UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Possível interação entre os sistemas endocanabinóide, glutamatérgico e
nitrérgico do CPFmv na modulação de respostas emocionais /
comportamentais ao estresse

ARIANDRA GUERINI SARTIM

Ribeirão Preto

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Possível interação entre os sistemas endocanabinóide, glutamatérgico e
nitrérgico do CPFmv na modulação de respostas
emocionais/comportamentais ao estresse

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientada: Ariandra Guerini Sartim

Orientador (a): Prof^a Dr^a Sâmia Regiane
Lourenço Joca

Ribeirão Preto

2017

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

Possível interação entre os sistemas endocanabinóide, glutamatérgico e nitrérgico do CPFmv na modulação de respostas emocionais/comportamentais ao estresse, 2017

122 p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Joca, Sâmia Regiane Lourenço

1. Sistema endocanabinóide.
2. Córtex pré-frontal.
3. Nado forçado.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ariandra Guerini Sartim

Possível interação entre os sistemas endocanabinóide, glutamatérgico e nitrérgico do CPFmv na modulação de respostas emocionais/comportamentais ao estresse

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Avaliado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

À Prof^a Dr^a Sâmia Joca, pela acolhida, confiança e incentivo. Toda a minha formação científica foi fruto de conhecimentos adquiridos neste laboratório sob sua orientação. Só tenho a agradecer!

Ao Prof^o Dr^o Fabrício Moreira, pela colaboração ao longo de todo o período de doutorado. Pela troca de idéias e experiência.

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

A todos os amigos que ainda estão ou que já passaram pelo laboratório de psicofarmacologia: Aline, Amanda, Bianca, Cassiano, Deidiane, Gabriela, Izaque, Kennia, Laura, Michele, Pedro, Rebeca, Vitor e Vinícius, pelo excelente convívio, pelos cafés, pelas conversas e pelas discussões.

À Flávia pelo suporte técnico ao longo de todos esses anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Ademir e Catarina, por serem meus maiores exemplos e incentivadores em tudo que faço. Gratidão eterna a estes dois exemplos de determinação, coragem e respeito.

A Deus por me dar suporte para seguir em frente, mesmo diante das dificuldades do caminho.

Ao Marco Aurélio, pelo incentivo e compreensão constantes. Sua dedicação à ciência foi que me despertou para seguir na academia.

Ao meu filho, Lucca, por me mostrar que nossos limites são mais altos do que imaginamos e, juntamente com o Marco, mostrar que a felicidade pessoal nos faz sermos melhores também no profissional.

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

Obrigada!

RESUMO

SARTIM, A. G. **Possível interação entre os sistemas endocanabinóide, glutamatérgico e nitrgérgico do CPFmv na modulação de respostas emocionais / comportamentais ao estresse**. 2017. 122. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Receptores CB1 e TRPV1 desempenham papéis opostos na modulação da atividade neuronal e, possivelmente, na regulação da resposta ao estresse. A exposição ao estresse reduz a neurotransmissão mediada por receptores CB1, enquanto que a facilitação do sistema endocanabinóide produz efeito tipo-antidepressivo. Por outro lado, estudos farmacológicos e de manipulação genética apontam que a diminuição da sinalização mediada por receptores TRPV1 produz efeito tipo-antidepressivo em modelos animais. Evidências científicas apontam que a modulação da neurotransmissão glutamatérgica, dependente de receptores NMDA, esteja envolvida em respostas mediadas por CB1 e TRPV1. Ambos os receptores são amplamente expressos em estruturas cerebrais envolvidas na resposta emocional, incluindo o córtex pré-frontal medial ventral (CPFmv), o que aponta para essa estrutura como importante alvo para os efeitos mediados por receptores CB1, TRPV1 e NMDA. Entretanto, pouco se sabe sobre a interação entre CB1 e TRPV1 corticais na resposta ao estresse. Dessa forma, avaliamos se receptores CB1 e TRPV1 localizados no CPFmv-pré-límbico (PL) podem contribuir, de maneiras opostas, para as mudanças comportamentais induzidas pelo estresse do teste do nado forçado (TNF), um teste preditivo de efeito tipo-antidepressivo. Em um primeiro grupo experimental observou-se que a AEA induz efeito tipo-antidepressivo com uma curva dose-resposta em U, quando administrada no CPFmv-PL. Além disso, o efeito tipo-antidepressivo da AEA foi prevenido pela pré-administração de AM251, um antagonista para receptores CB1. Por outro lado, a maior dose de AEA, que não induz efeito *per se*, produziu efeito tipo-antidepressivo quando combinada ao bloqueio de receptores TRPV1 por meio do pré-tratamento com SB366791. Corroborando estes dados, observou-se que a administração intra-CPFmv-PL de um bloqueador dual da enzima FAAH e de receptores TRPV1 (AA-5HT), induziu efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado. Além disso, a administração do inibidor da FAAH (URB597) e do antagonista de receptores TRPV1 (SB366791), em grupos independentes de animais, reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Ademais, a coadministração de doses subefetivas de URB597 e SB366791 reduziu o tempo de imobilidade no mesmo teste comportamental, evidenciando somação de efeito do bloqueio combinado da FAAH com receptores TRPV1. Em conjunto, esses

resultados indicam que tanto a facilitação da neurotransmissão mediada por CB1R quanto o bloqueio de TRPV1R no CPFmv-PL promove efeito tipo-antidepressivo, sugerindo que ambos os receptores corticais são importantes na modulação de respostas comportamentais ao estresse e, possivelmente, na neurobiologia da depressão, porém de maneiras opostas. Buscando elucidar os mecanismos pelos quais a AEA, através da ativação de CB1R e TRPV1R, promove seus efeitos comportamentais, o envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica nos efeitos induzidos pela AEA foi investigado. Nossos resultados demonstraram que a administração de antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (LY235959) e de inibidor da nNOS (NPA) induziram efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado quando administrados intra-CPFmv-PL. Além disso, a coadministração de doses subefetivas do antagonista NMDA (LY366791) e da AEA intra-CPFmv-PL, induziu efeito tipo-antidepressivo no TNF, mostrando um efeito aditivo da administração conjunta das drogas. Esse resultado sugere que o efeito tipo-antidepressivo da AEA seja facilitado pela inibição da neurotransmissão glutamatérgica mediada por NMDA. Em conjunto, os resultados do presente trabalho indicam um envolvimento de CB1 e TRPV1 do CPFmv-PL na modulação da resposta comportamental ao estresse do nado forçado, porém de maneira contrária. Além disso, o efeito tipo-antidepressivo da AEA parece envolver a diminuição da neurotransmissão glutamatérgica mediada por NMDAR.

Palavras-chave: depressão, teste do nado forçado, sistema endocanabinóide

ABSTRACT

SARTIM, A. G. **Possible interaction between endocannabinoid, glutamatergic and nitrenergic systems into the mvPFC in the modulation of emotional / behavioral response to stress.** 2017. 122p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

CB1 and TRPV1 receptors play opposite roles in the modulation of neuronal activity and, possibly, in the regulation of the stress response. Exposure to stress attenuates CB1 receptor-mediated neurotransmission, while facilitation of the endocannabinoid system produces antidepressant-like effects. On the other hand, genetic and pharmacological blockade of TRPV1 receptor signalling produces antidepressant-like effect in animal models. Scientific evidence suggests NMDA receptor-mediated glutamatergic neurotransmission might be involved in responses mediated by CB1 and TRPV1. Both receptors are widely expressed in brain structures involved in the emotional response, including the ventral medial prefrontal cortex (vmPFC), which points to this structure as an important target to the effects triggered by CB1 and TRPV1. However, little is known about the interaction between cortical CB1 and TRPV1 in response to stress. Therefore, we evaluated whether CB1 and TRPV1 receptors of the vmPFC-PL may contribute, in opposite ways, to stress-induced behavioral changes in the forced swimming test (FST), a predictive test of antidepressant-like effect. In a first experimental group it was observed that AEA induces antidepressant-like effect with a U shape dose-response curve, when administered in the vmPFC-PL. In addition, the antidepressant-like effect of AEA was prevented by pre-administration with AM251, a CB1 receptor antagonist. On the other hand, the higher dose of AEA, which does not induce effect *per se*, produced an antidepressant-like effect when combined with TRPV1 receptor blockade with SB366791. Corroborating these data, intra-vmPFC-PL administration of a dual blocker of the FAAH enzyme and TRPV1 receptors (AA-5HT), induced antidepressant-like effect in the forced swimming test. In addition, administration of FAAH inhibitor (URB597) and TRPV1 receptor antagonist (SB366791) in independent groups of animals reduced the immobility time in the forced swimming test. Furthermore, co-administration of URB597 and SB366791, in sub-effective doses, reduced the immobility time in the same behavioral test, evidencing synergism of the combined blockade of FAAH with TRPV1 receptors. Taken together, these results indicate that both facilitation of CB1R-mediated neurotransmission and blockade of TRPV1R in vmPFC-PL promotes antidepressant-like effect, suggesting that both cortical receptors are important in modulating

behavioral responses to stress and possibly in the neurobiology of depression, but in opposite ways. Aiming to elucidate the mechanisms by which AEA, through the activation of CB1R and TRPV1R, promotes its behavioral effects, the involvement of the possible modulation of glutamatergic and nitrergic neurotransmissions by AEA was investigated. Our results demonstrated that administration of NMDA receptor antagonist (LY235959) and nNOS inhibitor (NPA) induced antidepressant-like effect in the forced swimming test when administered intra-CPFMV-PL. In addition, coadministration of NMDA antagonist (LY366791) and AEA intra-CPFMVPL, in sub-effective doses, induced antidepressant-like effect in the FST, showing a synergistic effect of these drugs. This result suggests that the antidepressant-like effect of AEA might involve attenuation of cortical NMDA-mediated glutamatergic neurotransmission. Taken together, results of the present study indicate an opposite involvement for CB1 and TRPV1 receptors in the behavioral responses elicited by forced swimming stress. Furthermore, the antidepressant-like effect of AEA probably involves the attenuation of NMDAR-mediated glutamatergic neurotransmission.

Keywords: depression, forced swimming test, endocannabinoid system.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação hipotética da modulação bidirecional de receptores CB1 e TRPV1 localizados em uma sinapse glutamatérgica. 15
- Figura 2.** Imagem representativa da localização dos sítios histológicos (0,2 µl) no córtex pré-frontal medial ventral – pré-límbico (CPFmv-PL) em diagramas baseados no Atlas de Paxinos e Watson (1998). 52
- Figura. 3.** Efeito da administração de AEA intra-CPFmv-PL, nas doses de 0,25, 0,5, 5, 50, 250 pmol/0,2 µl/lado (8-12 animais por grupo) sobre o tempo (em segundos) de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado. 53
- Figura 4.** Efeito da administração de AEA intra-CPFmv-PL, nas doses de 0,25, 0,5, 5, 50, 250 pmol/0,2 µl/lado (5 animais por grupo) sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto. 55
- Figura 5.** Efeito da administração de AM251 intra-CPFmv-PL, nas doses de 1 e 10 pmol (11-12 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado. 55
- Figura 6.** Efeito da coadministração de AM251, na dose de 10 nmol/0,2µl, e AEA, nas doses de 0,5 e 250 pmol/0,2µl, intra-CPFmv, no tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado. 56
- Figura 7.** Efeito da administração de SB366791, nas doses de 0,5, 1 e 10 nmol/0,2 µl/lado, intra-CPFmv (9-10 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado. 57
- Figura 8.** Efeito da coadministração de SB366791, na dose de 1 nmol/0,2 µl, e AEA, nas doses de 0,5 e 250 pmol/0,2 µl, intra-CPFmv-PL, sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado. 58
- Figura 9.** Efeito da administração de AM251 (10pmol) e SB366791 (0,5 e 10 nmol), intra-CPFmv-PL, sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto. 59
- Figura 10.** Efeito da administração de AA-5HT, nas doses de 0,125, 0,25 e 0,5 nmol/0,2 µl/lado, intra-CPFmv (7-12 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado. 60
- Figura 11.** Efeito da administração de AA-5HT (0,25 e 0,5 nmol) intra-CPFmv-PL, sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto. 61
- Figura 12.** Efeito da administração de URB597, nas doses de 0,001, 0,01, 0,1 e 1nmol/0,2µl/lado, intra-CPFmv (5-7 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado. 62

- Figura 13.** Efeito da coadministração de SB366791, na dose de 1 nmol/0,2 µl, e URB597, na dose de 0,001 nmol/0,2 µl, intra-CPFmv-PL, no tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado.63
- Figura 14.** Efeito da administração de URB597 (0,001, 0,01, 0,1 e 1 nmol) intra-CPFmv-PL, sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto.64
- Figura 15.** Efeito da pré-administração de AM251, na dose de 10 nmol/0,2 µl, seguida por AA-5HT, na dose de 0,25 nmol/0,2 µl, intra-CPFmv, sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado.65
- Figura 16.** Efeito da pré-administração de AM251, na dose de 10 nmol/0,2 µl, seguida por SB366791, na dose de 10 nmol/0,2µl, intra-CPFmv-PL, sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado66
- Figura 17.** Efeito da administração de LY235959, nas doses de 1, 3 e 10 nmol/0,2 µl/lado, intra-CPFmv (7-8 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado. Os dados são representados pela média +/- EPM. *Indica $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett).67
- Figura 18.** Efeito da administração de NPA, nas doses de 0,001 e 0,01 nmol/0,2 µl/lado, intra-CPFmv (10-11 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado.68
- Figura 19.** Efeito da coadministração de LY235959, na dose de 1 nmol/0,2 µl, e AEA, na dose de 0,25 pmol/0,2 µl, intra-CPFmv-PL, no tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado.69
- Figura 20.** Representação hipotética para a contribuição oposta dos receptores CB1 e TRPV1 do CPFmv-PL na modulação do comportamento tipo-depressivo no teste do nado forçado.....91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modelos animais de depressão baseados na exposição ao estresse e seus critérios de validação.	9
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA-5HT –	bloqueador dual da enzima FAAH e de receptores TRPV1
ACTH –	hormônio adrenocorticotropina
AEA –	N-araquidonoil-etanolamida (anandamida)
AMPA –	α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico
AM251 –	antagonista de receptores CB1
AP –	Antero-posterior
2-AG –	2-araquidonoil-glicerol
CB1R –	receptores canabinóides do tipo 1
CB2R –	receptores canabinóides do tipo 2
CEUA –	Comitê de Ética no Uso de Animais
CPF –	córtex pré-frontal
CPFm –	córtex pré-frontal medial
CPFmv –	córtex pré-frontal medial ventral
CRF –	fator liberador de corticotrofina
DA –	desamparo aprendido
DBS –	estimulação encefálica profunda (deep brain stimulation)
DSM-V –	Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais – 5ª edição
ECV –	estresse crônico variado
Eixo HPA –	eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
FAAH –	amida hidrolase de ácido graxo
FCFRP-USP –	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
GABA –	ácido gama-amino-butírico
GR -	glicocorticóide
5-HT –	serotonina

HPETE -	ácido hidroperoxieicosatetraenoico
IL –	infra-límbico
IM –	intramuscular
IP -	intraperitoneal
ISRS –	inibidores seletivos da recatção de serotonina
KO –	Knock-out
L –	lateral
LCR –	líquido cefalorraquidiano
LY366791 –	antagonista de receptores NMDA
NADA –	N-araquidonoildopamina
NDR –	núcleo dorsal da rafe
NMDAR –	receptores do tipo n-metil-d-aspartato
NO –	óxido nítrico
NOS –	óxido nítrico sintase
NPA –	inibidor da óxido nítrico sintase
OLEA –	N-oleilalamina
PL –	pré-límbico
TNF –	teste do nado forçado
TRPV1R –	receptor de potencial transitório V1
TSC –	teste de suspensão pela cauda
SB366791 –	antagonista de receptores TRPV1
SNC –	sistema nervoso central
Δ 9-THC –	Δ 9-tetrahidrocanabinol
URB597 –	inibidor da enzima FAAH
USP –	Universidade de São Paulo
V –	vertical

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Estresse e depressão.....	2
1.1.1 Modelos animais de depressão.....	7
1.2 Sistemas endocanabinóide e vanilóide no SNC.....	11
1.2.1 Sistemas endocanabinóide e vanilóide na modulação da resposta ao estresse.....	15
1.3 Sistemas glutamatérgico e nitrérgico na modulação da resposta ao estresse	22
1.4 Modulação dos sistemas glutamatérgico e nitrérgico pelo sistema endocanabinóide	25
1.5 Córtex pré-frontal medial ventral na modulação da resposta ao estresse.....	27
1.5.1 Sistemas endocanabinóide e vanilóide no córtex pré-frontal medial ventral	30
1.6 Hipótese	33
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Animais.....	37
3.2 Drogas.....	37
3.3 Procedimentos experimentais	38
3.3.1 Cirurgia estereotáxica e administração intracerebral de drogas.....	38
3.3.2 Análise histológica do sítio de injeção.....	39
3.3.3 Teste do nado forçado.....	39
3.3.4 Teste do campo aberto.....	40
3.4 Desenho experimental.....	41
3.5 Análise estatística	49

