magarinos, 2001; Shansky et al, 2009). Trabalhos *post mortem* evidenciam uma hiperatividade da neurotransmissão glutamatérgica no CPFmv em pacientes vítimas de suicídio que sofriam de depressão (Paul and Skolnick, 2003). Além disso, o tratamento com antidepressivos costuma reverter esse quadro, trazendo os níveis de glutamato para o normal (Paul and Skolnick, 2003).

Antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA produzem rápido efeito antidepressivo quando administrados sistemicamente em humanos e roedores (Krystal et al., 1994, Berman et al., 2000, Zarate et al., 2006; Preskorn et al., 2008; Maeng et al., 2008, Li et al., 2010 and Li et al., 2011). O CPFm parece desempenhar importante papel nesse efeito, uma vez que a ação antidepressiva ocorre em paralelo com várias mudanças como, favorecimento da via de sinalização do alvo mamário de rapamicina (mTOR) e aumento da expressão de proteínas sinápticas (AMPA e GluA1) nessa região (Li et al, 2010). Além disso, a administração local, no CPFmv, de antagonista NMDA induz redução do tempo de imobilidade em ratos submetidos ao teste do nado forçado, um efeito do tipo-antidepressivo (Pereira and Joca, 2012). Paralelamente, a ativação de alguns subtipos de receptores serotoninérgicos, como o 5-HT1A, resulta na diminuição da liberação de glutamato (Torres-Escalante et al., 2004). Além disso, um trabalho recente reportou que antidepressivos utilizados na clínica, que atuam na modulação da serotonina, diminuem a liberação de glutamato no CPF, em um modelo animal (Schilstrom et al., 2010).

Sabendo que o estresse, através da ativação de receptores mineralocorticoides e glicocorticoides, aumenta a liberação de glutamato em estruturas como o córtex pré-frontal (Musazzi et al, 2011), e considerando-se que o teste do nado forçado se baseia na exposição do animal a um evento estressante, possivelmente, no presente trabalho, o CBD, ao ativar receptores 5-HT1A localizados em neurônios piramidais glutamatérgicos corticais, pode diminuir a neurotransmissão glutamatérgica no CPFmv, consequentemente, atenuando os efeito induzidos pela exposição ao estresse.

A amígdala, estrutura cerebral amplamente relacionada ao controle emocional, possui generalizadas conexões corticais, sendo que as mais intensas projeções glutamatérgicas ocorrem com o CPFmv (Amaral and Price, 1984). O circuito córtex pré-frontal-hipocampo-amígdala se encontra disfuncional em pacientes deprimidos, com aumento da atividade da amígdala (Price and Drevets, 2010). Essa alteração funcional pode estar relacionada à ineficiência na função do CPF durante a depressão (Price and Drevets, 2010). Além disso, o tratamento antidepressivo costuma diminuir a atividade da amígdala em estudos realizados em ratos e humanos (Price and Drevets, 2010). Nesse sentido, drogas que interferem no sistema serotoninérgico podem suprimir a atividade da amígdala por promover uma supressão do CPF sobre a amígdala (Marsden, 2012). Dessa forma, o CBD, quando administrado no CPFmv, pode alterar a atividade do circuito córtex pré-frontal-amígdala através da ativação de receptores 5-HT1A. O CBD pode também interferir em projeções anatômicas do CPFmv e amígdala para o hipotálamo, PAG, lócus coeruleus e raphe, estruturas importantes na organização de respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais a estímulos estressores (Ongur et al, 2003).

Memórias emocionais aversivas são importantes para controlar o comportamento, e a regulação da expressão dessas memórias é crítica em desordens mentais como a depressão e ansiedade (Corcoran and Quirk, 2007). O modelo animal de condicionamento de medo é uma ferramenta particularmente útil para avaliar os mecanismos envolvidos na aprendizagem e memória aversivas, (Johansen et al., 2011). Os mecanismos pelos quais o CPFmv desempenha sua modulação sobre os processos de evocação e de extinção de memória tem sido extensivamente estudados. Nesse sentido, Lemos e colaboradores (2010) demonstraram que o CPFmv participa do processo de atenuação do medo condicionado ao contexto promovido pelo CBD (Lemos et al., 2010). Além disso, a administração de inibidores seletivos da recaptação de serotonina e agonistas 5-HT1A diminui a expressão de medo condicionado (Inoue et al., 2004).

Considerando-se que existem receptores 5-HT1A pós-sinápticos localizados em neurônios glutamatérgicos corticais, a administração de CBD no CPFmv pode estar interferindo em processos de memória, impedindo a evocação, e, em decorrência disso, a exposição ao estresse do nado forçado no dia do teste pode não ser tão aversiva.

A via mesolímbica dopaminérgica é conhecida como o centro dos processos motivacionais, e a sua disfunção pode contribuir para a anedonia observada em pacientes depressivos (Salamone and Correa, 2012; Price and Drevets, 2010). Os neurônios dopaminérgicos surgem na área tegmental ventral do mesencéfalo, de onde emite projeções para o núcleo accumbens, amígdala e CPF (Nestler et al, 2002). A amígdala e o núcleo accumbens são as áreas cerebrais mais importantes na formação de memória emocional sendo que alterações nessas estruturas podem ser responsáveis pela anedonia e baixa motivação observada em pacientes com depressão (Nestler et al, 2002).

O CPF, por participar da via dopaminérgica mesolímbica, modula a liberação fásica de dopamina através de suas projeções com a área tegmentar ventral, além de emitir também projeções glutamatérgicas para o núcleo accumbens. Dessa forma, o CPF desempenha um importante papel na mediação de propriedades de reforço e recompensa (Nestler and Carlezon, 2006), e a sua disfunção pode contribuir para o desenvolvimento de anedonia e falta de atenção manifestada na depressão (Der-Avakian and Markou, 2012).

A exposição a evento estressante, mesmo de baixa intensidade, ativa a via dopaminérgica mesoprefrontal, aumentando os níveis extracelulares de dopamina no CPFm (Venator et al., 1999; Horger and Roth., 1996). Além disso, interneurônios gabaérgicos corticais possuem receptores dopaminérgicos do tipo D2, que são acoplados à proteína G inibitória. Esse processo inibe a inibição promovida pelos interneurônios gabaérgicos e aumenta a excitabilidade cortical. Como o CBD pode ativar receptores 5-HT1A em neurônios glutamatérgicos ou dopaminérgicos, a ação da droga pode estar compensando o mecanismo da via mesocortical dopaminérgica e assim, reduzindo o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado por aumentar a motivação durante o teste.

Neuroplasticidade constitui um conjunto de alterações que ocorrem em regiões cerebrais específicas quando o indivíduo é submetido a mudanças ambientais (Pittenger and Duman, 2008). Essas alterações incluem remodelagem neuronal, novas conectividades entre neurônios e circuitos neuronais (Marsden, 2012). Estudos com animais e humanos têm associado a depressão à mudanças específicas na forma e função sináptica, como atrofia neuronal ou reorganização dendrítica (Cook and Wellman, 2004; Rajkowska G et al. 1999). Dentre as regiões envolvidas em processos de plasticidade sináptica, deve-se destacar o CPFmv e o

hipocampo (Cook and Wellman, 2004; Rajkowska G et al. 1999). A elevação da transmissão glutamatérgica e secreção de cortisol em desordens de humor podem contribuir para a redução da matéria cinzenta de certas estruturas cerebrais como o CPFmv (Drevets et al., 2008). Nesse mesmo sentido, a exposição de camundongos a breve estresse inescapável, em uma ou três seções, reduz a arborização dendrítica no CPFm (Izquierdo et al., 2006). Tais alterações aparecem associadas a déficits comportamentais que podem estar relacionadas ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (Izquierdo et al., 2006).

O tratamento antidepressivo parece favorecer as conectividades sinápticas cerebrais, em especial os inibidores seletivos da recaptação de serotonina. Além disso, os níveis extracelulares de serotonina em animais adultos modulam a densidade de espinhas sinápticas (Hajszan et al., 2005; Bennett, 2010). Por outro lado, dados da literatura mostram que a administração crônica de CBD em animais submetidos ao estresse crônico variado induz neurogênese hipocampal (Campos et al., 2013). No entanto, acredita-se que o efeito tipo antidepressivo do CBD no presente trabalho não se deva a essas interferências plásticas, uma vez que a droga foi administrada apenas 10 minutos antes do teste, tempo considerado curto para que ocorra plasticidade sináptica.

Alguns efeitos comportamentais decorrentes da administração de CBD são mediados por receptores canabinóides do tipo 1. O efeito ansiolítico decorrente da administração crônica de CBD em animais submetidos ao protocolo de estresse crônico variado foi abolido pelo pré-tratamento com antagonista CB1 (Campos et al., 2013). Além disso, o efeito ansiolítico do CBD no modelo do *marble-burring* também é dependente de receptores CB1 (Casarotto et al, 2010). Portanto, o efeito tipo-antidepressivo promovido pela administração de CBD no CPFmv pode ser decorrente não somente da ativação de receptores 5-HT1A, mas também pela atuação em receptores CB1. Sendo assim, mesmo a administração de WAY100635 tendo bloqueado completamente o efeito induzido pelo CBD, esta hipótese não foi avaliada no presente trabalho e merece consideração.

Diante do exposto, nossos resultados demonstram que a administração de CBD no CPFm induz efeito tipo-antidepressivo por meio da ativação de receptores 5-HT1A, sugerindo que essa estrutura esteja envolvida no efeito tipo antidepressivo induzido pela administração sistêmica de CBD.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente trabalho mostram primeiramente que a ativação de receptores 5-HT1A, do CPFmv, PL e IL, induz efeito tipo-antidepressivo, sugerindo que a neurotransmissão serotoninérgica de ambas as regiões seja importante na neurobiologia da depressão. Além disso, o CBD apresenta efeito tipo antidepressivo quando administrado no CPFmv, PL e IL, no teste do nado forçado, sugerindo que essas estruturas participam do mecanismo de ação do CBD. Nosso trabalho sugere ainda, que os efeitos induzidos pela administração de CBD no PL e IL envolvem a neurotransmissão mediada por receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT1A.