4 RESULTADOS.....	51
4.1 Localização dos sítios de injeção	52
4.2 Experimento 1: efeito da administração de AEA (0,25 - 0,5 – 5 - 50 e 250 pmol/lado) no CPFmv-PL de animais submetidos ao teste do nado forçado	53
4.3 Experimento 2: efeito da administração de AEA (0,25 - 0,5 – 5 - 50 e 250 pmol/lado) no CPFmv-PL de animais submetidos ao teste do campo aberto	54
4.4 Experimento 3: participação de receptores CB1 no efeito induzido pela administração de AEA (0,5 e 250pmol/lado) no CPFmv-PL.....	55
4.5 Experimento 4: participação de receptores TRPV1 no efeito induzido pela administração de AEA (0,5 e 250 pmol/lado) no CPFmv-PL.....	57
4.6 Experimento 5: efeito da administração de AM251 (10 nmol/lado) e SB366791 (0,5 e 10 pmol/lado) no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do campo aberto	59
4.7 Experimento 6: efeito da administração de AA-5HT no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado	60
4.8 Experimento 7: efeito da administração de AA-5HT (0,25 e 0,5 nmol/lado) no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do campo aberto.....	61
4.9 Experimento 8: efeito da administração de URB597 no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado	62
4.10 Experimento 9: efeito da coadministração de SB366791 e URB597 no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado.....	63
4.11 Experimento 10: efeito da administração de URB597 (0,25 e 0,5 nmol/lado) no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do campo aberto.....	64
4.12 Experimento 11: participação de receptores CB1 nos efeitos induzidos pela administração de AA-5HT no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado	65
4.13 Experimento 12: participação de receptores CB1 nos efeitos induzidos pela administração de SB366791 no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado	66
4.14 Experimento 13: efeito da administração de LY235959 (1, 3 e 10 nmol/lado) no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado.....	67
4.15 Experimento 14: efeito da administração de NPA (0,001 e 0,01 nmol/lado) no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado.....	68
4.16 Experimento 15: efeito da coadministração de LY235959 e AEA 0,25 pmol/lado no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado	69
 5 DISCUSSÃO	 70
5.1 Participação de receptores CB1 e TRPV1 do CPFmv-PL na modulação da resposta comportamental ao estresse	71
5.2 Interação entre os sistemas endocanabinóide e glutamatérgico do CPFmv-PL na modulação da resposta comportamental ao estresse	81

5.3 Discussão geral.....	89
6 CONCLUSÃO	92
7 LIMITAÇÕES	94
REFERÊNCIAS.....	97
ANEXO	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estresse e depressão

A depressão maior é um transtorno de humor com elevada prevalência (de 2 a 6% da população entre os diferentes países), afetando mais de 320 milhões de indivíduos em todo o mundo (Organização Mundial da Saúde, 2017). Este número cresceu mais de 18% entre os anos de 2005 e 2015, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). Na população brasileira, mais de 11 milhões de casos são relatados, uma prevalência de cerca de 6% (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). A depressão é reconhecida como um transtorno mental crônico, recorrente e altamente incapacitante que gera significantes prejuízos pessoais, ocupacionais e sociais, sendo atualmente reconhecida como a terceira maior causa de incapacitação do mundo, com estimativa de liderar o ranking em 2030 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2008; KESSLER; BROMET, 2013). Desse modo, a depressão representa um grave problema de saúde pública.

Devido à subjetividade de alguns sintomas e também pela sua variabilidade de manifestação individual, a depressão representa uma desordem de difícil diagnóstico. Devido a isso, faz-se necessária a adoção de critérios bem definidos para a caracterização da doença. A Associação Americana de Psiquiatria estabelece tais critérios no DSM - Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais. Na quinta versão do DSM (DSM-V), estabelece-se que, para o diagnóstico de depressão maior, o indivíduo deve manifestar humor deprimido ou perda de interesse pela maioria das atividades, diariamente por pelo menos duas semanas (episódio de depressão maior), acompanhado por quatro ou mais sintomas adicionais de depressão, que incluem: mudanças (para mais ou para menos) de apetite ou peso, sono e atividade psicomotora, sentimentos de culpa, pensamento

suicida e diminuição da habilidade de pensamento, concentração ou tomada de decisão (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

A depressão é considerada uma desordem com características hereditárias, uma vez que cerca de 50% do risco para depressão é genético (FAVA; KENDLER, 2000), porém, a vulnerabilidade à doença também é fortemente influenciada por fatores como estresse e trauma emocional (NESTLER et al., 2002). Deste modo, a depressão maior representa uma desordem etiologicamente complexa e multifatorial, considerada resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais (FAVA; KENDLER, 2000). Indivíduos com risco genético elevado para depressão maior possuem maiores taxas de transtornos de ansiedade e uso indevido de substâncias e estão expostos frequentemente a estados emocionais negativos, fatores estes que aumentam o risco de um episódio depressivo (KENDLER; GARDNER; PRESCOTT, 2006). Neste contexto, fatores genéticos podem comprometer mecanismos de neuroplasticidade e o funcionamento de estruturas que são cruciais para a elaboração de respostas adaptativas ao estresse, conferindo maior vulnerabilidade ao desenvolvimento da doença em indivíduos expostos a fatores estressantes (KENDLER; GARDNER; PRESCOTT, 2006).

De fato, vários estudos têm demonstrado que a exposição a evento estressante parece ser um dos principais fatores ambientais predisponentes à depressão. Cerca de 60% dos episódios depressivos são precedidos por evento estressante, especialmente de origem psicológica, incluindo problemas conjugais, luto, doenças pessoais, problemas no trabalho ou interpessoais e baixa autoestima (POST, 1992; KENDLER; KARKOWSKI; PRESCOTT, 1998; TENNANT, 2001; HONKALAMPI et al., 2005; KENDLER; GARDNER; PRESCOTT, 2006). Kendler e colaboradores (2004) demonstraram que, quanto maior o nível de estresse

vivenciado pelo indivíduo ao longo da vida, maior a probabilidade de ocorrência de episódios depressivos. Além disso, entre os indivíduos com o traço de personalidade determinado geneticamente que se relaciona a elevados níveis de pensamentos negativos (neuroticismo), a ocorrência de episódios depressivos aumenta consideravelmente, especialmente no grupo severamente estressado (KENDLER; KUHN; PRESCOTT, 2004). Estes dados mostram uma forte correlação entre a exposição a eventos estressantes, fatores genéticos e ocorrência de episódios depressivos. Nesse sentido, a sensibilidade ao estresse parece estar aumentada em indivíduos com alteração genética predisponente à depressão (KENDLER; KARKOWSKI-SHUMAN, 1997). Deste modo, é clara a existência de uma individualização de resposta a eventos estressantes, sendo que alguns indivíduos são mais resistentes, enquanto que outros são mais susceptíveis ao desenvolvimento de episódios depressivos (WORLEY; HILL; CHRISTIANSON, 2016). Trabalhos mostram que a intensidade e a controlabilidade do evento estressante, assim como a forma pessoal que o indivíduo reage àquele estresse, interferem diretamente na precipitação de episódios depressivos (CALABRESE et al., 2009; WORLEY; HILL; CHRISTIANSON, 2016).

O estresse é reconhecido como qualquer fator, de origem física ou psicológica, capaz de colocar em risco a homeostasia e promover alterações comportamentais e fisiológicas significativas com a finalidade de promover adaptação do organismo frente às novas demandas ambientais (MCEWEN, 2000). A exposição prolongada ou muito intensa a evento estressante pode levar o organismo a prejuízos de adaptação, levando ao desenvolvimento de doenças, dentre elas a depressão (MCEWEN, 2000).

O principal componente fisiológico de resposta adaptativa frente ao estresse é a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (CALABRESE et al., 2009). O primeiro estágio de ativação do eixo HPA é a ativação de neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo e a liberação do fator de liberação de corticotrofina (CRF). Esse hormônio age na glândula pituitária anterior estimulando a síntese e secreção do hormônio adrenocorticotropina (ACTH), que por sua vez age na adrenal promovendo a síntese e liberação de glicocorticoides (GR) (BELDA et al., 2015). A liberação de glicocorticoides induzida pelo estresse promove ampla gama de efeitos fisiológicos com o objetivo de controlar a intensidade da resposta e preparar o organismo para outros estressores (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000; FRANK; WATKINS, 2013). Além disso, os glicocorticoides ainda têm o papel de modular respostas comportamentais de adaptação ao estresse (DE KLOET; OITZL; JOËLS, 1999). Um dos principais mecanismos de inibição da ativação do eixo HPA se dá por feedback negativo, que ocorre especialmente em regiões encefálicas como hipotálamo, córtex pré-frontal e hipocampo (MYERS-SCHULZ; KOENIGS, 2012). Em casos de exposição prolongada ou muito severa ao estresse, o organismo pode perder o fino controle dos níveis de glicocorticoides exercido pelo mecanismo de feedback negativo, resultando em hipercortisolemia (JURUENA, 2014). A hipercortisolemia e a hiperestimulação do eixo HPA são um dos mais consistentes achados na depressão maior, podendo ser associado a diversos mecanismos de resposta ao estresse (SCHMIDER et al., 1995; PLOTSKY; OWENS; NEMEROFF, 1998).

O estudo dos mecanismos envolvidos na resposta ao estresse, bem como no efeito de drogas antidepressivas tem contribuído para o avanço acerca do conhecimento sobre a neurobiologia da depressão. A primeira teoria articulada para

explicar as bases neuroquímicas da depressão foi estabelecida há mais de 50 anos e ficou conhecida como a “Teoria monoaminérgica clássica da depressão”. Essa hipótese foi fundamentada no conhecimento de que os fármacos disponíveis para o tratamento da depressão agem por inibir o metabolismo ou a recaptação de monoaminas, além de achados de que pacientes deprimidos possuíam níveis alterados desses neurotransmissores no líquido cefalorraquidiano (LCR) (SCHILDKRAUT, 1965). Assim, foi proposto que a depressão resultaria de níveis reduzidos de serotonina, noradrenalina e/ou dopamina em estruturas límbicas (PALAZIDOU, 2012). Nesse contexto, antidepressivos seriam eficazes por restaurarem os níveis de monoaminas nessas estruturas (BLIER; ABBOTT, 2001).

Estudos recentes evidenciaram que a hipótese monoaminérgica precisa ser revisada e que mecanismos mais complexos devem estar envolvidos no desenvolvimento da depressão, bem como na resposta ao tratamento (HILLHOUSE; PORTER, 2015). Isso se deve ao fato de que muitos pacientes (cerca de 40%) não respondem adequadamente aos fármacos antidepressivos monoaminérgicos, sendo identificados como indivíduos com “depressão resistente ao tratamento” (FAVA; DAVIDSON, 1996). Uma limitação adicional ao tratamento da depressão disponível na clínica atualmente é que, mesmo em pacientes responsivos, a melhora de humor só é observada após prolongada administração da droga, demorando cerca de 4-12 semanas para ser estabelecida (UHER, 2011). Tais fatores são responsáveis pela baixa parcela de pacientes com remissão total dos sintomas e indicam que o favorecimento das neurotransmissões serotoninérgica e noradrenérgica não é o único mecanismo responsável pela ação clínica da droga (NESTLER et al., 2002). Em conjunto, estes fatos apontam uma complexidade maior da neurobiologia da

depressão e impulsionam novas pesquisas científicas na área (HILLHOUSE; PORTER, 2015).

Dentro desse contexto, outras teorias têm sido estabelecidas para melhor compreender a patologia, incluindo a participação de outros neurotransmissores e vias de sinalização. De particular interesse para o presente trabalho, a participação dos sistemas glutamatérgico e endocanabinóide na neurobiologia da depressão tem ganhado destaque nos últimos 10 anos e será descrita em maior detalhe nas sessões seguintes.

1.1.1 Modelos animais de depressão

Os estudos utilizando seres humanos, particularmente em neurociências, apresentam frequentemente sérias limitações éticas e de viabilidade experimental, o que favorece a realização de testes em modelos animais. Tais modelos permitem investigar os mecanismos envolvidos nas respostas fisiológicas e comportamentais/emocionais frente a diferentes desafios, sejam eles ambientais e/ou farmacológicos (VAN DER STAAY, 2006). Sabendo-se que a transposição de comportamentos observados em roedores para humanos é limitada, faz-se necessária a padronização de critérios para validação dos modelos animais. Tais critérios, em particular para validação de modelos animais de depressão, incluem: 1) validade preditiva, que se refere à capacidade de fármacos antidepressivos usados na clínica alterarem um parâmetro avaliado, diferenciando falsos positivos e falsos negativos; 2) validade de face, que avalia a capacidade do modelo em reproduzir nos animais sinais e sintomas observados em pacientes deprimidos; 3) validade de constructo, referente à similaridade de mecanismos neurobiológicos envolvidos nos parâmetros avaliados no modelo e na doença (WILLNER, 1984).

A obtenção de modelos animais que apresentem boa validade representa um desafio constante, especialmente devido ao caráter subjetivo do comportamento e à dificuldade de avaliar se o comportamento avaliado reflete algum aspecto da depressão observada em humanos. Nesse sentido, os modelos animais de depressão se utilizam de diferentes ferramentas na tentativa de reproduzir comportamentos que se assemelhem melhor aos observados em humanos, que incluem: utilização de agentes farmacológicos, exposição a eventos estressantes e alteração genética (MCARTHUR; BORSINI, 2006). Na realidade, de maneira geral, os modelos de depressão não se encaixam plenamente nesses critérios de validação e se baseiam principalmente na ação de antidepressivos conhecidos ou na resposta ao estresse (KRISHNAN; NESTLER, 2011). Além disso, considera-se desejável, mas não necessário que um modelo reproduza todos os sinais e sintomas característicos da desordem para que os dados obtidos através de sua aplicação sejam relevantes. Nesse sentido, alguns modelos reproduzem principalmente o sintoma de anedonia, que é um dos sintomas centrais da depressão (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013), enquanto outros refletem aspectos relacionados a sentimentos de desamparo (MILLER; SELIGMAN; KURLANDER, 1975; PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977).

Sabendo que a exposição ao estresse representa um dos principais fatores desencadeantes de depressão em humanos, os modelos que utilizam esse mecanismo para indução de alteração comportamental em roedores são os mais utilizados (MCARTHUR; BORSINI, 2006). Não é recente o conhecimento de que a exposição de roedores a estresse inescapável promove uma série de alterações comportamentais que podem ser relacionadas à depressão, dentre elas pode-se destacar: redução na interação social (SHORT; MAIER, 1993); diminuição da

agressividade (WOOD et al., 2003); aumento da ansiedade (CHIBA et al., 2012); anedonia (KATZ; HERSH, 1981) e desamparo (MILLER; SELIGMAN; KURLANDER, 1975). Dentre os modelos de exposição ao estresse mais empregados na atualidade, destacam-se o estresse crônico variado, o desamparo aprendido e o teste do nado forçado (TNF).

Tabela 1. Modelos animais de depressão baseados na exposição ao estresse mais empregados na pesquisa básica e seus critérios de validação (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013).

Modelo	Validade preditiva	Validade de face	Validade de constructo
Teste do Nado Forçado (TNF)	+	-	-
Teste de Suspensão pela Cauda (TSC)	+	-	-
Desamparo Aprendido (DA)	+	+	+
Estresse Crônico Variado (ECV)	+	+	+

O desamparo aprendido (DA) expõe os animais ao estresse ambiental do choque nas patas de maneira inescapável. Este procedimento resulta em déficit motivacional e falha na habilidade de escapar do choque em sessões posteriores, onde o escape seria possível (MILLER; SELIGMAN; KURLANDER, 1975). O TNF foi inicialmente proposto por Porsolt como uma variação do teste do DA com o objetivo de desenvolver um teste onde os animais seriam submetidos a um estresse mais brando – no caso, a natação forçada (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977). Neste teste os ratos são expostos ao evento estressante inescapável - natação forçada - quando são colocados individualmente em um cilindro contendo água

(PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977). Inicialmente, os animais nadam vigorosamente, enquanto que, em uma segunda exposição ao mesmo evento estressante (que representa a sessão de teste), eles tendem a permanecer mais tempo imóveis (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977). O termo imobilidade é usado para definir a flutuação do animal na água, sem se esforçar para nadar além do necessário para manter a cabeça fora da água.

O TNF foi desenvolvido como uma ferramenta para o rápido *screening* de substâncias com potencial efeito antidepressivo após administração aguda da droga (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977). Atualmente, o TNF tem se tornado a ferramenta pré-clínica mais amplamente empregada para o estudo da depressão devido à sua facilidade de execução, baixo custo e elevada validade preditiva (MCARTHUR; BORSINI, 2006).

Detke e colaboradores (1995) propuseram algumas modificações ao protocolo do nado forçado inicialmente desenvolvido por Porsolt, devido à observação de diferenças comportamentais entre os animais (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995). Nesse sentido, passou-se a diferenciar os comportamentos de imobilidade, escalada e natação, sendo que drogas com ação serotoninérgica aumentam o tempo de natação, enquanto que drogas noradrenérgicas favorecem o comportamento de escalada (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995). Outra modificação importante proposta para o TNF foi o aumento da profundidade de água, que passou a ser de 30cm, impossibilitando que o animal apoie as patas no fundo do cilindro (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995).

Devido às limitações do modelo, especialmente relacionadas a não reprodutibilidade de sintomas observados em humanos, o TNF recebe críticas quanto a sua utilização para o estudo da neurobiologia da depressão. Por outro lado,

recentemente observou-se que o comportamento passivo (imobilidade) no TNF é aumentado pela exposição do animal a diferentes tipos de estressores (SLATTERY; CRYAN, 2012). Além disso, a manipulação farmacológica de uma mesma região cerebral (inativação do córtex infralímbico) de ratos submetidos ao TNF reproduziu os resultados obtidos pela manipulação em humanos (SLATTERY DA, NEUMANN ID, 2011). Dessa forma, apesar de apresentar importantes limitações, o TNF também é considerado uma ferramenta experimental importante para o estudo de neurocircuitos envolvidos no desenvolvimento de alterações comportamentais induzidas pelo estresse, as quais podem estar também relacionadas à depressão, uma vez que são sensíveis ao tratamento com antidepressivos (SLATTERY; CRYAN, 2012).