Referências

REFERÊNCIAS

Abel EL, Bilitzke PJ. A possible alarm substance in the forced swimming test. *Physiol Behav*. 1990; 48:233-9

Adayev T, Ranasinghe B, Banerjee P. Transmembrane signaling in the brain by serotonin, a key regulator of physiology and emotion. *Biosci Rep*. 2005 Oct-Dec;25(5-6):363-85

Amaral DG, Price JL. Amygdalo-cortical projections in the monkey (Macaca fascicularis). *J Comp Neurol.* 1984 Dec;230(4):465-96.

Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol. 1999;* 58:315-48

Araneda R, Andrade R. 5-Hydroxytryptamine2 and 5-hydroxytryptamine 1A receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience*. 1991;40(2):399-412.

Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27:1–4.

Bambico FR, Katz N, Debonnel G, Gobbi G. Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J Neurosci.* 2007 Oct 24;27(43):11700-11.

Barbas H. Anatomic basis of cognitive-emotional interactions in the primate prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev.* 1995;19:499-510

Barnes, N.M.; Sharp, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 1999; 38:1083-1152.

Bennett MR. Synapse regression in depression: the role of 5-HT receptors in modulating NMDA receptor function and synaptic plasticity. *Aust N Z J Psychiatry.* 2010 Apr;44(4):301-8.

Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. Biol Psychi atry. 2000; 47:351–354

Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol.* 2001; 134:845-52

Biver F, Goldman S, Delvenne V, Luxen A, De Maertelaer V, et al. Frontal and parietal metabolic disturbances in unipolar depression. *Biol Psychiatry.* 1994; 36:381-8

Blier P, Ward NM. Is there a role for 5-HT1A agonists in the treatment of depression? Biol Psychiatry. 2003 Feb 1;53(3):193-203.

Boldrini M, Underwood MD, Mann JJ, Arango V. Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *J Psychiatr Res.* 2008; 42:433-42

Bonfa L, Vinagre RC, de Figueiredo NV. Cannabinoids in chronic pain and palliative care. *Rev Bras Anestesiol.* 2008; 58:267-79

Bowen DM, Najlerahim A, Procter AW, Francis PT, Murphy E. Circumscribed changes of the cerebral cortex in neuropsychiatric disorders of later life. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86:9504-8

Braida D, Limonta V, Malabarba L, Zani A, Sala M. 5-HT1A receptors are involved in the anxiolytic effect of Delta9-tetrahydrocannabinol and AM 404, the anandamide transport inhibitor, in Sprague-Dawley rats. *Eur J Pharmacol*. 2007; 555:156-63

Brody AL, Saxena S, Mandelkern MA, Fairbanks LA, Ho ML, Baxter LR. Brain metabolic changes associated with symptom factor improvement in major depressive disorder. *Biol Psychiatry.* 2001; 50:171-8

Brown GW, Harris T. Social Origins of Depression: A Study of Psychiatric Disorder in Women. London: Tavistock, 1978.

Burgos-Robles, A., Vidal-Gonzalez, I., Santini, E., and Quirk, G.J. Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron*. 2007; 53:871–880.

Burnet PW, Mead A, Eastwood SL, Lacey K, Harrison PJ, Sharp T. Repeated ECS differentially affects rat brain 5-HT1A and 5-HT2A receptor expression. *Neuroreport.* 1995 Apr 19;6(6):901-4.

Burns LH, Annett L, Kelley AE, Everitt BJ, Robbins TW. Effects of lesions to amygdala, ventral subiculum, medial prefrontal cortex, and nucleus accumbens on the reaction to novelty: implication for limbic-striatal interactions. *Behav Neurosci.* 1996; 110:60-73

Campos AC, Guimaraes FS.Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology.* 2008; 199:223-30

Campos AC, Ortega Z, Palazuelos J, Fogaça MV, Aguiar DC, Díaz-Alonso J, Ortega-Gutiérrez S, Vázquez-Villa H, Moreira FA, Guzmán M, Galve-Roperh I, Guimarães FS. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013 Jan; 9:1-13

Carmichael ST, Price JL. Sensory and premotor connections of the orbital and medial prefrontal cortex. *J Comp Neurol.* 1995; 363: 642–664.

Carr DB, Sesack SR. Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic targets and relation to dopamine terminals. *J. Comp. Neurol.* 1996; 369, 1–15.

Carr GV, Lucki I. The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies. Psychopharmacology. 2011 Feb;213(2-3):265-87.

Casarotto PC, Gomes FV, Resstel LB, Guimarães FS. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. *Behav Pharmacol.* 2010 Jul; 21(4):353-8

Castillo PE, Younts TJ, Chávez AE, Hashimotodani Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*. 2012 Oct 4;76(1):70-81.

Castren E. Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6:241-6

Cervo L, Grignaschi G, Samanin R. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a selective serotonin1A receptor agonist, reduces the immobility of rats in the forced swimming test by acting on the nucleus raphe dorsalis. *Eur J Pharmacol*. 1988 Dec 6;158(1-2):53-9

Chaouloff F. Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Res Rev.* 1993 Jan-Apr;18(1):1-32

Cheetham SC, Crompton MR, Katona CL, Horton RW. Brain 5-HT1 binding sites in depressed suicides. *Psychopharmacology (Berl).* 1990; 102:544-8

Christie MJ , Vaughan CW . Cannabinoids act backwards. *Nature.* 2001; 410:527–530

Cook SC, Wellman CL. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol.* 2004 Aug;60(2):236-48.

Corcoran KA, Quirk GJ. Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *J Neurosci*. 2007 Jan 24;27(4):840-4.

Costa B, Giagnoni G, Franke C, Trovato AE, Colleoni M. Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br J Pharmacol*. 2004; 143, 247–250.

Crippa JAD, Zuardi AW, Garrido GEJ, Wichert-Ana L, Guarnieri R, Ferrari L, Azevedo-Marques PM, Hallak JEC, McGuire PK, Busatto GF. Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29: 417–426

Cryan JF, Markou A. Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002; 23, 238–245

Cryan JF, Redmond AM, Kelly JP, Leonard BE. The effects of the 5-HT1A agonist flesinoxan, in three paradigms for assessing antidepressant potential in the rat. Eur *Neuropsychopharmacol*. 1997 May;7(2):109-14.

Cryan, JF, Valentino RJ, Lucki, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. Neurosci. Biobehav. Rev. 2005; 29, 547–569

Czeh B, Perez-Cruz C, Fuchs E, Flugge G. Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? *Behav Brain Res.* 2008; 190:1-13

Dannlowski U, Ohrmann P, Konrad C, Domschke K, Bauer J, Kugel H, Hohoff C, Schoning S, Kersting A, Baune BT, Mortensen LS, Arolt V, Zwitserlood P, Deckert J, Heindel W, Suslow T. Reduced amygdala-prefrontal coupling in major depression: association with MAOA genotype and illness severity Int. *J. Neuropsychopharmacol.* 2009; 12:11–22

De Vry J. 5-HT1A receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology (Berl*). 1995 Sep;121(1):1-26.

Der-Avakian A, Markou A. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends Neurosci*. 2012 Jan;35(1):68-77.

Detke MJ, Lucki I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. Behav. Brain Res. 1996; 73: 43–46

Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. Psychopharmacology (Berl). 1995; 121:66 – 72

Detke MJ, Wieland S, Lucki I. Blockade of the antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT, buspirone and desipramine in the rat forced swim test by 5HT1A receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl).* 1995; 119:47-54

Devane WA, Dysarz II FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988; 34:605–613.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258:1946-9

Di Matteo V, Di Giovanni G, Pierucci M, Esposito E Serotonin control of central dopaminergic function: focus on in vivo microdialysis studies. *Prog Brain Res.* 2008; 172:7 – 44

Drago A, Crisafulli C, Sidoti A, Serretti A. The molecular interaction between the glutamatergic, noradrenergic, dopaminergic and serotoninergic systems informs a detailed genetic perspective on depressive phenotypes. *Prog Neurobiol*. 2011 Sep 1;94(4):418-60.

Drevets WC, Price JL, Bardgett ME, Reich T, Todd RD, Raichle ME. Glucose metabolism in the amygdala in depression: relationship to diagnostic subtype and plasma cortisol levels. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002; 71:431–447.

Drevets WC, Price JL, Furey ML. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct.* 2008 Sep;213(1-2):93-118.

Drevets WC, Videen TO, Price JL, Preskorn SH, Carmichael ST, Raichle ME. A functional anatomical study of unipolar depression. *J Neurosci.* 1992; 12:3628-41

Drevets WC. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2001; 11: 240–249.

Dwivedi Y, Rizavi HS, Shukla PK, Lyons J, Faludi G, Palkovits M, Sarosi A, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN. Protein kinase A in postmortem brain of depressed suicide victims: altered expression of specific regulatory and catalytic subunits. *Biol. Psychiatry.* 2004; 55, 234–243.

Frysztak RJ, Neafsey EJ. The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in the rat. *Brain Res.* 1994 Apr 18;643(1-2):181-93.

Fuster JM. The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. *Neuron*. 2001 May;30(2):319-33

Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Bacon SJ. Areal and synaptic interconnectivity of prelimbic (area 32), infralimbic (area 25) and insular cortices in the rat. *Brain Res*. 2003 Dec 12;993(1-2):59-71.

Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 1964; 86:1646–47

Godsil BP, Kiss JP, Spedding M, Jay TM. The hippocampal-prefrontal pathway: The weak link in psychiatric disorders? Eur Neuropsychopharmacol. 2013 Jan 14.doi:pii: S0924-977X(12)00313-6. 10.1016/j.euroneuro.2012.10.018.

Goldman-Rakic PS. Circuitry of the frontal association cortex and its relevance to dementia. *Arch Gerontol Geriatr.* 1987 Sep;6(3):299-309

Graeff FG, Guimarães FS, Andrade GCS, Deakin JFW. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. *Pharmaco Biochem Behav.* 1996; 54 (1): 129–141

Graeff, F.G. Serotonergic systems. *Psychiatric Clinics North América*. 1997; 20: 723-739

Greicius MD, Flores BH, Menon V, Glover GH, Solvason HB, et al. Resting-state functional connectivity in major depression: abnormally increased contributions from subgenual cingulate cortex and thalamus. *Biol Psychiatry.* 2007; 62:429-37

Groenewegen HJ, Uylings HB. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res*. 2000;126:3-28.