1.2 Sistemas endocanabinóide e vanilóide no SNC

Desde meados do século XX, com a descoberta do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) como o principal constituinte psicoativo da *Cannabis sativa*, a clonagem de receptores canabinóides, e a identificação de seus ligantes endógenos (endocanabinóides), aumentou o interesse científico pelo entendimento das bases moleculares e funções da sinalização endocanabinóide, especialmente no sistema nervoso central (SNC) (MATSUDA et al., 1990; CASTILLO et al., 2012). Atualmente, sabe-se que o sistema endocanabinóide é um sistema lipídico neuromodulatório, presente em diferentes regiões do SNC, com importante participação na regulação de processos neurais envolvidos na cognição, movimento, comportamento alimentar, dor e resposta fisiológica e emocional ao estresse (CASTILLO et al., 2012).

Alterações do sistema endocanabinóide têm sido descritas na fisiopatologia de diversas desordens neuropsiquiátricas, especialmente em transtornos de humor, ansiedade e depressão, além de condições relacionadas à memória e aprendizagem (MICALE et al., 2013; MORENA; CAMPOLONGO, 2014). Isso se relaciona, possivelmente, aos altos níveis de receptores CB1 em diferentes estruturas do sistema límbico (PACHER, 2006).

O sistema endocanabinóide é constituído pelos receptores canabinóides do tipo 1 (CB1) e tipo 2 (CB2), cujos agonistas endógenos são anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Fazem parte desse sistema, ainda, enzimas de síntese e degradação, que controlam os níveis sinápticos dos endocanabinóides (DI MARZO, 2008a).

Ambos os receptores, CB1 e CB2, pertencem à família dos receptores com sete domínios transmembrana associados à proteína Gi, mas possuem uma distribuição tecidual bem particular (DÍAZ-LAVIADA; RUIZ-LLORENTE, 2005). Os receptores CB1 (CB1R) representam os principais receptores canabinóides no encéfalo, sendo os mais abundantes receptores acoplados à proteína G no sistema nervoso central (DI MARZO, 2009). Estudos neuroanatômicos confirmam difusa expressão de CB1R por todo o SNC, com maiores níveis no córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e cerebelo (HERKENHAM, 1990). Além disso, estão presentes também, embora em menores concentrações, em diversos tecidos periféricos (DI MARZO, 2009). Os receptores CB2, por sua vez, são expressos em níveis mais elevados em células do sistema imune, como macrófagos (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993; PAROLARO, 1999), assim como em microglias (CARRIER, 2004; CABRAL, 2005). Recentemente, trabalhos mostraram que receptores CB2

podem ainda ser expressos em neurônios, apesar de em menores quantidades quando comparados a CB1R (DI MARZO, 2009).

A expressão de CB1R é observada em diversos terminais sinápticos, incluindo GABAérgicos, glutamatérgicos, serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos (HERMANN; LUTZ, 2005; HÄRING et al., 2007; OROPEZA; MACKIE; VAN BOCKSTAELE, 2007; AZAD et al., 2008; KANO et al., 2009; MOROZOV; TORII; RAKIC, 2009), indicando que o sistema endocanabinóide pode suprimir a liberação de muitos neurotransmissores. Todavia, o efeito predominante dessa sinalização ocorre em sinapses GABAérgicas e glutamatérgicas, devido aos maiores níveis de expressão destes receptores (KATONA; FREUND, 2012).

CB1R são receptores pertencentes à família de proteína G do tipo inibitória, portanto, a sua ativação inibe a atividade da adenilato ciclase, levando a uma consequente redução da cascata do AMPc, ativação dos canais de potássio e inibição do fluxo de cálcio subsequente através de canais de cálcio voltagem dependente (DÍAZ-LAVIADA; RUIZ-LLORENTE, 2005). Tais receptores se localizam no terminal pré-sináptico, enquanto que os seus agonistas endógenos são sintetizados no terminal pós-sináptico, após a despolarização da membrana pós-sináptica. Devido a isso, pode-se assumir que os endocanabinóides atuam como mensageiros retrógrados do terminal pós-sináptico para o pré-sináptico (MOREIRA et al., 2012). Com isso, a despolarização do terminal pós-sináptico leva à síntese e mobilização endocanabinóide, que, por sua vez, ao ativar receptores CB1 pré-sinápticos associados à proteína Gi, leva à diminuição da liberação de GABA ou glutamato, dependendo do neurônio onde ele está localizado (OHNO-SHOSAKU; MAEJIMA; KANO, 2001).

Os principais agonistas endógenos de receptores canabinóides são a anandamida (N-arachidonoyl-ethanolamine) e o 2-araquidonoil-glicerol (DEVANE et

al., 1992; SUGIURA et al., 1995). Os dois endocanabinóides são inativados por hidrólise enzimática, sendo que a principal enzima responsável por essa reação é a amida hidrolase de ácido graxo (FAAH), para a anandamida e monoacilglicerol lipase, para o 2-AG (DI MARZO, 2008b).

A AEA é um agonista total ou parcial de receptores CB1, dependendo do tecido e tipo de resposta avaliada (PACHER, 2006). Além disso, também é considerado um endovanilóide, uma vez que é capaz de se ligar ao receptor de potencial transitório V1 (TRPV1), mesmo que com menor afinidade e eficácia quando comparado aos receptores CB1 (DI MARZO, 2008a; VRIENS J. et al., 2009; PERTWEE, 2010). Portanto, AEA pode ativar TRPV1, porém em maiores concentrações do que aquelas necessárias para ativar CB1R. Isso poderia explicar efeitos duais induzidos pela AEA, quanto testada em diferentes concentrações.

Os receptores TRPV1 são canais iônicos não seletivos permeáveis a cálcio com seis domínios transmembrana pertencentes à superfamília de receptores de potencial transiente vanilóide (CLAPHAM et al., 2005). Além da AEA, outros ligantes endógenos ativam TRPV1R, dentre eles: N-araquidonoildopamina (NADA), N-oleiletanalamina (OLEA) e ácido hidroperoxieicosatetraenoico (HPETE) (VAN DER STELT; DI MARZO, 2004). Os receptores TRPV1 são expressos em estruturas límbicas intimamente relacionadas ao controle emocional, como o córtex, hipocampo e PAG (MEZEY et al., 2000; CRISTINO; STAROWICZ; PETROCELLIS, 2008). Além disso, alguns estudos revelam a co-localização de receptores TRPV1 e CB1 no mesmo neurônio sendo que os dois sistemas muitas vezes estão envolvidos em uma mesma situação patológica (MAIONE et al., 2006). Porém, a ativação desses sistemas promovem ações opostas frente a uma mesma condição celular (STAROWICZ; NIGAM; DI, 2007). Se, por um lado, a ativação de CB1 diminui o

cálcio intracelular e atenua a excitabilidade celular, por outro, a ativação de TRPV1 promove o influxo de cálcio e facilita a transmissão sináptica (XING; LI, 2007; MOREIRA et al., 2012). Nesse sentido, trabalhos relatam a participação diferencial de receptores CB1 e TRPV1 na modulação de diversas disfunções do SNC, como ansiedade (LISBOA; GUIMARÃES, 2012a), pânico (CASAROTTO et al., 2012) e Parkinson (MORGESE et al., 2007).

Figura 1. Representação hipotética da modulação bidirecional de receptores CB1 e TRPV1 localizados em uma sinapse glutamatérgica. A ativação de receptores CB1 pré-sinápticos leva à diminuição da liberação de glutamato e, conseqüentemente, à redução da resposta pós-sináptica. Por outro lado, a ativação de receptores TRPV1 pós-sinápticos promove despolarização e aumento da resposta pós-sináptica.

1.2.1 Sistemas endocanabinóide e vanilóide na modulação da resposta ao estresse

Estudos translacionais sugerem que a sinalização endocanabinóide em humanos desempenha um papel crítico na modulação da resposta ao estresse e que alterações na função desse sistema parecem estar envolvidas na

vulnerabilidade ao desenvolvimento de desordens psiquiátricas relacionadas ao estresse, como a depressão (MORENA et al., 2016).

Recentemente, o envolvimento do sistema endocanabinóide no contexto da resposta ao estresse, assim como na neurobiologia da depressão, vem sendo bastante explorado também na pesquisa básica (MECHOULAM; PARKER, 2013; LUTZ et al., 2015; MORENA et al., 2016). A presença desse sistema em circuitos neurais de resposta ao estresse, assim como um crescente corpo de resultados comportamentais, apontam para o sistema endocanabinóide como um regulador crucial de respostas comportamentais ao estresse (GORZALKA; HILL; HILLARD, 2008). Nesse sentido, a inibição da sinalização mediada por CB1R, através da utilização de animais knock-out para CB1R ou antagonista de CB1R, promove: inibição do comportamento de ingesta alimentar; redução da resposta a estímulos de recompensa; aumento de respostas de medo e ansiedade; prejuízo na extinção de memórias aversivas (MARSICANO et al., 2002; SANCHIS-SEGURA et al., 2004; BELLOCCHIO et al., 2013). Por outro lado, a facilitação do sistema endocanabinóide, por meio da utilização de ferramentas farmacológicas (agonista CB1R e inibidor da recaptação de AEA) e genéticas (animais knock-out para a enzima FAAH), favorece as respostas como diminuição da imobilidade no nado forçado e redução dos níveis de ansiedade no teste do claro e escuro (HILL; GORZALKA, 2005a; MOREIRA et al., 2008). Em conjunto, esses resultados indicam que o sistema endocanabinóide exerce um papel importante na modulação das respostas emocionais ao estresse.

Em adição ao envolvimento no comportamento emocional, o sistema endocanabinóide desempenha um papel regulador do eixo HPA. Nesse sentido, a inibição da atividade do sistema endocanabinóide (tanto pela inibição da síntese de

endocanabinóides quanto pelo antagonismo de CB1R), promove exacerbada ativação do eixo HPA, de maneira semelhante a uma resposta a evento estressante (PATEL et al., 2004; HILL; MCEWEN, 2010). Patel e colaboradores (2004) observaram, ainda, que o tratamento com antagonista de receptores CB1 antes do estresse de restrição resulta em exacerbada resposta ao estresse através da potenciação do aumento dos níveis de corticosterona (PATEL et al., 2004). Dando suporte a essa ideia, o pré-tratamento com agonista CB1, inibidor da recaptação de AEA ou inibidor da FAAH atenuam o aumento de secreção de corticosterona induzido pelo estresse (PATEL et al., 2004).

Em contrapartida, a exposição a evento estressante também é capaz de modular a atividade do sistema endocanabinóide, apesar de os dados serem um pouco controversos a esse respeito (GORZALKA; HILL; HILLARD, 2008). Há evidências, por exemplo, de que a exposição a estresse altera o conteúdo de AEA e de 2-AG em estruturas como a amígdala, hipocampo e CPFmv, podendo haver aumento ou diminuição dependendo do modelo, da condição, da duração do estresse e da espécie investigada (DUBREUCQ et al., 2012; MCLAUGHLIN et al., 2012; GRAY et al., 2016). Trabalhos *in vitro* mostram que a aplicação de glicocorticoide em fatias de tecido hipotalâmico aumenta consideravelmente o conteúdo de AEA e 2-AG nesse tecido, sugerindo que o estresse promoveria rápida ativação do sistema endocanabinóide (DI et al., 2005; MALCHER-LOPES et al., 2006). Por outro lado, estudo *in vivo* mostra que a exposição de camundongos ao estresse agudo de restrição por 30 min não altera os níveis de AEA e reduz os níveis de 2-AG no hipotálamo, (PATEL et al., 2004). Este dado bioquímico não está de acordo com os dados comportamentais discutidos acima, que sugerem que o sistema endocanabinóide atua como um sistema facilitador da recuperação ao

estresse (GORZALKA; HILL; HILLARD, 2008). Diante destes dados, sugere-se que os níveis de endocanabinóide no hipotálamo estejam aumentados em situações basais, inibindo projeções glutamatérgicas ao eixo HPA (PATEL et al., 2004). Em situações de enfrentamento ao estresse, o conteúdo endocanabinóide é reduzido, resultando em uma desinibição do núcleo paraventricular do hipotálamo e, consequente a ativação do eixo HPA (PATEL et al., 2004).

Posteriormente, estudos mostraram que o conteúdo de endocanabinóides também pode estar reduzido ou não ser alterado pelo estresse de restrição em outras estruturas importantes na resposta ao estresse, como CPFm e amígdala (PATEL; CRAVATT; HILLARD, 2005; RADEMACHER et al., 2008). Por outro lado, a exposição de ratos ao estresse do choque nas patas promove um aumento rápido do conteúdo de AEA e 2-AG na substância cinzenta periaquedutal (PAG), que é atenuado 25 minutos após o estresse (HOHMANN et al., 2005). A contribuição destas mudanças nos níveis de AEA e 2-AG induzidas pelo estresse, no CPFmv, PAG e amígdala, ainda é pouco conhecida e precisa ser melhor explorada.

O sistema endocanabinóide também desempenha importante papel na resposta ao estresse crônico. Em camundongos expostos a 10 dias de estresse de restrição, os níveis de FAAH estão aumentados enquanto que os níveis de AEA estão reduzidos e de 2-AG estão aumentados (RADEMACHER et al., 2008). Além disso, a expressão de CB1 também é modificada em resposta à exposição ao estresse crônico, sendo predominantemente observada diminuição da expressão e/ou função no hipocampo e hipotálamo e aumento da expressão no CPF de animais expostos ao estresse variado (RADEMACHER; HILLARD, 2007). De uma maneira geral, podemos dizer que, em situações de estresse agudo, o sistema endocanabinóide restringe a ativação do eixo HPA, enquanto que durante o estresse

crônico repetido ele inibe a liberação de glutamato e diminui a atividade de algumas estruturas do sistema límbico, o que pode contribuir para a adaptação ao estresse (GORZALKA; HILL; HILLARD, 2008). Portanto, o sistema endocanabinóide parece desempenhar papel chave no controle fisiológico da resposta a diferentes tipos de estressores.

As alterações funcionais do sistema endocanabinóide na resposta ao estresse podem ter relevância para a neurobiologia da depressão, uma vez que em modelos animais que envolvem a apresentação de estresse, foi demonstrado que a facilitação da neurotransmissão endocanabinóide, por meio de administração sistêmica de inibidor da FAAH ou de agonista de receptores CB1 ou sua deleção genética, promove efeito tipo-antidepressivo em modelos animais (HILL; GORZALKA, 2005b; BAMBICO et al., 2007, 2010; ADAMCZYK; MCCREARY; FILIP, 2008). Além disso, a ativação de receptores CB1 parece ser importante para o efeito antidepressivo de inibidores da recaptação de serotonina. Umathe e colaboradores (2011) observaram que o efeito tipo-antidepressivo da fluoxetina no teste do nado forçado é prevenido pela pré-administração do antagonista de receptores CB1, AM251 (UMATHE; MANNA; JAIN, 2011). Dessa maneira, parece que a neurotransmissão endocanabinóide para o efeito antidepressivo e na neurobiologia da depressão.

Dados em humanos dão suporte a essa hipótese, uma vez que foram descritas alterações nos níveis de AEA, 2-AG e CB1R no cérebro de suicidas e de indivíduos deprimidos (HUNGUND et al., 2004; HILL et al., 2008c). Além disso, polimorfismo no gene do CB1R parece afetar a resposta ao tratamento antidepressivo convencional (DOMSCHKE et al., 2008). No entanto, a evidência mais contundente até o momento decorre do uso de rimonabanto, antagonista CB1,

para o tratamento da obesidade, que precipitou agravamento de doenças psiquiátricas e risco de suicídio em muitos pacientes medicados, levando a retirada do fármaco do mercado (MOREIRA; CRIPPA, 2009).

No entanto, a modulação da resposta ao estresse mediada pela ativação de CB1 pela AEA parece ser complexa. Trabalhos com animais demonstram que a administração de agonistas canabinóides, como a AEA, induz uma curva dose-resposta em forma de U, em modelos preditivos de efeitos ansiolíticos, antidepressivos e anticomulsivos (HILL; GORZALKA, 2004; BAMBICO et al., 2007; UMATHE; MANNA; JAIN, 2011). Conforme citado anteriormente, além de ser um endocanabinóide, a AEA é também considerada como um endovanilóide, uma vez que é capaz de se ligar a receptores TRPV1, além de CB1R (DI MARZO; BISOGNO; DE PETROCELLIS, 2001). Tem sido sugerido na literatura que a AEA se liga ao TRPV1R com menor afinidade quando comparado àquela observada para CB1R (ROSS, 2003; PERTWEE, 2010). Além disso, é importante destacar que as respostas sinápticas decorrentes da ativação de CB1 e TRPV1 são opostas, visto que a ativação de CB1 reduz a liberação de neurotransmissores, enquanto que a ativação de TRPV1 potencializa a transmissão glutamatérgica (XING; LI, 2007; CASAROTTO et al., 2012). Nesse sentido, parece que a ativação de receptores CB1 e TRPV1 está envolvida na resposta dual da AEA, sendo que, de maneira geral, em doses menores observa-se a participação de CB1 e em doses maiores prevalecem os efeitos mediados por TRPV1 (BAMBICO et al., 2007; UMATHE; MANNA; JAIN, 2011). Além disso, trabalhos utilizando antagonistas de receptores TRPV1 e CB1 e animais knock-out para TRPV1^{-/-} e CB1^{-/-} reforçam que a ativação dos sistemas endocanabinóide e endovanilóide por esses receptores modulam funções cerebrais através de diferentes mecanismos, levando a efeitos opostos (MARSCH et al., 2007;

STAROWICZ et al., 2007; RUBINO et al., 2008a). Diante destas observações, sugere-se que a AEA, receptores CB1 e receptores TRPV1 formam um sistema regulatório piramidal, onde a ativação de TRPV1R pós-sináptico interfere na síntese de endocanabinóides e estes podem restringir a liberação de neurotransmissores, por se ligar em CB1R pré-sináptico (MOREIRA et al., 2012).