Groenewegen HJ. Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. *Neuroscience.* 1988 24:379-431

Guimaraes FS, Chiaretti TM, Graeff FG, Zuardi AW. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 1990; 100:558-9

Guimarães, F.S. Modelos experimentais de doenças mentais. Revista ABP-APAL. 1993; 15(4):149-152

Haddjeri N, Blier P, de Montigny C. Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT1A receptors. *J Neurosci.* 1998; 18:10150-6

Hajós M, Richards CD, Székely AD, Sharp T. An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. *Neuroscience*. 1998 Nov;87(1):95-108.

Hajszan T, MacLusky NJ, Leranth C. Short-term treatment with the antidepressant fluoxetine triggers pyramidal dendritic spine synapse formation in rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2005 Mar;21(5):1299-303.

Hamani C, Diwan M, Macedo CE, Brandao ML, Shumake J, et al. Antidepressant-like effects of medial prefrontal cortex deep brain stimulation in rats. *Biol Psychiatry.* 2010; 67:117-24

Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and (–) delta-9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:8268–8273

Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, Ogata A, Hazekawa M, et al. Repeated treatment with cannabidiol but not Delta9-tetrahydrocannabinol has a neuroprotective effect without the development of tolerance. *Neuropharmacology.* 2007; 52:1079-87

Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 1997 Feb; 20(2):78-84

Herry C. and Garcia R. Prefrontal cortex long-term potentiation, but not long-term depression, is associated with the maintenance of extinction of learned fear in mice. *J. Neurosci*. 2002; 22: 577–583.

Holsboer F, Lauer CJ, Schreiber W et al. Altered hypothalamic pituitary–adrenocortical regulation in healthy subjects at high familial risk for affective disorders. *Neuroendocrinology.* 1995; 62:340–7

Horger BA, Roth RH. The role of mesoprefrontal dopamine neurons in stress. *Crit Rev Neurobiol*. 1996;10(3-4):395-418

Huether G, Doering S, Ruger U, Ruther E, Schussler G. The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks. *Psychiat Res.* 1999; 87:83-95

Hugues S, Chessel A, Lena I, Marsault R, Garcia R: Prefrontal infusion of PD098059 immediately after fear extinction training blocks extinction-associated prefrontal synaptic plasticity and decreases prefrontal ERK2 phosphorylation. *Synapse.* 2006, 60:280-287.

Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper CB. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol*. 1991 Jun 8;308(2):249-76.

Inoue T, Kitaichi Y, Koyama T. SSRIs and conditioned fear. Prog *Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011 Dec 1;35(8):1810-9

Ishikawa A, Nakamura, S. Convergence and interaction of hippocampal and amygdalar projections within the prefrontal cortex in the rat. *J. Neurosci.* 2003; 23:9987–9995.

Ishikawa A. Nakamura S. Ventral hippocampal neurons project axons simultaneously to the medial prefrontal cortex and amygdala in the rat. *J. Neurophysiol*. 2006; 96:2134–2138

Izquierdo A, Wellman CL, Holmes A. Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *J Neurosci.* 2006 May 24; 26(21):5733-8

Jans LA, Riedel WJ, Markus CR, Blokland A. Serotonergic vulnerability and depression: assumptions, experimental evidence and implications. *Mol Psychiatry* 2007; 12:522-43

Jeltsch-David H, Koenig J, Cassel JC. Modulation of cholinergic functions by serotonin and possible implications in memory: general data and focus on 5-HT(1A) receptors of the medial septum. *Behav Brain Res* 2008; 195:86 – 97

Joca SR, Guimarães FS. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology (Berl).* 2006 Apr;185(3):298-305.

Joca SR, Padovan CM, Guimarães FS. Activation of post-synaptic 5-HT(1A) receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. *Brain Res*. 2003 Jul 18;978(1-2):177-84.

Joca SR, Padovan CM, Guimarães FS. Stress, depression and the hippocampus. *Rev Bras Psiquiatr*. 2003 Dec; 25 Suppl 2:46-51

Joëls M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009; 10:818 459–466.

Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, LeDoux JE. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*. 2011 Oct 28;147(3):509-24.

Jovanovic T, Ressler KJ. How the neurocircuitry and genetics of fear inhibition may inform our understanding of PTSD. *American Journal of Psychiatry.* 2010; 167(6):648–662.

Kalia M. Neurobiological basis of depression: an update. *Metabolism.* 2005; 54:24-7

Karst M, Salim K, Burstein S, Conrad I, Hoy L, Schneider U. Analgesic effect of the synthetic cannabinoid CT-3 on chronic neuropathic pain. *J Am Med Assoc.* 2003; 290:1757–1762

Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med*. 2003 Jan;9(1):76-81

Katona I, Sperlágh B, Sík A, Käfalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci*. 1999 Jun 1;19(11):4544-58

Kendler KS, Kessler RC, Walters EE, Maclean C, Nelae MC, Hesth AC, Eaves LJ. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. *Am J Psych.* 1995; 152(6):833-42

Kesner RP, Churchwell JC. An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiol Learn Mem*. 2011 Oct;96(3):417-31

Kondo H, Saleem KS, Price JL. Differential connections of the perirhinal and parahippocampal cortex with the orbital and medial prefrontal networks in macaque monkeys. *J Comp Neurol.* 2005; 493: 479–509.

Krettek JE, Price JL. An autoradiographic study of projections from the amygdaloid complex to the thalamus and cerebral cortex. J Comp Neurol 1977b; 172: 723–752

Krettek JE, Price JL. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 1977a; 171:157-91

Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Charney DS. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humansPsychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. Arch Gen Psychiatry. 1994; 51:199–214

Kubera M, Obuchowicz E, Goehler L, Brzeszcz J, Maes M. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35:744–59

Le François B, Czesak M, Steubl D, Albert PR. Transcriptional regulation at a HTR1A polymorphism associated with mental illness. *Neuropharmacology.* 2008 Nov;55(6):977-85.

LeDoux JE. Emotional memory systems in the brain. *Behavioural Brain Research*. 1993; 58(1–2):69–79

Lemos JI, Resstel LB, Guimarães FS. Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res*. 2010 Feb 11;207(1):105-11.

Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*. 2010; 329:959–964

Li N, Liu RJ, Dwyer JM, Banasr M, Lee B, Son H, Li XY, Aghajanian G, Duman RS. Glutamate N-methyl-d-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol Psychiatry*. 2011; 69:754–761

Likhtik E, Pelletier JG, Paz R, Paré D. Prefrontal control of the amygdala. *J Neurosci*. 2005 Aug 10;25(32):7429-37.

Lopez-Duran NL, Kovacs M, George CJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in depressed children and adolescents: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; 34:1272–83

López-Gil X, Artigas F, Adell A. Unraveling monoamine receptors involved in the action of typical and atypical antipsychotics on glutamatergic and serotonergic transmission in prefrontal cortex. *Curr Pharm Des*. 2010; 16(5):502-15

Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav. Pharmacol*. 1997; 8:523–532

Maejima T, Hashimoto K, Yoshida T, Aiba A, Kano M. Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron*. 2001 Aug 16;31(3):463-75.

Maeng S, Zarate CA, Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G, Manji HK. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry.* 2008; 63:349–352

Magen I, Avraham Y, Ackerman Z, Vorobiev L, Mechoulam R, Berry EM. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in mice with bile duct ligation. *J Hepatol*. 2009; 51:528–534

Magen I, Avraham Y, Ackerman Z, Vorobiev L, Mechoulam R, Berry EM. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT1A receptor activation. *Br J Pharmacol*. 2010 Feb;159(4):950-7.

Malfait AM, Galllily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreakos E, Mechoulam R, Feldmann M. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97:9561–9566

Maren S, Quirk GJ.Neuronal signalling of fear memory. *Natur Reviews Neuroscience*. 2004; 5(11):844–852

Markou A, Chiamulera C, Geyer MA, Tricklebank M, Steckler T. Removing obstacles in neuroscience drug discovery: the future path for animal models. *Neuropsychopharmacology*. 2009 Jan;34(1):74-89.

Marquis JP, Killcross S, Haddon JE. Inactivation of the prelimbic, but not infralimbic, prefrontal cortex impairs the contextual control of response conflict in rats. *Eur J Neurosci.* 2007; 25:559-66

Marsden WN. Stressor-induced NMDAR dysfunction as a unifying hypothesis for the aetiology, pathogenesis and comorbidity of clinical depression. *Med Hypotheses*. 2011; 77:508–28

Marsden WN. Synaptic plasticity in depression: Molecular, cellular and functional correlates. Prog Neuropsychopharmacol *Biol Psychiatry*. 2012 Dec; 43C:168-184

Massi P, Valenti M, Vaccani A, Gasperi V, Perletti G, Marras E, Fezza F, Maccarrone M, Parolaro D. 5-Lipoxygenase and anandamide hydrolase (FAAH) mediate the antitumor activity of cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid. *J Neurochem*. 2008 Feb;104(4):1091-100.

Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol.* 1993; 327:535–550

Mayberg HS, Brannan SK, Tekell JL, Silva JA, Mahurin RK, McGinnis S, Jerabek PA. Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. *Biol Psychiatry*. 2000 Oct 15;48(8):830-43.

Mayberg HS, Liotti M, Brannan SK, McGinnis S, Mahurin RK, et al. Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: converging PET findings in depression and normal sadness. *Am J Psychiatry.* 1999; 156:675-82

Mayberg HS, Lozano AM, Voon V, McNeely HE, Seminowicz D, et al. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron.* 2005; 45:651-60

McArthur R, Borsini F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006 Jul;84(3):436-52

McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 2000; 886:172-89

McEwen BS, Magarinos AM. Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. *Hum Psychopharmacol.* 2001 Jan;16(S1):S7-S19

Mechoulam R, Lichtman AH. Neuroscience. Stout guards of the central nervous system. *Science.* 2003; 302:65-7

Mechoulam R. Endocannabinoids and psychiatric disorders: the road ahead. *Rev Bras Psiquiatr.* 2010; 32, Suppl 1:S5-6

Mechoulam R. Marihuana chemistry. *Science.* 1970; 168:1159-66

Moreau, R. L. M. Cannabis. p. 307-317. In: OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. 2ªedição, 2003.