Dependendo da dose utilizada, a administração de AEA leva a efeitos contraditórios em diferentes tipos de respostas comportamentais. Com relação à ansiedade, já está bem estabelecido que esse agonista CB1 promove uma resposta em U, sendo que o efeito é observado em uma faixa de dose, porém se perde em doses maiores. Moreira e colaboradores (2007) demonstraram efeito semelhante em outros modelos e sugeriram que esse perfil de resposta possivelmente se deva à capacidade da anandamida de ativar receptores TRPV1, quando administrados em doses elevadas (MOREIRA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2007). Nesse mesmo sentido, em 2007, Bambico e colaboradores observaram que doses menores de um agonista CB1 possuem efeito tipo-antidepressivo quando administrado intra-peritonalmente (i.p.) em ratos submetidos ao teste do nado forçado. Porém, em doses maiores, esse efeito se perde, possivelmente pela ativação de receptores TRPV1 (BAMBICO et al., 2007).

De fato, estudos de manipulação genética e farmacológica apontam que a diminuição da ativação de receptores TRPV1 produz efeito tipo-antidepressivo em roedores (KASCKOW JW, MULCHAHEY JJ, 2004; MANNA; UMATHE, 2012; YOU et al., 2012; KULISCH; ALBRECHT, 2013). Nesse sentido, camundongos KO para TRPV1 permanecem menos tempo imóveis no TNF (YOU et al., 2012), assim como animais que recebem injeção i.c.v. de antagonista TRPV1 (capsazepina) (MANNA; UMATHE, 2012).

Os dados científicos discutidos nessa sessão dão evidências de que a facilitação da neurotransmissão endocanabinóide mediada por CB1R promove efeito tipo-antidepressivo e que, por outro lado, o bloqueio de receptores vanilóides do tipo TRPV1 promovem efeitos semelhantes. Desse modo, ambas as neurotransmissões parecem estar envolvidas na neurobiologia da depressão, porém com contribuições opostas. Esses alvos se mostram potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos antidepressivos, sendo de extremo interesse compreender melhor as estruturas cerebrais e os sistemas modulados pelos receptores CB1 e TRPV1.

1.3 Sistemas glutamatérgico e nitrérgico na modulação da resposta ao estresse

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC participando de mais da metade de todas as sinapses no cérebro (HILLHOUSE; PORTER, 2015). Seus receptores podem ser localizados pré- ou pós-sinapticamente e são subdivididos em canais iônicos e receptores metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos incluem o N-metil-D-aspartato (NMDA), o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA), e o kainato. Já os receptores metabotrópicos são divididos em 8 subtipos de receptores acoplados à proteína G (mGluR1–8) (HILLHOUSE; PORTER, 2015). Os receptores NMDA (NMDAR) são canais iônicos permeáveis especialmente ao cálcio, que se apresentam como um complexo com sete subunidades (NR1, NR2A-D e NR3A-B) (HILLHOUSE; PORTER, 2015). A sua ativação requer a subunidade NR1 e uma subunidade NR2. O glutamato se liga à NR2, mas a abertura do canal depende também da ligação de um cofator – a glicina – que se liga à subunidade NR1 (KEW; KEMP, 2005). Além disso, a ativação de NMDAR parece ser dependente de despolarização prévia, uma vez que o canal é

bloqueado por íons magnésio no estado de repouso e o deslocamento dos íons se dá após a despolarização do neurônio, que é geralmente obtida pela ativação de AMPA (KEW; KEMP, 2005).

O envolvimento dos NMDAR na neurobiologia da depressão é o mais bem estabelecido dentre os receptores glutamatérgicos. Nesse sentido, o primeiro trabalho que demonstrou a participação da neurotransmissão glutamatérgica na neurobiologia da depressão observou diminuída funcionalidade de receptores NMDA em animais expostos a estresse (SHORS et al., 1989). Posteriormente, diversos outros trabalhos pré-clínicos reforçaram que o tratamento com antagonista NMDA possui propriedades tipo-antidepressivas em diferentes modelos animais (SOFIA; HAKAL, 1975; TRULLAS; SKOLNICK, 1990; PETRIE; REID; STEWART, 2000). Além disso, esses receptores parecem estar envolvidos no mecanismo de ação de fármacos antidepressivos, uma vez que o tratamento crônico com drogas antidepressivas atenua a expressão e/ou função de receptores NMDA, particularmente no CPF e no hipocampo, além de diminuir os níveis sinápticos de glutamato (MUSAZZI et al., 2012; NAVA et al., 2015).

Os receptores do tipo AMPA parecem também ser importantes na neurobiologia da depressão, porém se contrapondo aos receptores do tipo NMDA em algumas funções. Estudos mostram que agonistas AMPA induzem efeito tipo antidepressivo em modelos animais (LI et al., 2001; LINDHOLM et al., 2012) e que antidepressivos monoaminérgicos aumentam a sua expressão (BARBON; BARLATI, 2011). Interessantemente, trabalhos mostram que o efeito antidepressivo de antagonista NMDA depende da ativação de AMPA, uma vez que a pré-administração de antagonista AMPA previne os efeitos da Ketamina (MAENG et al., 2008).

O interesse científico na interação entre o sistema glutamatérgico e a depressão foi potenciado a partir do trabalho clínico de Berman e colaboradores, no ano de 2000. Esses pesquisadores observaram pela primeira vez que a administração de única dose intravenosa de ketamina, que atua como antagonista de receptores NMDA em humanos deprimidos promove melhora rápida (4 horas após a administração) e duradoura (até 72 horas) dos sintomas (BERMAN et al., 2000). Consecutivamente, estudos *post-mortem* clínicos têm encontrado evidências da disfunção glutamatérgica, dependente de NMDAR, em pacientes deprimidos, observando alterados níveis de expressão das unidades NR1 ou NR2 em estruturas como o córtex pré-frontal, amígdala e locus cerúleos (BENEYTO, M., MEADOR-WOODRUFF, 2008; KAROLEWICZ et al., 2009; CHANDLEY et al., 2014). Uma vez que as subunidades NR1 e NR2 são requeridas para a ativação de NMDAR, a alteração da expressão dessa subunidade culmina em mudanças funcionais dos receptores, que parece, portanto, estar envolvido no desenvolvimento da depressão.

O glutamato, através da ativação de NMDAR, promove ativação da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e síntese de óxido nítrico (NO) no SNC (GARTHWAITE; GARTHWAITE, 1989). Nesse sentido, estudos da área básica e clínica sugerem que o sistema nitrérgico também esteja desregulado na depressão. A administração sistêmica de inibidores da óxido nítrico sintase (NOS) produz efeito tipo-antidepressivo em diferentes modelos animais (revisto em (JOCA; MOREIRA; WEGENER, 2015). Nesse mesmo sentido, estudos clínicos mostram que pacientes deprimidos possuem quantidades aumentadas de óxido nítrico sintase (LEE et al., 2006). Reforçando o envolvimento do NO na neurobiologia da depressão, evidências indicam que o efeito farmacológico de antidepressivos monoaminérgicos parece

envolver a normalização da sinalização nitrérgica no SNC (KAROLEWICZ; PAUL; ANTKIEWICZ-MICHALUK, 2001; IKENOUCI-SUGITA et al., 2009).

Em conjunto, os dados discutidos nessa sessão sugerem que ocorre disfunção na via NMDA-NO em estruturas límbicas, em desordens relacionadas ao estresse, como a depressão. Portanto, é de interesse científico compreender melhor as estruturas cerebrais envolvidas, além de possíveis mecanismos modulatórios desses sistemas, favorecendo a identificação de novos alvos farmacológicos para o tratamento dessa desordem.

1.4 Modulação dos sistemas glutamatérgico e nitrérgico pelo sistema endocanabinóide

Como explicado anteriormente, o sistema endocanabinóide desempenha suas principais funções no SNC através da modulação de outros sistemas neurotransmissores (SIGNALING et al., 2012). Essa função modulatória depende da expressão de receptores CB1, além da presença de canabinóides endógenos no cérebro (MARSICANO; LUTZ, 1999). Marsicano e Lutz mostraram que CB1R são expressos em quantidades diferentes de acordo com o subtipo neuronal. A maioria das células com elevada expressão de CB1R são interneurônios gabaérgicos, mas neurônios glutamatérgicos também expressam tais receptores em níveis significativos no hipocampo, amígdala e córtex (MARSICANO; LUTZ, 1999). Dessa maneira, os mecanismos modulatórios desempenhados por endocanabinóides são complexos e podem envolver circuitos glutamatérgicos principais, assim como circuitos gabaérgicos locais.

Uma vez que receptores CB1 se localizam no terminal pré-sináptico e são acoplados à proteína Gi, a resposta final da sua ativação vai depender do subtipo

neuronal em que está localizado. Em neurônios glutamatérgicos, a ativação de CB1 promove diminuição da liberação de glutamato, da ativação de receptores NMDA e, conseqüentemente, da síntese de NO (MCLAUGHLIN; GOBBI, 2012a). Enquanto que em interneurônios gabaérgicos, a ativação de CB1 culmina em desinibição da neurotransmissão glutamatérgica e da síntese de NO (MCLAUGHLIN; HILL; GORZALKA, 2014). Nesse sentido, dados eletrofisiológicos indicam que agonista CB1 reduz a amplitude da corrente pós-sináptica excitatória glutamatérgica em neurônios piramidais corticais (HILL et al., 2007). Além disso, estudos recentes de manipulação farmacológica obtiveram respostas nesse mesmo sentido, demonstrando a possível modulação da neurotransmissão glutamatérgica pela ativação de receptores CB1 em diferentes estruturas cerebrais relacionadas ao controle emocional, como o córtex frontal e a substância cinzenta periaquedutal (LI et al., 2010; LISBOA; GUIMARÃES, 2012a).

O envolvimento do sistema endocanabinóide na resposta ao estresse parece envolver ambas as populações neuronais: glutamatérgica e GABAérgica (HÄRING et al., 2012). Estudos de manipulação genética do sistema endocanabinóide em subpopulações neuronais específicas têm auxiliado no entendimento dessas modulações através da utilização de animais knock-out condicionais para receptores CB1 exclusivamente em neurônios glutamatérgicos corticais ou GABAérgicos (HÄRING et al., 2012). Esses resultados têm sugerido um papel dual na modulação da resposta emocional ao estresse pelas distintas subpopulações neuronais, com efeitos comportamentais e moleculares bifásicos (JACOB et al., 2009; LAFENÊTRE; CHAOULOFF; MARSICANO, 2009; HÄRING et al., 2011). Nesse sentido, um comportamento tipo-ansiosgênico foi observado em animais knock-out para CB1R em neurônios glutamatérgicos (JACOB et al., 2009; LAFENÊTRE; CHAOULOFF;

MARSICANO, 2009). A deleção de CB1R em neurônios glutamatérgicos atenuou a investigação de novos estímulos em modelo animal, enquanto que a ausência de CB1R em neurônios GABAérgicos favoreceu o comportamento de busca pela novidade (LAFENÊTRE; CHAOULOFF; MARSICANO, 2009). Além disso, quando expostos à natação forçada, animais com completa deleção genética de CB1R em neurônios glutamatérgicos apresentam redução do tempo de imobilidade, um efeito tipo-antidepressivo, enquanto que permanece inalterado em knock-out para CB1 em neurônios GABAérgicos (STEINER et al., 2008). Com bases nesses dados, foi sugerido que receptores CB1 em neurônios glutamatérgicos e receptores CB1 em neurônios GABAérgicos desempenhem papéis diferentes na modulação da resposta emocional ao estresse.

De particular interesse para o presente estudo, os dados discutidos nessa sessão sugerem que o efeito tipo-antidepressivo decorrente da facilitação da neurotransmissão canabinóide mediada por CB1R sejam decorrentes da interferência na neurotransmissão glutamatérgica. Porém, ainda são necessários mais estudos para melhor compreender a interação entre esses sistemas, especialmente no CPFm, onde se demonstrou que a presença desses receptores tem participação importante na modulação da resposta emocional ao estresse (MCLAUGHLIN et al., 2012; GRAY et al., 2016).

1.5 Córtex pré-frontal medial ventral na modulação da resposta ao estresse

Os sistemas neurais e as estruturas cerebrais envolvidos em distúrbios de humor, como a depressão, são complexos e envolvem muitos locais no SNC, sendo que o conjunto dessas estruturas é conhecido como sistema límbico (PRICE; DREVETS, 2010). Dentre estas estruturas com papel central no controle do humor

pode-se destacar: o córtex pré-frontal (CPF), amígdala, hipocampo, hipotálamo e núcleo acúmbens (PRICE; DREVETS, 2010). O CPF de primatas tem sido dividido anatomicamente em pelo menos duas principais sub-áreas, o CPF dorsolateral e o orbitomedial (Groenewegen and Uylings, 2000). A porção medial do CPF (CPFm) vem sendo o foco de diversos estudos comportamentais por possuir intensas e difusas conexões com as demais estruturas do sistema límbico (KRETTEK; PRICE 1977). Tais evidências dão sustentação anatômica para, o que o CPFm desempenhe papel central em inúmeras funções de alta-ordem, como tomada de decisão e aprendizado, assim como no processamento emocional e regulação das respostas ao estresse (CZÉH et al., 2008).

De particular interesse para o presente estudo, disfunções do CPFm tem sido relatadas em pacientes diagnosticados com depressão (DREVETS et al., 1992; BIVER et al., 1994; MAYBERG et al., 2000; GREICIUS et al., 2007) e o restabelecimento da funcionalidade dessa estrutura está relacionado ao sucesso terapêutico de drogas antidepressivas (MAYBERG et al., 1999, 2000, 2005; BRODY et al., 2001). Além disso, mudanças morfológicas do CPFm também são observadas em pacientes com desordens de humor, manifestadas pela redução no volume da substância cinzenta e elementos celulares (DREVETS, 1998; DREVETS; PRICE; FUREY, 2008; MYERS-SCHULZ; KOENIGS, 2012).

Analogamente ao que ocorre em humanos deprimidos, a exposição de animais de laboratório a estresses inescapáveis induz alterações neuroquímicas, funcionais e morfológicas no CPFm, as quais parecem estar associadas às alterações comportamentais relacionadas à depressão, como a anedonia (MCKLVEEN; MYERS, 2015).

Em ratos, o CPFm compreende as porções ventral, sub-dividida em pré-límbico (PL) e infra-límbico (IL), e dorsal (VERTES, 2004). A região dorsal está envolvida especialmente em funções motoras, e a região ventral em processos de cognição e memória (VERTES, 2004). É importante destacar que o CPFmv em roedores é funcionalmente equivalente ao córtex pré-frontal orbitomedial do cérebro de primatas e humanos (GROENEWEGEN; UYLINGS, 2000).

O CPFmv-PL apresenta extensas projeções para estruturas límbicas como o núcleo dorsal da rafe, substância cinzenta periaquedutal e núcleo basolateral da amígdala, sendo, portanto, bastante estudado quanto à participação em respostas comportamentais (VERTES, 2004). Nesse sentido, nosso grupo investigou o envolvimento dessa estrutura na resposta emocional ao estresse do nado forçado, e verificou que a inativação aguda temporária da transmissão sináptica no PL promove redução do tempo de imobilidade dos animais, um efeito tipo-antidepressivo (SCOPINHO et al., 2010). Corroborando esses dados, inativação do PL utilizando estimulação encefálica profunda (*deep brain stimulation* - DBS) ou optogenética produziram resultados semelhantes (COVINGTON et al., 2010; HAMANI et al., 2010).

Esses resultados sugerem que a hiperativação do CPFm durante o estresse favorece o desenvolvimento de suas consequências comportamentais, de modo que sua inibição facilita a adaptação comportamental observado como efeito tipo-antidepressivo em modelos animais. No entanto, o envolvimento dos sistemas endocanabinóide e glutamatérgico, bem como a interação entre eles, nessas respostas emocionais ao estresse permanece pouco compreendido.

1.5.1 Sistemas endocanabinóide e vanilóide no córtex pré-frontal medial ventral

Assim como descrito anteriormente, receptores CB1 são amplamente expressos em todo o SNC, incluindo o prosencéfalo, gânglios da base e estruturas do sistema límbico (GLASS, 1997; MATO et al, 2004). Do ponto de vista neuroanatômico, há uma considerável similaridade entre a expressão de receptores CB1 e as redes neuronais envolvidas na resposta ao estresse e controle das emoções (MCLAUGHLIN; GOBBI, 2012a). Apesar disso, apenas recentemente estudos começaram a avaliar os efeitos da manipulação da neurotransmissão mediada por CB1R em estruturas específicas, como a amígdala, hipocampo, estriado e CPF, sobre a resposta emocional ao estresse (MCLAUGHLIN; GOBBI, 2012a).

O sistema endocanabinóide do CPFmv parece desempenhar um papel chave na regulação da resposta ao estresse. Trabalhos recentes mostram que a exposição a estresse, agudo e crônico, diminui os níveis de anandamida no CPFm (MCLAUGHLIN et al., 2012; GRAY et al., 2016). Além disso, o favorecimento da sinalização canabinóide no CPFmv, pela administração de agonista CB1 ou pelo aumento da disponibilidade de AEA, atenua o desenvolvimento e/ou expressão de respostas emocionais ao estresse em modelos animais de ansiedade e depressão (HILL; GORZALKA, 2005a; BAMBICO et al., 2007; RUBINO et al., 2008a; MCLAUGHLIN et al., 2012, 2013; MCLAUGHLIN; GOBBI, 2012b; LISBOA et al., 2015; SARTIM; GUIMARÃES; JOCA, 2016). Essas evidências sugerem que estresse promove hipofunção do sistema endocanabinóide cortical, enquanto que a facilitação do sistema endocanabinóide local favorece o desenvolvimento de respostas adaptativas ao estresse.

Especialmente importante para o presente trabalho, receptores CB1 são abundantemente expressos no CPFmv, tanto em terminais glutamatérgicos quanto GABAérgicos (MARSICANO; LUTZ, 1999; HILL et al., 2007; KATONA; FREUND, 2012). Portanto, o balanço excitatório e inibitório no CPF é controlado, dentre outros mecanismos, pela sinalização endocanabinóide retrógrada (YOSHINO et al., 2011).

Dados da literatura são controversos com relação ao envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica ou gabaérgica corticais no efeito de drogas que facilitam a ativação de CB1R. Estudos recentes mostram que os receptores CB1 são colocalizados com interneurônios GABAérgicos no CPFm e que a ativação de CB1R diminui a liberação de GABA na camada V de neurônios piramidais do córtex (CHU et al., 2010; HILL; HILLARD; MCEWEN, 2011). Sendo assim, a ativação local de CB1R no CPFmv pode reduzir o tônus inibitório sobre projeções glutamatérgicas facilitando a ativação de neurônios piramidais. Por outro lado, agonista de receptores CB1 promove supressão da neurotransmissão glutamatérgica cortical evidenciada como redução da amplitude da corrente pós-sináptica excitatória mediada por NMDA em neurônios piramidais (Li et al., 2010). Além disso, evidências indicam que a ativação de CB1R reduz a neurotransmissão excitatória por interferir na liberação e captação de glutamato na via cortico-estriatal (BROWN; BROTCHE; FITZJOHN, 2003). Apesar disso, pouco se sabe sobre a participação dessas modulações na resposta ao estresse em modelo animal de depressão (ou preditivo de efeito antidepressivo).

De maneira semelhante aos receptores canabinóides, os receptores vanilóides TRPV1 são expressos em estruturas cerebrais relacionadas ao controle emocional, como o hipocampo e o CPFmv (TÓTH et al., 2005). Análise por imunohistoquímica mostra elevada expressão de TRPV1 no corpo celular e nos

dendritos de neurônios do CPFmv, preferencialmente na membrana pós-sináptica. (TÓTH et al., 2005). Sendo canais iônicos permeáveis a cálcio, a ativação desses receptores favorece a resposta excitatória pós-sináptica.

Nesse contexto, a participação de receptores CB1 e TRPV1 localizados no CPFmv parecem desencadear respostas opostas sobre a excitabilidade celular. Interessantemente, Micale e colaboradores mostraram que receptores CB1 e TRPV1 são co-expressos em neurônios do CPFmv, sugerindo que possa ocorrer uma interação entre esses mecanismos na modulação excitabilidade neuronal nessa estrutura (MICALE et al., 2009).

A literatura ainda é bastante limitada com relação à participação de receptores TRPV1 do CPFmv na modulação de respostas comportamentais ao estresse. Por outro lado, estudos com modelos animais de ansiedade mostram que a administração intra-CPFmv de antagonista TRPV1 (AGUIAR et al., 2009; TERZIAN et al., 2014) induz efeito ansiolítico de maneira semelhante à administração sistêmica (KASCKOW; MULCHAHEY, 2004; MICALE et al., 2009), sugerindo que os receptores TRPV1 do CPFmv sejam importantes na mediação da resposta sistêmica aos fármacos. Como já foi observado efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração intracerebroventricular de antagonista TRPV1 no teste do nado forçado (MANNA; UMATHE, 2012), espera-se que esses receptores corticais também estejam envolvidos nessa resposta. No entanto, o envolvimento de receptores TRPV1 do CPFmv na modulação da resposta emocional ao estresse em modelo animal de depressão permanece não investigada. Além disso, também não é sabido se receptores CB1, TRPV1 e NMDA do CPFmv constituiriam um circuito local capaz de interagir para modular a resposta emocional ao estresse.

1.6 Hipótese

Com base nas evidências apresentadas, a hipótese investigada no presente trabalho é que receptores CB1 e TRPV1 localizados no CPFmv-PL modulariam respostas emocionais ao estresse de maneiras opostas, por meio da regulação da neurotransmissão glutamatérgica local. Nesse caso: 1. A ativação de CB1R deveria induzir efeito tipo-antidepressivo em modelo animal, enquanto que efeito similar seria obtido através do bloqueio de receptores TRPV1; 2. A administração de AEA induziria efeitos antidepressivos devido à ativação de CB1R, enquanto que a perda de efeito da AEA quando administrada em doses maiores seria devido à ativação concomitante de receptores TRPV1; 3. Os efeitos induzidos pela administração de AEA estariam relacionados à modulação das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica corticais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o envolvimento dos receptores CB1 e TRPV1 do CPFmv na modulação de respostas comportamentais induzidas pelo estresse em modelo preditivo de efeito antidepressivo, bem como avaliar a contribuição das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica nesse efeito.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos induzidos pela administração de diferentes doses de AEA, quando administrada no CPFmv-PL, em ratos submetidos ao teste do nado forçado.
- Avaliar a participação de receptores CB1 e TRPV1 nos efeitos induzidos pela administração de AEA no CPFmv-PL de ratos.
- Avaliar os efeitos induzidos pela administração de bloqueador dual da enzima FAAH e de receptores TRPV1 (AA-5HT)
- Avaliar os efeitos induzidos pela administração isolada ou combinada de antagonista de receptores TRPV1 (SB366791) e inibidor da enzima FAAH (URB597), no CPFmv-PL de ratos submetidos ao teste do nado forçado.
- Avaliar a participação de receptores CB1 no efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração de AA-5HT no CPFmv-PL de animais submetidos ao TNF.
- Avaliar se ocorre somação do efeito tipo-antidepressivo da AEA com um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (LY235959), quando administrados conjuntamente em doses subefetivas, no CPFmv de animais submetidos ao TNF.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 230 e 270 g, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo - USP, Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos aos pares, em caixas de acrílico (20 x 30 x 12cm), no Laboratório de Farmacologia da Faculdade Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), em condições controladas: temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo de luz claro-escuro de 12 horas, sem privação de alimento e água, exceto durante a realização do experimento. A troca da serragem usada como cama era feita a cada 2 dias, assim como a água de beber e a ração.

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 13.1.582.53.5) do Campus de Ribeirão Preto – USP (em anexo). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

3.2 Drogas

As drogas utilizadas para realização dos experimentos foram: 1) **anandamida** (AEA, endocanabinóide) – nas doses 0,25 - 0,5 – 5 – 50 – 250 pmol/0,2 µl/lado (LISBOA et al., 2010); 2) **AM251** (antagonista CB1) – nas dose 1 e 10 pmol/0,2 µl/lado (FERREIRA-JUNIOR et al., 2012); 3) **SB366791** (antagonista seletivo TRPV1) – nas doses 0,5 - 1 e 10 nmol/0,2 µl/lado (CASAROTTO et al., 2012); 4) **LY235959** (LY) (antagonista seletivo de receptores de glutamato do tipo NMDA) – nas doses de 1 e 3,0 nmol/0,2 µl/lado (PEREIRA et al., 2015); 5) **Arachidonoyl serotonin** (AA-5HT, bloqueador dual da FAAH e receptores TRPV1) – nas doses 0,125 - 0,25 - 0,5 nmol/0,2 µl/lado. 7) **URB597** (inibidor da FAAH) – nas doses 0,001 - 0,01 - 0,1 - 1 nmol/0,2 µl.

As drogas acima citadas foram administradas através de injeção intracortical, no pré-límbico, bilateralmente e no volume de 0,2µl por sítio de injeção. 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 pentabiótico 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 (intraperitoneal - 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 22°, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1998). As cânulas foram fixadas ao osso do crânio por parafusos de aço inoxidável e cimento acrílico. A obstrução das cânulas foi prevenida pela inserção de mandril em seu interior. Os animais receberam administração de pentabiótico veterinário (i.m., 0,1mL/100g) e do anti-inflamatório Banamine (0,1mL/100g), no início da cirurgia, com o objetivo de evitar quadros infecciosos e reduzir a dor pós-operatória. Após a cirurgia, os animais foram acondicionados em gaiola com aquecimento, onde permaneceram sob observação por 30 min, retornando para suas gaiolas após esse período. Os

experimentos foram realizados após cinco a sete dias do procedimento cirúrgico para permitir a recuperação adequada dos animais.

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 ficasse 1.0 mm abaixo do fim da cânula. Foi injetado um volume de 0.2 μ L/lado, durante 1 minuto, usando microseringa (Hamilton, USA) controlada por bomba de infusão. Um cateter de polietileno foi colocado entre a extremidade superior da agulha dental e a microseringa. Pelo movimento de uma bolha de ar dentro do cateter era observado o fluxo da droga durante a sua administração.

3.3.2 Análise histológica do sítio de injeção

Depois dos experimentos comportamentais, os ratos foram anestesiados com cloral hidratado 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 0,2 μ L do corante *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 40 μ m por 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.

3.3.3 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado, um dos modelos animais mais utilizados atualmente para a detecção de alterações comportamentais induzidas por drogas antidepressivas, foi realizado com procedimentos similares àqueles descritos por

Porsolt e colaboradores (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977), com adaptações descritas em Joca e Guimarães, 2006. O modelo consiste em colocar os animais para nadar, individualmente, em um cilindro de plástico (30 cm de diâmetro, 40 cm de altura, contendo 30 cm de água, com temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, de acordo com (JOCA; GUIMARAES, 2006), pelo período de 15 min (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 min de nado forçado, quando se registrou o tempo total de imobilidade (considerado o tempo que o animal permaneceu 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 substâncias de alarme (ABEL; 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 (72 cm x 72 cm, 40 cm de altura), dividida em 16 quadrantes (18 cm x 18 cm), pelo 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 foi contado quando o animal atravessou 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

Para todos os experimentos descritos a seguir, os animais foram distribuídos entre os diferentes tratamentos de maneira randomizada e a administração de droga, bem como o registro dos comportamentos, foi realizada sem que o experimentador tivesse conhecimento prévio dos tratamentos (as soluções eram preparadas e rotuladas anteriormente). Além disso, os experimentos foram realizados sempre contendo 2-4 animais de cada tratamento, incluindo veículos, em mesmo dia, entre 08 e 13hrs. Para se obter um número mínimo de 6 animais por grupo, conforme cálculo estatístico (G-Power 3.1), os experimentos eram repetidos pelo menos uma vez, sempre incluindo todos os grupos experimentais.

Experimento 1: efeito da administração de AEA (0,25 - 0,5 – 5 - 50 e 250 pmol/lado) no CPFmv-PL de animais submetidos ao teste do nado forçado

O experimento teve por objetivo investigar os efeitos induzidos pela administração de AEA no CPFmv-PL, a fim de identificar dose subefetiva, dose efetiva e dose alta não efetiva neste modelo.

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, 5 a 7 dias depois, ao pré-teste (15 min). Vinte e quatro horas depois, os animais receberam injeção bilateral intra-PL de AEA (nas doses de 0,25 - 0,5 – 5 - 50 e 250 pmol) e, após 10 minutos, foram submetidos ao teste do nado forçado. Ao término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção. A dose subefetiva (0.25 pmol), a menor dose que diminuiu o tempo de imobilidade (0,5 pmol) e a maior dose sem efeito (250 pmol) foram utilizadas nos experimentos seguintes.

Experimento 2: efeito da administração de AEA (0,25 - 0,5 – 5 - 50 e 250 pmol/lado) no CPFmv-PL de animais submetidos ao teste do campo aberto

O experimento teve por objetivo avaliar se a administração de AEA no CPFmv-PL induz alteração locomotora em ratos, o que poderia prejudicar a interpretação dos dados obtidos com a administração de AEA no TNF. Para isso, grupo independente de animais foi submetido à cirurgia estereotóxica e, 5 a 7 dias depois, ao teste do campo aberto (5 min). Dez minutos antes do teste, os animais receberam injeção bilateral intra-PL de AEA (nas doses de 0,25 - 0,5 – 5 - 50 e 250 pmol/0.2 µL/lado) ou veículo (0.2 µL/lado). Após o término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção.

Experimento 3: participação de receptores CB1 no efeito induzido pela administração de AEA (0,5 e 250pmol/lado) no CPFmv-PL

Experimento 3.1: efeito da administração de diferentes doses de antagonista de receptores CB1 (AM251)

Esse experimento teve por objetivo encontrar a dose de AM251 que não induza efeito *per se* no teste do nado forçado para ser utilizada nos experimentos seguintes. Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotóxica e, 5 a 7 dias depois, ao pré-teste no nado forçado (15 min). Vinte e quatro horas depois, os animais passaram pela sessão de teste (5 min). Os animais receberam injeção bilateral intra-PL de veículo ou AM251 (1 e 10 pmol/0.2 µL/lado) ou veículo (0.2 µL/lado), 10 min antes do teste. Após o término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção. A maior dose de AM251 (10 pmol) que não produziu efeito *per se* foi escolhida para a próxima etapa dos experimentos.

Experimento 3.2: efeito da pré-administração de AM251 sobre o efeito da AEA

Esse experimento teve por objetivo avaliar se o bloqueio de CB1R por meio da pré-administração do antagonista AM251 interferiria no efeito induzido pela administração de AEA (0,5 e 250 pmol) em animais submetidos ao teste do nado forçado. Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, 5 a 7 dias depois, ao pré-teste do nado forçado (15 min). Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos ao teste (5 min). Os ratos receberam injeção bilateral intra-PL de AM251 (10 pmol/0.2 µL/lado) ou veículo (0.2 µL/lado) e, 5 minutos depois receberam injeção bilateral de AEA (nas doses de 0,5 ou 250 pmol/0.2 µL/lado) ou veículo (0.2 µL/lado). 10 minutos após a última administração os animais foram expostos à sessão de teste e o final foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção.

Experimento 4: participação de receptores TRPV1 no efeito induzido pela administração de AEA (0,5 e 250 pmol/lado) no CPFmv-PL**Experimento 4.1: Efeito da administração de diferentes doses de SB366791 (antagonista seletivo de receptores TRPV1)**

Esse experimento teve por objetivo encontrar a dose de SB366791 que não induza efeito *per se* no teste do nado forçado para ser utilizada nos experimentos seguintes. Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, 5 a 7 dias depois, ao pré-teste do nado forçado (15 min). Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos ao teste (5 min). Os animais receberam injeção bilateral intra-PL de SB366791 (0,5 - 1 e 10 pmol/0.2 µL/lado) ou veículo (0.2 µL/lado), 10 minutos antes da sessão de teste. Após o término do teste, os animais foram perfundidos e

seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção. A dose de 0,5 pmol de SB366791 foi escolhida para a próxima etapa dos experimentos.

Experimento 4.2: efeitos da pré-administração de SB366791 sobre o efeito da AEA

Esse experimento teve por objetivo avaliar se o bloqueio de receptores TRPV1 por meio da pré-administração do antagonista SB366791 interferiria com os efeitos induzidos pela AEA (0,5 e 250 pmol) em animais submetidos ao teste do nado forçado. Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotóxica e, 5 a 7 dias depois, ao pré-teste do nado forçado (15 min). Vinte e quatro horas depois os animais foram submetidos à sessão de teste (5 min). Os animais receberam injeção bilateral intra-PL de SB366791 (na dose de 0,5 pmol/0.2 µL/lado) ou veículo (0.2 µL/lado) e, 5 minutos depois, receberam injeção bilateral de AEA (0,5 ou 250 pmol/0.2 µL/lado) ou veículo (0.2 µL/lado). 10 minutos após a última administração os animais foram expostos à sessão de teste. Após o término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção.

Experimento 5: efeito da administração de AM251 (10 nmol/lado) e SB366791 (0,5 e 10 pmol/lado) no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do campo aberto

O experimento teve por objetivo avaliar se a administração de AM251 e de SB366791 no CPFmv-PL induz alteração locomotora em ratos submetidos ao teste do campo aberto. Grupo independente de animais passou pelo mesmo procedimento experimental descrito no experimento 2, sendo que a droga administrada foi o AM251 (na dose de 10 nmol) ou SB366791 (nas doses de 0,5 e 10 pmol) por sítio de injeção.

Experimento 6: efeito da administração de AA-5HT no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado

O experimento teve por objetivo avaliar se a administração de um bloqueador dual da enzima FAAH e de receptores TRPV1 (AA-5HT), no CPFmv-PL de ratos, promoveria efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado. Grupo independente de animais passou pelo mesmo procedimento experimental descrito no experimento 1, sendo que a droga administrada foi o AA-5HT nas doses 0,125 - 0,25 ou 0,5 nmol por sitio de injeção.