Morgan MA, Romanski LM, LeDoux JE. Extinction of emotional learning: Contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci. Lett*. 1993; 163:109–113

Musazzi L, Racagni G, Popoli M. Stress, glucocorticoids and glutamate release: effects of antidepressant drugs. *Neurochem Int.* 2011; 59:138–49

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*. 2002; 34: 13-25

Nestler EJ, Carlezon WA Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry*. 2006 Jun 15;59(12):1151-9

Ongur D, Price JL. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb. Cortex.* 2000; 10: 206–219.

Overmier JB, Seligman ME. Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *J Comp Physiol Psychol.* 1967 Feb;63(1):28-33.

Palazidou E. The neurobiology of depression. *Br Med Bull.* 2012;101:127-45.

Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1998; 95:10734–10739

Paul IA, Skolnick P. Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Nov;1003:250-72.

Peeters BWMM, Broekkamp CIE. Involvement of corticosteroids in theprocessing of stressful-life evnts. A possible implication for the development of depression. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol*. 1994. 49 (4-6):417-427

Pertwee RG. The pharmacology and therapeutic potential of cannabidiol. In: Di Marzo V (ed) Cannabinoids. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 32–83 2004

Petitet F, Jeantaud B, Reibaud M, Imperato A, Dubroeueq M. C. 'Complex pharmacology of natural cannabinoids: Evidence for partial agonist activity at delta 9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. *Life Sci*. 1998; 63 (1):PL1–PL6

Petrides M. Functional organization of the human frontal cortex for mnemonic processing. Evidence from neuroimaging studies. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Dec 15;769:85-96.

Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacolog*y. 2008; 33:88-109

Polter AM, Li X. 5-HT1A receptor-regulated signal transduction pathways in brain. *Cell Signal*. 2010 Oct; 22(10):1406-12

Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT1A receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci*. 1992 Feb; 12(2):440-53

Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*. 2012; 13:22–37

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 1978; 47:379-91

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977; 266:730-2

Post RM. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *Am J Psych.* 1992; 149(8):999-1010

Powell DA, Skaggs H, Churchwell J, McLaughlin J. Posttraining lesions of the medial prefrontal cortex impair performance of Pavlovian eyeblink conditioning but have no effect on concomitant heart rate changes in rabbits (Oryctolagus cuniculus). *Behav. Neurosci*. 2001; 115: 1029–1038

Powell DA, Watson K, Maxwell B. Involvement of subdivisions of the medial prefrontal cortex in learned cardiac adjustments in rabbits. *Behav Neurosci.* 1994 Apr;108(2):294-307

Preskorn SH, Baker B, Kolluri S, Menniti FS, Krams M, Landen JW. An innovative design to establish proof of concept of the antidepressant effects of the NR2B subunit selective N-methyl-d-aspartate antagonist, CP-101,606, in patients with treatment-refractory major depressive disorder. J Clin Psychopharmacol. 2008; 28:631–637

Price JL, Drevets WC. Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology.* 2010; 35:192-216

Puig MV, Gulledge AT. Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. *Mol Neurobiol.* 2011 Dec; 44(3):449-64

Qin N, Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM. TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci.* 2008; 28, 6231–6238

Quan M, Zheng C, Zhang N, Han D, Tian Y, Zhang T, et al. Impairments of behavior, information flow between thalamus and cortex, and prefrontal cortical synaptic plasticity in an animal model of depression. *Brain Res Bull.* 2011; 85:109–116

Quirk GJ, Beer JS. Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies. *Curr Opin Neurobiol*. 2006 Dec;16(6):723-7.

Radley JJ, Arias CM, Sawchenko PE. Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci* 2006; 26:12967-76

Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL, Stockmeier CA. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry*. 1999 May 1;45(9):1085-98.

Resstel LB, Tavares RF, Lisboa SF, Joca SR, Correa FM, Guimaraes FS. 5-HT1A receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol.* 2009; 156:181-8

Ross HR, Napier I, Connor M. Inhibition of recombinant human T-type calcium channels by delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *J Biol Chem.* 2008; 283:16124–16134

Ross RA Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol.* 2003; 140:790–801

Ruhe HG, Mason NS, Schene AH. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol Psychiatry*. 2007;12:331–59

Russo E, Guy GW. A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses*. 2006; 66(2):234-46

Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochem Res.* 2005; 30:1037-43

Russo EB, McPartland JM. Cannabis is more than simply delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl)* 2003; 165:431-2

Salamone JD, Correa M. The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron*. 2012 Nov 8; 76(3):470-85

Sandi C. Glucocorticoids act on glutamatergic pathways to affect memory processes. *Trends Neurosci*. 2011; 34:165–76

Santini E, Ge H, Ren K, Pena DO, Quirk GJ. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 2004; 24: 5704–5710

Savitz J, Lucki I, Drevets WC. 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol*. 2009 May;88(1):17-31. Epub 2009 Feb 7.

Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*. 1965; 122:509-22

Schilström B, Konradsson-Geuken A, Ivanov V, Gertow J, Feltmann K, Marcus MM, Jardemark K, Svensson TH. Effects of S-citalopram, citalopram, and R-citalopram on the firing patterns of dopamine neurons in the ventral tegmental area, N-methyl-D-aspartate receptor-mediated transmission in the medial prefrontal cortex and cognitive function in the rat. *Synapse.* 2011 May;65(5):357-67.