Experimento 7: efeito da administração de AA-5HT (0,25 e 0,5 nmol/lado) no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do campo aberto

O experimento teve por objetivo avaliar se a administração de AA-5HT no CPFmv-PL induz alteração locomotora nas mesmas doses que alteraram o comportamento dos animais no teste do nado forçado. Grupo independente de animais passou pelo mesmo procedimento experimental descrito no experimento 2, sendo que a droga administrada foi o AA-5HT (nas doses de 0,25 e 0,5 nmol/0.2 µL/lado) ou veículo (0.2 µL/lado).).

Experimento 8: efeito da administração de URB597 no CPFmv de animais submetidos ao teste do nado forçado

O experimento teve por objetivo avaliar o efeito induzido pela administração do inibidor da enzima FAAH (URB597), no CPFmv-PL de ratos submetidos ao teste do nado forçado. Grupo independente de animais passou pelo mesmo procedimento experimental descrito no experimento 1, sendo que a droga administrada foi o URB597, nas doses de 0,001 / 0,01 / 0,1 / 1 nmol por sitio de

injeção, ou veículo (0.2 μ L/lado). Os experimentos foram realizados de forma cega e repetidos a fim de obter um número final de 5 a 7 animais/grupo.

Experimento 9: efeito da coadministração de SB366791 e URB597 no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado

O experimento teve por objetivo avaliar se o bloqueio concomitante da enzima FAAH (por meio da administração de URB597) e de receptores TRPV1 (por meio da administração de SB366791) induziria efeitos sinérgicos no teste do nado forçado. Grupo independente de animais foi submetido à cirurgia estereotáxica e, 5 a 7 dias depois, ao pré-teste do nado forçado (15 min). Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos à sessão de teste (5 min). Os animais receberam injeção bilateral intra-PL de SB366791 (na dose de 1 pmol/0.2 μ L/lado) ou veículo (0.2 μ L/lado) e, 5 minutos depois, receberam injeção bilateral de URB597 (0,001 nmol/0.2 μ L/lado) ou veículo (0.2 μ L/lado).). Após o término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção. Os experimentos foram realizados de forma cega e repetidos a fim de obter um número final de 7-8 animais/grupo.

Experimento 10: efeito da administração de URB597 (0,25 e 0,5 nmol/lado) no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do campo aberto

O experimento teve por objetivo avaliar se a administração de URB597 no CPFmv-PL induz alteração locomotora em ratos submetidos ao teste do campo aberto. Grupo independente de animais passou pelo mesmo procedimento experimental descrito no experimento 2, sendo que a droga administrada foi o URB597, nas doses de 0,001 / 0,01 / 0,1 / 1 nmol por sítio de injeção, ou veículo (0.2 μ L/lado).

Experimento 11: participação de receptores CB1 nos efeitos induzidos pela administração de AA-5HT no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado

Esse experimento teve por objetivo investigar se o bloqueio de CB1R no CPFm, por meio da pré-administração local de AM251, atenuaria o efeito induzido pela administração local de AA-5HT (0,25 nmol), no teste do nado forçado.

Grupo independente de animais foi submetido à cirurgia estereotática e, 5 a 7 dias depois, ao pré-teste do nado forçado (15 min). Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos ao teste (5min). Os ratos receberam injeção bilateral intra-PL de AM251 (10 pmol/ 0.2 µL/lado) ou veículo (0.2 µL/lado) e, 5 minutos depois, receberam injeção bilateral de AA-5HT (na dose de 0,25 nmol/0.2 µL/lado) ou veículo (0.2 µL/lado). Após o término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção. Os experimentos foram realizados de forma cega e repetidos a fim de obter um número final de 5-8 animais/grupo.

Experimento 12: participação de receptores CB1 nos efeitos induzidos pela administração de SB366791 no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado

Esse experimento teve por objetivo avaliar a possibilidade de o efeito tipo-antidepressivo induzido pelo antagonista de TRPV1R (SB366791) no teste do nado forçado ter ocorrido por permitir maior disponibilidade de AEA endógena para os CB1R, já que os TRPV1 estariam ocupados pela droga. Portanto, grupo independente de animais foi submetido à cirurgia estereotática e, 5 a 7 dias depois, ao pré-teste do nado forçado (15 min). Vinte e quatro horas depois, os animais

foram submetidos ao teste (5min). Os ratos receberam injeção bilateral intra-PL de AM251 (10 pmol/0.2 µL/lado) ou veículo (0.2 µL/lado) e, 5 minutos depois, receberam injeção bilateral de SB366791 (na dose de 10 nmol/0.2 µL/lado) ou veículo (0.2 µL/lado). Após o término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção. Os experimentos foram realizados de forma cega e repetidos a fim de obter um número final de 5-8 animais/grupo.

Experimento 13: efeito da administração de LY235959 (1, 3 e 10 nmol/lado) no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado

O experimento teve por objetivo avaliar o efeito induzido pela administração do antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (LY235959), no CPFmv-PL de ratos submetidos ao teste do nado forçado. Grupo independente de animais passou pelo mesmo procedimento experimental descrito no experimento 1, sendo que a droga administrada foi o LY235959 nas doses de 1 / 3 / 10 nmol por sítio de injeção ou veículo (0.2 µL/lado). Os experimentos foram realizados de forma cega e repetidos a fim de obter um número final de 7 a 8 animais/grupo. A dose subefetiva de LY235959 foi escolhida para ser utilizada em experimento posterior.

Experimento 14: efeito da administração de NPA (0,001 e 0,01 nmol/lado) no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado

O experimento teve por objetivo avaliar se a administração do inibidor da síntese de óxido nítrico (NPA), no CPFmv-PL de ratos, promoveria efeito antidepressivo no teste do nado forçado. Grupo independente de animais passou pelo mesmo procedimento experimental descrito no experimento 1, sendo que a

droga administrada foi o NPA nas doses de 0,001 e 0,01 nmol por sítio de injeção ou veículo (0.2 µL/lado). Os experimentos foram realizados de forma cega e repetidos a fim de obter um número final de 10 a 11 animais/grupo.

Experimento 15: efeito da coadministração de LY235959 e AEA 0,25 pmol/lado no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado

O experimento teve por objetivo avaliar se o bloqueio de receptores NMDA no CPFm, por meio da administração de LY237979, concomitante à administração local do canabinóide (AEA) promoveria efeitos sinérgicos no teste do nado forçado. Grupo independente de animais foi submetido à cirurgia estereotóxica e, 5 a 7 dias depois, ao pré-teste do nado forçado (15 min). Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos à sessão de teste (5 min). Os animais receberam injeção bilateral intra-PL de LY235959 (na dose de 1 nmol/0.2 µL/lado) ou veículo (0.2 µL/lado) e, 5 minutos depois, receberam injeção bilateral de AEA (0,25 pmol/0.2 µL/lado) ou veículo (0.2 µL/lado).). Após o término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção. Os experimentos foram realizados de forma cega e repetidos a fim de obter um número final de 7-10 animais/grupo.

3.5 Análise estatística

O resultado comportamental, tempo de imobilidade, foi analisado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett, para os experimentos com administração única de droga. Para os experimentos com duas administrações, foi realizada ANOVA de duas vias, considerando-se como fatores principais primeira e segunda injeção. Em caso de efeitos significativos em um dos fatores, ou interação

entre os fatores, foi realizada ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett ou Tukey, conforme apropriado. A distância percorrida no teste do campo aberto foi analisada por ANOVA de duas vias, sendo os fatores tempo e tratamento. Essas análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism, versão 5

Em todos os casos, diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

4 RESULTADOS

4.1 Localização dos sítios de injeção

Os sítios das injeções das drogas e de veículo foram analisados ao microscópio e identificados com o auxílio do Atlas de Paxinos e Watson como mostrado na figura 1 (PAXINOS; WATSON, 1998). Os dados dos animais cujos sítios de injeção estavam fora do CPFmv-PL foram excluídos dos resultados obtidos nos protocolos experimentais.

Figura 2. Imagem representativa da localização dos sítios histológicos (0,2 μ l) no córtex pré-frontal medial ventral – pré-límbico (CPFmv-PL) em diagramas baseados no Atlas de Paxinos e Watson (1998) (3.20, 2.70 e 2.20 mm do Bregma).

4.2 Experimento 1: efeito da administração de AEA (0,25 - 0,5 - 5 - 50 e 250 pmol/lado) no CPFmv-PL de animais submetidos ao teste do nado forçado

A administração de AEA (0,5 - 5 e 50 pmol/0,2 µl/lado) reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em comparação ao grupo controle ($F_{5,56}=3,998$, $P < 0,05$). Enquanto que as doses de 0,25 pmol e 250 pmol não induziram efeito significativo ($n= 8-12$, Dunnett $P > 0,05$, Figura 3).

Figura. 3. Efeito da administração de AEA intra-CPFmv-PL, nas doses de 0,25, 0,5, 5, 50, 250 pmol/0,2 µl/lado (8-12 animais por grupo) sobre o tempo (em segundos) de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado. Dados representam a média $\pm$ EPM. *Indica $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett).

4.3 Experimento 2: efeito da administração de AEA (0,25 - 0,5 - 5 - 50 e 250 pmol/lado) no CPFmv-PL de animais submetidos ao teste do campo aberto

Não ocorreu alteração na atividade locomotora entre os animais tratados com AEA ou veículo em nenhuma das doses testadas ($F_{5,100}=2,580$; $p>0,05$). Além disso, não foi observada interação entre o efeito do tempo e o tratamento ($F_{20,100}=0,7921$; $p>0,05$, figura 4).

Figura 4. Efeito da administração de AEA intra-CPFmv-PL, nas doses de 0,25, 0,5, 5, 50, 250 pmol/0,2 μ l/lado (5 animais por grupo) sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto. Dados representam a média $\pm$ EPM (ANOVA de medidas repetidas, $p>0.05$ para efeito do tratamento).

4.4 Experimento 3: participação de receptores CB1 no efeito induzido pela administração de AEA (0,5 e 250pmol/lado) no CPFmv-PL

Experimento 3.1: efeito da administração de diferentes doses de antagonista de receptores CB1 (AM251)

Como mostra a figura 5, a administração no CPFmv-PL de AM251, nas doses de 1 e 10 pmol não alterou o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado, quando comparado ao grupo controle ($F_{2,31}=0,02075$, $n=11-12$, Dunnett $P>0,05$).

Figura 5. Efeito da administração de AM251 intra-CPFmv-PL, nas doses de 1 e 10 pmol (11-12 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett).

Experimento 3.2: efeito da pré-administração de AM251 sobre o efeito da AEA

Na ANOVA de duas vias não houve efeito da primeira injeção ($F_{1,33}=3,201$, $P > 0,05$) ou da segunda injeção ($F_{2,33}=0,7675$, $P > 0,05$). No entanto, ocorreu interação entre esses fatores ($F_{2,33}=5,458$, $P < 0,05$). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett indicou que apenas o tratamento com AEA (0,5 pmol/0,2 μ l) + veículo foi significativamente diferente do grupo controle, ($F_{5,33}=3,757$, $P < 0,05$), mostrando que a pré-administração de AM251 (10 pmol/0,2 μ l) preveniu o efeito tipo-antidepressivo induzido pela AEA na dose de 0,5 pmol/0,2 μ l. Além disso, a dose de 250 pmol/0,2 μ l de AEA não promoveu efeito quando administrada isoladamente ou em combinação com AM251 ($n= 5-9$, Dunnett $P > 0,05$, Figura 6), indicando que pré-tratamento com AM251 não modificou o efeito da AEA nessa dose (250 pmol/0,2 μ l).

Figura 6. Efeito da coadministração de AM251, na dose de 10 nmol/0,2 μ l, e AEA, nas doses de 0,5 e 250 pmol/0,2 μ l, intra-CPFmv, sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado ($N = 5-9$ por grupo). Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias com pós-teste ANOVA de uma via seguido de Dunnett).

4.5 Experimento 4: participação de receptores TRPV1 no efeito induzido pela administração de AEA (0,5 e 250 pmol/lado) no CPFmv-PL

Experimento 4.1: Efeito da administração de diferentes doses de SB366791 (antagonista seletivo de receptores TRPV1)

Como mostra a figura 7, a administração de SB366791 na dose de 10 nmol/0,2 μ l/lado no CPFmv, reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado ($F_{3,32}=4,655$, $P<0,05$) quando comparado ao grupo controle ($n = 9-10$ por grupo, Dunnett $P<0,05$). Já as doses de 0,5 e 1 nmol/0,2 μ l/lado não foram significativamente diferentes do grupo tratado com veículo.

Figura 7. Efeito da administração de SB366791, nas doses de 0,5, 1 e 10 nmol/0,2 μ l/lado, intra-CPFmv (9-10 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. *Indica $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett).

Experimento 4.2: efeitos da pré-administração de SB366791 sobre o efeito da AEA

ANOVA de duas vias indicou que não houve efeito da primeira injeção ($F_{1,58}=1,139$, $P>0,05$) mas houve efeito da segunda injeção ($F_{2,58}=9,214$, $P<0,05$). Além disso, não ocorreu interação entre os fatores ($F_{2,58}=2,599$, $P>0,05$). ANOVA de uma via indicou diferenças significativas entre os tratamentos ($F_{5,58}=4,842$, $P<0,05$, figura 8), onde os grupos tratados com veículo + AEA (0,5pmol/0,2µl) e SB366791 + AEA (0,5pmol/0,2µl) foram significativamente diferentes do controle (veículo + veículo, Dunnets, $P<0,05$), indicando que o pré-tratamento não alterou o efeito da AEA nessa dose. No entanto, embora o tratamento com veículo + AEA (250 pmol/0,2 µl) não tenha sido significativamente diferente do controle (veículo + veículo, Dunnets $P>0,05$), a coadministração de SB366791 e AEA 250 pmol/0,2 µl reduziu o tempo de imobilidade em comparação ao grupo controle (veículo + veículo; $P<0,05$, Dunnets, figura 8). Portanto, embora a administração de SB SB366791 e AEA 250 pmol/0,2 µl não tenha induzido efeitos *per se*, a combinação desses tratamentos reduziu significativamente o tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle (Figura 8).

Figura 8. Efeito da coadministração de SB366791, na dose de 1 nmol/0,2 µl, e AEA, nas doses de 0,5 e 250 pmol/0,2 µl, intra-CPFmv-PL, sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado (7-14 por grupo). Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. *Indica $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias com pós-teste ANOVA de uma via seguido de Dunnet).

4.6 Experimento 5: efeito da administração de AM251 (10 nmol/lado) e SB366791 (0,5 e 10 pmol/lado) no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do campo aberto

Não ocorreu alteração na atividade locomotora entre os animais tratados com AM251, SB366791 ou veículo em nenhuma das doses testadas ($F_{3,108}=1,793$; $p > 0,05$). Além disso, não foi observada interação entre tempo e tratamento ($F_{12,108}=0,5344$; $p > 0,05$, figura 9).

Figura 9. Efeito da administração de AM251 (10pmol) e SB366791 (0,5 e 10 nmol), intra-CPFmv-PL, sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto. Dados representam a média +/- EPM. (7-9 animais por grupo) (ANOVA de medidas repetidas, $p > 0.05$ para efeito do tratamento).

4.7 Experimento 6: efeito da administração de AA-5HT no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado

Como mostra a figura 10, a administração de AA-5HT nas doses de 0,25 e 0,5 nmol/0,2 µl/lado no CPFmv-PL, reduziu o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado ($F_{3,33} = 5,193$, $P < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($n = 7-12$, Dunnett $P < 0,05$). A dose de 0,125 nmol/0,2 µl/lado não foi diferente do grupo tratado com veículo.

Figura 10. Efeito da administração de AA-5HT, nas doses de 0,125, 0,25 e 0,5 nmol/0,2 µl/lado, intra-CPFmv (7-12 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. *Indica $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett).

4.8 Experimento 7: efeito da administração de AA-5HT (0,25 e 0,5 nmol/lado) no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do campo aberto

Como mostra a figura 11, não ocorreu alteração na atividade locomotora entre os animais tratados com AA-5HT (0,25 e 0,5 nmol//0,2 µl/lado) e veículo em nenhuma das doses testadas ($F_{2,68}=0,4695$; $p>0,05$). Além disso, não foi observada interação entre o efeito do tempo e o tratamento ($F_{8,68}=0,4189$; $p>0,05$).

Figura 11. Efeito da administração de AA-5HT (0,25 e 0,5 nmol) intra-CPFmv-PL, sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto. Dados representam a média $\pm$ EPM. (7-9 animais por grupo) (ANOVA de medidas repetidas, $p > 0.05$ para efeito do tratamento).

4.9 Experimento 8: efeito da administração de URB597 no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado

Como mostra a figura 12, a administração de URB597 nas doses de 0,01 / 0,1 / 1 nmol/0,2 µl/lado, no CPFmv-PL, reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado ($F_{4,24}=5,389$, $P < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($n = 5-7$, Dunnett). A dose de 0,001 nmol/0,2 µl/lado não foi diferente do grupo tratado com veículo (Dunnett, $P>0,05$).

Figura 12. Efeito da administração de URB597, nas doses de 0,001, 0,01, 0,1 e 1 nmol/0,2 µl/lado, intra-CPFmv (5-7 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado. Os dados são representados pela média ± EPM. *Indica $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett).

4.10 Experimento 9: efeito da coadministração de SB366791 e URB597 no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado

Como mostra a figura 13, na análise de ANOVA de duas vias foi observado efeito da primeira injeção ($F_{1,26}=5,308$, $P < 0,05$) e da segunda injeção ($F_{1,26}=5,127$, $P < 0,05$). Porém, não ocorreu interação entre as injeções de SB266791 e URB597 ($F_{1,26}=1,175$, $P > 0,05$). ANOVA de uma via seguido por Tukey indica que ocorreu somação de efeito entre o SB366791 e o URB597, intra-CPFmv-PL, uma vez que o grupo cotratado apresentou menor tempo de imobilidade em relação ao grupo controle ($F_{3,26}=3,989$, $P < 0,05$) e os grupos que receberam apenas uma injeção não foram diferentes nem do controle e nem do grupo cotratado.

Figura 13. Efeito da coadministração de SB366791, na dose de 1 nmol/0,2 µl, e URB597, na dose de 0,001 nmol/0,2 µl, intra-CPFmv-PL, no tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado (7-8 por grupo). Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. *Indica $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias com pós-teste ANOVA de uma via seguido de Tukey).

4.11 Experimento 10: efeito da administração de URB597 (0,25 e 0,5 nmol/lado) no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do campo aberto

Como mostra a figura 14, não ocorreu alteração na atividade locomotora entre os animais tratados com URB597 (0,001 – 0,01 – 0,1 – 1 nmol/0,2 µl/lado) e veículo em nenhuma das doses testadas ($F_{4,112}=1,100$; $p>0,05$). Além disso, não foi observada interação entre o efeito do tempo e o tratamento ($F_{16,112}=0,6138$; $p>0,05$).

Figura 14. Efeito da administração de URB597 (0,001, 0,01, 0,1 e 1 nmol) intra-CPFmv-PL, sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto. Dados representam a média $\pm$ EPM. (6-8 animais por grupo) (ANOVA de medidas repetidas, $p > 0.05$ para efeito do tratamento).

4.12 Experimento 11: participação de receptores CB1 nos efeitos induzidos pela administração de AA-5HT no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado

ANOVA de duas vias indicou que não houve efeito da primeira injeção ($F_{1,24}=0,7323$, $P>0,05$) mas houve efeito da segunda injeção ($F_{1,24}=8,757$, $P<0,05$). Porém, não ocorreu interação entre as injeções de AM251 e AA-5HT ($F_{1,24}=1,483$, $P>0,05$). ANOVA de uma via seguido por Tukey indicou que o tratamento com AA-5HT na dose de 0,25 nmol/0,2µl reduziu o tempo de imobilidade quando administrado intra-CPFmv-PL, comparado ao grupo controle ($F_{3,24}=4,225$, $P<0,05$). Por outro lado, o pré-tratamento com AM251(10 pmol), um antagonista de receptores CB1, atenuou o efeito tipo-antidepressivo induzido pela AA-5HT, uma vez que o grupo AM251 + AA-5HT não foi diferente do controle e nem do grupo Veículo + AA-5HT ($n= 5-8$, Dunnet, Figura.15).

Figura 15. Efeito da pré-administração de AM251, na dose de 10 nmol/0,2 µl, seguida por AA-5HT, na dose de 0,25 nmol/0,2 µl, intra-CPFmv, sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado (5-8 por grupo). Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. *Indica $p<0,05$ (ANOVA de duas vias com pós-teste ANOVA de uma via seguido de Dunnet).

4.13 Experimento 12: participação de receptores CB1 nos efeitos induzidos pela administração de SB366791 no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado

Na ANOVA de 2 vias não foi observado efeito da primeira injeção ($F_{1,23}=0,1538$, $P > 0,05$) e foi observado efeito da segunda injeção ($F_{1,23}=15,08$, $P < 0,05$). Porém, não ocorreu interação entre as injeções de AM251 e SB366791 ($F_{1,23}=0,0933$, $P > 0,05$). ANOVA de uma via seguido por Dunnet confirmou esses dados indicando que o tratamento com veículo + SB366791 (10 nmol/0,2µl) reduziu o tempo de imobilidade, em comparação ao grupo controle e que o cotratamento com AM251 (10 nmol/0,2µl) não afetou essa resposta ($F_{3,23}=5,468$, $P < 0,05$; Dunnets $P<0,05$ comparado ao controle - Figura.16).

Figura 16. Efeito da pré-administração de AM251, na dose de 10 nmol/0,2 µl, seguida por SB366791, na dose de 10 nmol/0,2µl, intra-CPFmv-PL, sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado (5-8 por grupo). Os dados são representados pela média +/- EPM *Indica $p<0,05$ (ANOVA de duas vias com pós-teste ANOVA de uma via seguido de Dunnet).

4.14 Experimento 13: efeito da administração de LY235959 (1, 3 e 10 nmol/lado) no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado

Como mostra a figura 17, a administração de LY235959 nas doses de 3 e 10 nmol/0,2 µl/lado no CPFmv-PL, reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado ($F_{3,27}=3,547$, $P < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($n = 7-8$, Dunnett). A dose de 1 nmol/0,2 µl/lado não foi diferente do grupo tratado com veículo (Dunnett, $P>0,05$).

Figura 17. Efeito da administração de LY235959, nas doses de 1, 3 e 10 nmol/0,2 µl/lado, intra-CPFmv (7-8 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. *Indica $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett).

4.15 Experimento 14: efeito da administração de NPA (0,001 e 0,01 nmol/lado) no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado

Como mostra a figura 18, a administração de NPA na dose de 0,01 nmol/0,2 µl/lado no CPFmv-PL reduziu o tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle ($F_{2,29}=4,202$, $P < 0,05$; Dunnett's $P<0,05$; $n = 10-11$). A dose de 0,001 nmol/0,2 µl/lado não foi diferente do grupo tratado com veículo (Dunnett's $P>0,05$).

Figura 18. Efeito da administração de NPA, nas doses de 0,001 e 0,01 nmol/0,2 µl/lado, intra-CPFmv (10-11 animais por grupo), sobre o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. *Indica $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett).

4.16 Experimento 15: efeito da coadministração de LY235959 e AEA 0,25 pmol/lado no CPFmv-PL em animais submetidos ao teste do nado forçado

Como mostra a figura 19, na análise de ANOVA de duas vias foi observado efeito da primeira injeção ($F_{1,31}=5,006$, $P < 0,05$) e da segunda injeção ($F_{1,31}=6,633$, $P < 0,05$). Porém, não ocorreu interação entre as injeções de LY235959 e AEA ($F_{1,31}=0,3214$, $P > 0,05$). ANOVA de uma via seguido por Tukey indicou somação de efeito entre o LY235959 e a AEA, intra-CPFmv-PL, uma vez que o grupo cotratado apresentou menor tempo de imobilidade em relação ao grupo controle ($F_{3,31}=4,329$, $P < 0,05$). Os grupos que receberam apenas uma das drogas não foram significativamente diferentes nem do controle e nem do grupo cotratado.

Figura 19. Efeito da coadministração de LY235959, na dose de 1 nmol/0,2 μ l, e AEA, na dose de 0,25 pmol/0,2 μ l, intra-CPFmv-PL, no tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado (7-10 por grupo). Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. *Indica $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias com pós-teste ANOVA de uma via seguido de Tukey).

5 DISCUSSÃO

5.1 Participação de receptores CB1 e TRPV1 do CPFmv-PL na modulação da resposta comportamental ao estresse

Nossos resultados demonstraram que a administração de AEA no CPFmv-PL na faixa de doses entre 0,5 e 50 pmol reduziu o tempo de imobilidade em ratos submetidos ao teste do nado forçado, um efeito tipo-antidepressivo. Por outro lado, observou-se perda do efeito quando administradas doses maiores de AEA nessa estrutura. Considerando que não foram observadas alterações locomotoras no teste do campo aberto em nenhuma das doses testadas, esses dados indicam que a AEA induz efeito tipo-antidepressivo com uma curva dose-resposta em U, quando administrada no CPFmv-PL. Além disso, o efeito tipo-antidepressivo da AEA foi prevenido pela pré-administração de AM251, um antagonista para receptores CB1. Por outro lado, a maior dose de AEA, que não induz efeito *per se*, produziu efeito tipo-antidepressivo quando combinada ao bloqueio de receptores TRPV1, por meio do pré-tratamento com SB366791. Em conjunto, esses resultados sugerem que o efeito tipo-antidepressivo induzido pela AEA quando administrada no CPFmv-PL seria dependente da ativação de receptores CB1, enquanto que a perda de efeito observada após a administração de doses maiores de AEA estaria relacionada à ativação de receptores TRPV1 locais.

Corroborando os dados anteriores, observamos que a administração intra-CPFmv-PL de um bloqueador dual da enzima FAAH e de receptores TRPV1 (AA-5HT), induziu efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado. Além disso, a administração do inibidor da FAAH (URB597) e do antagonista de receptores TRPV1 (SB366791), em grupos independentes de animais, também reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Ademais, a coadministração de doses subefetivas de URB597 e SB366791 reduziu o tempo de imobilidade no mesmo

teste comportamental, evidenciando somação de efeito do bloqueio combinado da FAAH com receptores TRPV1. Considerando que o pré-tratamento com antagonista CB1 (AM251) atenuou, mas não aboliu, o efeito induzido pela AA-5HT, o efeito dessa droga deve estar relacionado à ativação de CB1 como consequência do aumento dos níveis de AEA decorrente da inibição da FAAH.

Alternativamente, o efeito tipo-antidepressivo induzido pelo bloqueio com SB366791 poderia ter sido por aumentar a disponibilidade de AEA para receptores CB1, já que os receptores TRPV1 estariam ocupados pela droga. Para testar essa hipótese, realizamos a administração combinada de antagonista CB1 (com AM251) e TRPV1 (com SB366791). No entanto, observamos que o pré-tratamento com AM251 não foi capaz de prevenir o efeito tipo-antidepressivo induzido pelo SB366791, o que sugere que o mecanismo que mediaría o efeito do SB366791 seria o bloqueio direto dos receptores TRPV1 e não um efeito secundário decorrente do deslocamento da AEA endógena para os receptores CB1.

Em conjunto, esses resultados indicam que tanto a facilitação da neurotransmissão mediada por CB1R quanto o bloqueio de TRPV1R no CPFmv-PL são importantes para o efeito tipo-antidepressivo induzido pela AA-5HT, quando administrada nessa mesma estrutura. Portanto, os dados sugerem que ambos os receptores corticais são importantes na modulação de respostas comportamentais ao estresse e, possivelmente, na neurobiologia da depressão, porém de maneiras opostas.

Nossos dados estão de acordo com trabalho que demonstra que a administração de agonista CB1R diretamente no CPFm-PL induz efeito tipo-antidepressivo (BAMBICO et al., 2007). O efeito do bloqueio de TRPV1 no CPFm-PL no TNF ainda não havia sido demonstrado, no entanto nossos dados corroboram

evidências de que a administração sistêmica de antagonista desses receptores induz efeitos tipo-antidepressivo (MANNA; UMATHE, 2012), apontando o CPFmv-PL como importante sítio de ação para essas drogas.

Como apresentado na introdução do presente trabalho, diversos estudos sugerem que o sistema endocanabinóide desempenha um importante papel regulador na resposta ao estresse. Evidências apontam para o sistema endocanabinóide como um sistema neuroprotetor que é ativado durante eventos neurotóxicos para minimizar os danos (HANSEN et al., 1998, 2001; MARSICANO, 2003; ZOPPI et al, 2011). Nesse sentido, Zoppi e colaboradores (2011), mostram que a deleção genética de receptores CB1 promove uma desregulação do eixo HPA, com efeitos tóxicos do glutamato exacerbados (ZOPPI et al 2011). Além disso, animais knockout para CB1R manifestam aumento da imobilidade no teste do nado forçado e são mais susceptíveis aos efeitos anedônicos do estresse crônico (MARTIN et al., 2002).

A exposição a evento estressante diminui o conteúdo de AEA em estruturas como a amígdala, hipocampo e CPFmv (DUBREUCQ et al., 2012; MCLAUGHLIN et al., 2012; GRAY et al., 2016), enquanto que a facilitação do sistema endocanabinóide, pela administração sistêmica ou intracerebroventricular de agonista CB1, de inibidor da FAAH e de inibidor do transportador de AEA, promove efeito tipo-antidepressivo em modelos animais (GOBBI et al., 2005; HILL; GORZALKA, 2005a; BAMBICO et al., 2007, 2010; ADAMCZYK; MCCREARY; FILIP, 2008; UMATHE; MANNA; JAIN, 2011).

Embora outras estruturas também participem desse efeito, o córtex pré-frontal parece desempenhar importante papel nessa resposta. Estudos em humanos também mostram alterada expressão de receptores CB1 no CPF de vítimas de

suicídio que sofriam de depressão, o que pode indicar uma resposta adaptativa a diminuídos níveis de endocanabinóides (HUNGUND et al., 2004). Além disso, estudo da área básica com microinfusão local no CPF de agonista CB1R promove efeito tipo-antidepressivo similar ao da administração sistêmica. Por exemplo, Bambico e colaboradores (2007) demonstraram que a administração do agonista CB1R, WIN55,212-2, diretamente no CPFmv, promove efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado com curva dose-resposta em U (BAMBICO et al., 2007). Além disso, o efeito tipo-antidepressivo do canabidiol quando administrado no CPFmv, é dependente da ativação de receptores CB1 nesta estrutura (SARTIM; GUIMARÃES; JOCA, 2016). Reforçando estes dados, Gobbi e colaboradores (2005) demonstraram que a facilitação farmacológica da sinalização da AEA, através da administração do inibidor da FAAH (URB597), induz efeito tipo-antidepressivo no TNF associado ao aumento dos níveis de AEA, mas não de 2-AG, e de serotonina no CPF (GOBBI et al., 2005). Corroborando esses achados, a exposição ao estresse da natação forçada diminui os níveis de AEA no CPFm (MCLAUGHLIN et al., 2012), o que explicaria o efeito antidepressivo de drogas que aumentam a AEA endógena e facilitam a sinalização mediada por CB1R nessa estrutura.

Estudos com animais expostos a estresse dão sustentação a essa hipótese. Por exemplo, a exposição ao modelo do estresse crônico variado por 21 dias reduz o conteúdo de AEA nesta estrutura, sem alterar 2-AG (HILL et al., 2008a). Hill e colaboradores (2011) mostraram, ainda, que a deleção genética de CB1R está associada à diminuída arborização dendrítica em neurônios piramidais do CPFmv-PL (HILL; HILLARD; MCEWEN, 2011). Este dado reforça a importância do sistema endocanabinóide do CPFmv na resposta ao estresse, uma vez que alterações dendríticas semelhantes são encontradas em animais selvagens expostos a

estresse crônico (HILL; HILLARD; MCEWEN, 2011). Corroborando esses dados, ainda, há evidências de que o tratamento crônico com antidepressivos (desipramina, tranilcipromina) pode facilitar a neurotransmissão mediada por CB1 no CPF, tendo sido observado aumento na expressão de CB1R nessa estrutura em resposta ao tratamento crônico com essas drogas. (HILL et al., 2006, 2008b).

Por outro lado, Zoppi e colaboradores (2011) demonstraram que a exposição ao estresse de restrição por 4 dias aumenta a expressão de RNAm e proteína para CB1R no CPF, sendo que o pré-tratamento com o agonista CB1R (ACEA) previne as alterações bioquímicas induzidas pelo estresse. O aumento da expressão de CB1R pode representar um mecanismo compensatório em resposta à massiva liberação de glutamato induzida pelo estresse na tentativa de diminuir os danos celulares causados (ZOPPI et al, 2011). Dessa forma, pode-se sugerir que o estresse desencadeie prejuízos na sinalização mediada por CB1R no CPFmv, o que facilitaria o desenvolvimento das consequências comportamentais em animais, e da depressão em humanos. Nesse contexto, o aumento da disponibilidade de AEA e ativação de CB1R no CPFmv atenua o desenvolvimento das consequências comportamentais induzidas pelo estresse e induz efeito tipo-antidepressivo.

Desse modo, testamos os efeitos do inibidor da FAAH, URB597, quando administrado no CPFmv-PL de animais submetidos ao teste do nado forçado. Nossos resultados demonstram que a inibição da degradação da AEA, induz efeito tipo-antidepressivo. Estes resultados estão de acordo com dados prévios da literatura sugerindo que a FAAH cortical esteja hiperexpressa na depressão. Nesse sentido, Vinod e colaboradores (2012), mostraram que animais da linhagem Wistar Kyoto (WKY), os quais apresentam naturalmente comportamentos associados à depressão (*depressive-like* (LAHMANIE; ARMARIO, 1996), possuem níveis

aumentados da enzima FAAH e baixos níveis de AEA no córtex frontal (VINOD et al., 2012). Além disso, a inibição farmacológica da FAAH promoveu efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado nesses animais (VINOD et al., 2012), indicando que a restauração dos níveis de AEA promoveria efeito antidepressivo nesses animais. Reforçando esses achados, a administração sistêmica de URB597, outro inibidor da FAAH, também promoveu efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado (GOBBI et al., 2005; ADAMCZYK; MCCREARY; FILIP, 2008) relacionado ao aumento nos níveis de AEA no CPFmv. Esses dados, associados aos resultados do presente trabalho com a administração de URB597, indicam que a atividade da FAAH no CPFmv é um importante mecanismo pelo qual a disponibilidade de AEA endógena é regulada para modular a resposta emocional ao estresse. Essa hipótese é embasada, ainda, por dados da literatura que mostram uma correlação entre a diminuição dos níveis de AEA, com aumento da atividade da FAAH no CPFm de animais estressados (RADEMACHER et al., 2008; MCLAUGHLIN et al., 2012). Portanto, os resultados do presente trabalho corroboram os dados discutidos acima, indicando que o aumento da disponibilidade de AEA endógena no CPFmv-PL, bem como a ativação de CB1, promove efeito tipo-antidepressivo.