Schwabe, L., et al., Stress effects on memory: An update and integration. Neurosci. Biobehav. Rev.(2011), doi:10.1016/j.neubiorev.2011.07.002

Scopinho AA, Scopinho M, Lisboa SF, Correa FM, Guimaraes FS, Joca SR. Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats. *Behav Brain Res.* 2010; 214:437-42

Seligman ME, Beagley G. Learned helplessness in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1975 Feb;88(2):534-41

Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol*. 1989 Dec 8;290(2):213-42

Sherman AD, Allers GL, Petty F, Henn FA. A neuropharmacologically-relevant animal model of depression. *Neuropharmacology.* 1979;18:891 – 3

Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry*. 2003; 54:70–5

Sierra-Mercado D, Corcoran KA, Lebron K, Quirk GJ. Inactivation of ventromedial prefrontal cortex reduces expression of conditioned fear and impairs subsequent recall of extinction. *Eur J Neurosci*. 2006; 24:1751-1758

Silva M, Aguiar DC, Diniz CR, Guimarães FS, Joca SR. Neuronal NOS inhibitor and conventional antidepressant drugs attenuate stress-induced fos expression in overlapping brain regions. *Cell Mol Neurobiol.* 2012 Apr; 32(3):443-53

Singh A, Lucki I. Antidepressant-like activity of compounds with varying efficacy at 5-HT1A receptors. *Neuropharmacology.* 1993 Apr;32(4):331-40.

Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc*. 2012 May 3;7(6):1009-14

Sotres-Bayon F, Bush DE, LeDoux JE. Emotional perseveration: an update on prefrontal-amygdala interactions in fear extinction. *Learn Mem*. 2004; 11:525-535

Sotres-Bayon, F., Diaz-Mataix, L., Bush, D.E., and LeDoux, J.E. Dissociable roles for the ventromedial prefrontal cortex and amygdale in fear extinction: NR2B contribution. *Cereb. Cortex*. 2008; 19: 474–482

Takagishi M, Chiba T. Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. *Brain Res*. 1991 Dec 6;566(1-2):26-39.

Tavares RF, Correa FM, Resstel LB. Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. *J Neurosci Res.* 2009; 87:2601-7

Thierry AM, Fekete M, Glowinski J. Effects of stress on the metabolism of noradrenaline, dopamine and serotonin (5HT) in the central nervous system of the rat. (II). Modifications of serotonin metabolism. *Eur J Pharmacol.* 1968 Nov;4(4):384-9.

Thomas BF, Gilliam AF, Burch DF, Roche MJ, Seltzman HH. Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 285:285-92

Torres-Escalante JL, Barral JA, Ibarra-Villa MD, Perez-Burgos A, Gongora-Alfaro JL, Pineda JC. 5-HT1A, 5-HT2, and GABAB receptors interact to modulate neurotransmitter release probability in layer 2/3 somatosensory rat cortex as evaluated by the paired pulse protocol. J. Neurosci. Res. 2004; 78: 268–278

Toth M. 5-HT1A receptor knockout mouse as a genetic model of anxiety. *Eur J Pharmacol*. 2003 Feb 28; 463(1-3):177-84

Urani A, Chourbaji S, Gass P. Mutant mouse models of depression: candidate genes and current mouse lines. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005; 29: 805-828

Van den Hove DL, Lauder JM, Scheepens A, Prickaerts J, Blanco CE, Steinbusch HW. Prenatal stress in the rat alters 5-HT1A receptor binding in the ventral hippocampus. *Brain Res.* 2006 May 23; 1090(1):29-34

Venator DK, Lewis DA, Finlay JM. Effects of partial dopamine loss in the medial prefrontal cortex on local baseline and stress-evoked extracellular dopamine concentrations. *Neuroscience*. 1999; 93(2):497-505

Vertes RP. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse.* 2004; 51:32-58

Vidal-Gonzalez I, Vidal-Gonzalez B, Rauch SL, Quirk GJ. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn Mem.* 2006; 13:728-33

Watanabe K, Ogi H, Nakamura S, Kayano Y, Matsunaga T, Yoshimura H et al. Distribution and characterization of anandamide amidohydrolase in mouse brain and liver. *Life Sci*. 1998; 62 (14): 1223–1229

Watanabe Y, Sakai RR, McEwen BS, Mendelson S. Stress and antidepressant effects on hippocampal and cortical 5-HT1A and 5-HT2 receptors and transport sites for serotonin. *Brain Res.* 1993; 615:87–94

Weinstock M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav.Immun*. 2005; 19:296–308

Willner P, Scheel-Krüger J, Belzung C. The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci Biobehav Rev.* 2012 Dec 19. doi:pii: S0149-7634(12)00216-3. 10.1016/j.neubiorev.2012.12.007.

Wurtman RJ. Genes, stress, and depression. *Metabolism.* 2005; 54:16-9

Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimaraes FS, Joca SR. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. *Br J Pharmacol.* 2010; 159:122-8

Zarate Jr CA, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. A randomized trial of an N-methyl-d-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2006; 63:856–864

Zuardi AW, Cosme RA, Graeff FG, Guimarães FS. Effect of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. *J Psychopharmacol* 2003; 7:82–88

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

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

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

Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr.* 2006; 28:153-7