Interessantemente, agonistas de receptores CB1 promovem perfil de resposta bifásica em humanos e animais. Nesse sentido, usuários recreacionais de *Cannabis sativa* relatam sentimento de recompensa, assim como sociabilidade e relaxamento (HALL; SOLOWIJ, 1998). Por outro lado, o consumo de Cannabis pode induzir estados aversivos em alguns fumantes, precipitando estados de pânico e ansiedade (HALL; SOLOWIJ, 1998). Essa resposta bidirecional também é observada em estudos pré-clínicos de ansiedade e depressão, com doses menores promovendo

efeitos ansiolíticos/antidepressivos e inversão de efeito ou nenhum efeito com doses maiores (BAMBICO et al., 2007; MOREIRA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2007; RUBINO et al., 2008b; MICALE et al., 2009). Nossos resultados corroboram esses dados, uma vez que a administração de AEA no CPFm-PL promoveu efeitos dependentes da dose, sendo que as menores doses testadas promoveram efeito tipo-antidepressivo (0,5 – 5 – 50 pmol) e a maior dose (250 pmol) foi ineficaz quando comparado ao grupo controle.

Receptores TRPV1 podem estar envolvidos nesse efeito bifásico induzido por AEA. Estudos mostram que a AEA, assim como agonistas exógenos de CB1R, são capazes de ativar receptores TRPV1, além de CB1R, e que alguns efeitos decorrentes da administração, central ou periférica em roedores, são relacionados também à ativação de receptores TRPV1 (PANLILIO et al., 2009; CASAROTTO et al., 2012; HAKIMIZADEH et al, 2012; LISBOA; GUIMARÃES, 2012). De fato, Rubino e colaboradores (2008) também demonstraram que a administração de meta-anandamida, um análogo da AEA, diretamente no CPFmv, promove efeito ansiolítico ou ansiogênico, dependendo da dose, com o envolvimento de receptores CB1 e TRPV1, respectivamente (RUBINO et al., 2008b). Esses dados sugerem que ambos os receptores, CB1 e TRPV1, do CPFmv sejam importantes na modulação para o efeito da meta-anandamida em testes preditivos de efeitos ansiolíticos. Porém, até o momento, não se sabia se esses receptores, localizados no CPFmv-PL, também estariam envolvidos na resposta emocional ao teste do nado forçado.

Com objetivo de compreender melhor o envolvimento dos CB1R e TRPV1R na resposta bifásica da AEA no TNF, observamos que o efeito tipo-antidepressivo da AEA intra-PL, foi dependente da ativação de receptores CB1, mas receptores TRPV1 parecem não participar dessa resposta uma vez que a pré-administração de

antagonista CB1R preveniu o efeito da AEA, mas a pré-administração de antagonista TRPV1R não influenciou na resposta. Por outro lado, a perda de efeito observada após administração da maior dose de AEA (250 pmol) depende da ativação de TRPV1R, mas não de CB1R. Interessantemente, o pré-tratamento com antagonista TRPV1R seguido pela dose de 250 pmol de AEA promoveu efeito tipo-antidepressivo, que não era observado com a administração única da AEA. A exata razão para a resposta bifásica da AEA ainda não é clara, mas poderia estar relacionada com o fato de a afinidade da AEA ser maior por CB1 do que TRPV1, justificando o envolvimento de TRPV1 apenas em altas doses. (ROSS, 2003).

Os dados obtidos com a AEA nos permitem discutir que na dose de 250 pmol ocorra a ativação de ambos os receptores (CB1 e TRPV1), embora prevaleça o efeito sobre TRPV1R. Reforçando essa hipótese, observamos que o bloqueio de TRPV1R fez com que a dose alta de AEA (250 pmol), anteriormente inefetiva, apresentasse efeito tipo-antidepressivo, de maneira semelhante ao de doses mais baixas de AEA. Dados histológicos dão sustentação neuroanatômica para esses achados, uma vez que estudos revelam que CB1 e TRPV1 são coexpressos tanto no mesmo neurônio quanto na mesma sinapse (CRISTINO; STAROWICZ; PETROCELLIS, 2008; MICALE et al., 2009).

No entanto, nossos resultados mostram ainda que, diferentemente da AEA exógena, o inibidor da metabolização da AEA endógena (URB597) não perdeu o efeito quando administrado em doses maiores. Esse resultado é consistente com dados anteriores da literatura, onde a administração sistêmica de URB597 promove efeito tipo-antidepressivo com curva dose-resposta sigmoide clássica (GOBBI et al., 2005). Apesar de a faixa de dose testada ter sido ampla (0,001 nmol a 1 nmol), também não podemos deixar de considerar que a perda de efeito não foi observada

por uma limitação de doses investigadas. Porém, esse resultado pode indicar que a liberação de AEA endógena durante a situação do estresse do nado forçado não é suficiente para ativar receptores TRPV1, o que aumenta o interesse terapêutico por fármacos que modulem a sinalização endocanabinóide dependente da produção endógena de AEA.

Dados recentes da literatura indicam um importante envolvimento dos TRPV1R na depressão e na resposta ao estresse (MANNA; UMATHE, 2012; YOU et al., 2012; NAVARRIA et al., 2014). Nesse sentido, Navarria e colaboradores (2014) observaram que a exposição de ratos ao estresse de restrição aumenta a expressão de RNA mensageiro e proteínas de receptores TRPV1 e da enzima FAAH no hipocampo, sugerindo que o estresse facilitaria a atividade do sistema vanilóide enquanto diminuiria a do sistema endocanabinóide, diminuindo a disponibilidade de AEA endógena (NAVARRIA et al., 2014). Reforçando a hipótese de favorecimento da neurotransmissão mediada por TRPV1 no estresse, Manna e Umathe (2012) observaram que a administração intra-cerebroventricular (i.c.v.) de capsazepina, um antagonista de receptores TRPV1, promove efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado (MANNA; UMATHE, 2012). Nesse mesmo sentido, a deleção genética de receptores TRPV1 promove efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado e no teste da alimentação suprimida pela novidade (YOU et al., 2012). Além disso, o bloqueio de receptores TRPV1 parece favorecer o efeito tipo-antidepressivo da fluoxetina, quando administrada em camundongos submetidos ao teste do nado forçado, uma vez que a coadministração de doses subefetivas de fluoxetina e um antagonista de receptores TRPV1 promoveu efeito tipo-antidepressivo (MANNA; UMATHE, 2012). Dessa forma, parece que a facilitação da neurotransmissão vanilóide está relacionada ao desenvolvimento das consequências comportamentais

ao estresse, enquanto que a sua diminuição promove efeito antidepressivo e facilita a ação de drogas antidepressivas já utilizadas na clínica.

Corroborando a hipótese acima, observamos que a administração do antagonista TRPV1 SB366791, diretamente no CPFmv-PL, na dose de 10 nmol, induziu efeito tipo-antidepressivo no TNF. Devido à habilidade da AEA endógena em ativar receptores CB1 e TRPV1 com diferentes afinidades (ROSS, 2003) e ao envolvimento de TRPV1R na resposta bifásica da AEA intra-PL, avaliamos também se o efeito tipo-antidepressivo do SB366791 intra-PL seria decorrente do bloqueio direto de TRPV1 ou secundário ao deslocamento da AEA endógena para receptores CB1. Nesse sentido, a pré-administração de um antagonista de receptores CB1 seguida pelo SB366791 não alterou o efeito deste último no teste do nado forçado, sugerindo que o bloqueio direto de TRPV1R seja o responsável pelo efeito tipo-antidepressivo induzido pelo SB366791.

Considerando os efeitos opostos mediados por receptores CB1 e TRPV1, uma estratégia interessante para potenciação de efeito seria a utilização de drogas que bloqueassem de maneira dual a FAAH e a ativação dos receptores TRPV1, aumentando a disponibilidade endógena de AEA e direcionando as suas ações para a ativação de CB1. Nesse sentido e reforçando a participação de TRPV1R na resposta adaptativa ao estresse, a administração de AA-5HT intra-CPFmv-PL, um bloqueador dual da FAAH e de receptores TRPV1, também foi capaz de induzir efeito tipo-antidepressivo quando administrado no CPFmv-PL. Como esperado e diferentemente da AEA, o efeito tipo-antidepressivo da AA-5HT não foi dependente da dose. As doses de 0,25 pmol e de 0,5 pmol intra-CPFmv induziram efeito no teste do nado forçado, sugerindo que o bloqueio de TRPV1 facilita a resposta tipo-antidepressiva. Outro grupo de pesquisa encontrou um resultado diferente. Kirkedal

e colaboradores (2016) observaram uma resposta tipo-antidepressiva em forma de U para a AA-5HT, quando administrada intra-CPFmv de ratos submetidos ao teste do nado forçado (KIRKEDAL et al, 2016). Considerando este resultado isoladamente, poderia-se sugerir que a perda de efeito observada após a administração de maiores doses de substâncias canabinóides não seria devido à ativação de TRPV1R. Essa diferença de resultado pode ser decorrente da espécie animal utilizada, doses ou diferenças de protocolo. Apesar disso, nossos resultados subsequentes reforçam a hipótese de que o bloqueio de TRPV1 participe do efeito tipo-antidepressivo da AA-5HT, dado que o bloqueio de CB1R com AM251 não aboliu completamente o efeito tipo-antidepressivo da AA-5HT. Além disso, a coadministração de doses subefetivas de antagonista TRPV1 (SB366791) e inibidor da FAAH (URB597) induziu efeito tipo-antidepressivo no TNF. Esses resultados sugerem que o efeito tipo-antidepressivo da AA-5HT também dependa do antagonismo de receptores TRPV1 corticais, além da ativação de CB1R.

Em conjunto, os resultados discutidos até aqui indicam o envolvimento de receptores CB1 e TRPV1 corticais na modulação da resposta emocional ao estresse, porém de maneiras opostas.

5.2 Interação entre os sistemas endocanabinóide e glutamatérgico do CPFmv-PL na modulação da resposta comportamental ao estresse

Como exposto na introdução, o sistema endocanabinóide atua como um mecanismo retrógrado que promove o balanço entre sinapses excitatórias e inibitórias no CPFmv (YOSHINO et al., 2011). Isso se deve ao fato de que receptores CB1 são localizados tanto em neurônios piramidais glutamatérgicos quanto em interneurônios gabaérgicos (KATONA; FREUND, 2012). Apesar de receptores CB1 serem mais

expressos em neurônios gabaérgicos do que glutamatérgicos (MARSICANO; LUTZ, 1999), a sinalização canabinóide mediada por CB1 em neurônios glutamatérgicos tem sido associada a várias respostas fisiológicas e efeito de drogas. Nesse sentido, a sinalização mediada por CB1 em neurônios glutamatérgicos parece ser responsável pelos efeitos comportamentais do Δ^9 -THC (MONORY et al, 2007), bem como protege contra a toxicidade relacionada a convulsões (MARSICANO, 2003). Especificamente no córtex pré-frontal, parece que a modulação da neurotransmissão glutamatérgica mediada por CB1 é especialmente relevante. Nesse sentido, dados eletrofisiológicos mostram que a administração de agonista de receptores CB1 em fatias de córtex frontal de ratos diminui a amplitude da corrente pós-sináptica excitatória mediada por NMDA em células piramidais do córtex frontal (HILL et al., 2007; LI et al., 2010), indicando que a ativação de CB1 atenua a liberação de glutamato e subsequente ativação de receptores NMDA.

Estudos de manipulação genética indicam que animais KO para CB1 em neurônios glutamatérgicos corticais possuem um fenótipo tipo-ansiossivo e níveis de corticosterona aumentados em resposta ao estresse da natação forçada (STEINER et al., 2008; JACOB et al., 2009; LAFENÊTRE; CHAOULOFF; MARSICANO, 2009). Além disso, Zoppi e colaboradores (2011) mostraram que a exposição a 4 dias de estresse de restrição aumenta a expressão de proteína e RNAm para CB1R no CPF, por um mecanismo dependente de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (ZOPPI et al, 2011). Em conjunto, esses dados indicam que a inibição da liberação de glutamato subsequente à ativação de CB1 no CPF atenuaria o desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse.

Portanto, nós investigamos a hipótese de que as drogas que facilitam a ativação de CB1 testadas no presente trabalho, como a AEA, exerceriam seus

efeitos comportamentais no teste do nado forçado através da diminuição da transmissão glutamatérgica cortical mediada por NMDA. Inicialmente, demonstramos que a administração de antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, LY235959, e de inibidor da nNOS, NPA, induziu efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado quando administrados intra-CPFmv-PL. Esses dados confirmam dados anteriores do grupo (PEREIRA et al., 2015) e corroboram a participação de receptores NMDA e de NO do CPFmv-PL na modulação da resposta comportamental ao estresse de nado forçado.

Em seguida, buscamos compreender melhor a participação da modulação glutamatérgica cortical no efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração de AEA no CPFm-PL. A coadministração de doses subefetivas do antagonista NMDA (LY366791) e da AEA, intra-CPFmv-PL, induziu efeito tipo-antidepressivo no TNF, mostrando somação no efeito das drogas. Esses dados indicam que o bloqueio de receptores NMDA facilitou o efeito farmacológico induzido pela administração de AEA no CPFm-PL, sugerindo que o efeito tipo-antidepressivo da AEA possa envolver a diminuição da neurotransmissão glutamatérgica cortical mediada por NMDA. Esse resultado está em conformidade com as evidências científicas discutidas acima, indicando que a ativação de CB1R reduz a neurotransmissão excitatória cortical (HILL et al., 2007; LI et al., 2010).

Além disso, esses resultados estão de acordo com o princípio de que a hiperativação de NMDAR cortical favorece o desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse, enquanto que o bloqueio desses receptores induz efeito tipo-antidepressivo (TOKITA; YAMAJI; HASHIMOTO, 2012). Nesse sentido, estudos *post mortem* apontam para uma hiperatividade da neurotransmissão glutamatérgica no CPF em pacientes vítimas de suicídio que sofriam de depressão

(PAUL; SKOLNICK, 2003). Além disso, estudos clínicos correlacionam alterações no volume de estruturas límbicas de pacientes deprimidos com o aumento local da neurotransmissão glutamatérgica (MCEWEN, 2001; SHANSKY et al., 2009). De maneira semelhante, animais estressados apresentam níveis elevados de glutamato no CPF e aumento da neurotransmissão mediada por receptores NMDA (MOGHADDAM, 1993).

Por outro lado, a diminuição da neurotransmissão glutamatérgica parece favorecer o efeito antidepressivo de drogas. Antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA produzem efeito antidepressivo quando administrados sistemicamente em humanos e roedores (KRYSTAL et al., 1994; BERMAN et al., 2000; ZARATE et al., 2006; MAENG et al., 2008; PRESKORN et al., 2008; LI et al., 2010). O CPFm parece desempenhar importante papel nesse efeito visto que o tratamento crônico com drogas antidepressivas atenua a expressão e/ou função de receptores NMDA no CPF e diminui os níveis sinápticos de glutamato (MUSAZZI et al., 2012; NAVA et al., 2015). Além disso, a administração local, no CPFmv, de antagonista NMDA reduz o tempo de imobilidade em ratos submetidos ao teste do nado forçado, um efeito do tipo-antidepressivo (PEREIRA et al., 2015).

A ativação de receptores NMDA é o principal responsável pela produção de NO no SNC (GARTHWAITE et al., 1989). Trabalhos da literatura mostram que a inibição da síntese de NO, assim como o bloqueio de receptores NMDA, promove efeito tipo-antidepressivo em modelos animais envolvendo estresse agudo e crônico (JOCA; GUIMARAES, 2006; MUTLU et al., 2009; JOCA; MOREIRA; WEGENER, 2015). Em particular, a administração intra-CPFmv do inibidor da nNOS (NPA) promove efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado (PEREIRA et al., 2015), assim como observado no presente trabalho.

Diante disso, pode-se especular que o efeito tipo-antidepressivo induzido pela AEA estaria relacionado à atenuação da neurotransmissão mediada por NMDA e consequente diminuição da síntese de NO no CPFm-PL. Reforçando essa ideia, foi relatado que a atividade da NOS está aumentada no córtex de animais KO para CB1R (KIM, 2006), os quais apresentam fenótipo tipo “depressivo” (VALVERDE; TORRENS, 2012).

Recentes estudos têm indicado que os sistemas endocanabinóide e nitrérgico podem interagir durante situações aversivas ou estressantes (LISBOA; GUIMARÃES, 2012b; LISBOA et al., 2014), porém ainda pouco se sabe sobre essa interação nas respostas comportamentais observadas em modelos animais de depressão. Nesse sentido e considerando-se que obtivemos o mesmo perfil de efeito tipo-antidepressivo através da administração de antagonista NMDA (LY235959) e de inibidor da NOS (NPA), podemos sugerir que o efeito tipo-antidepressivo da AEA no teste do nado forçado também envolva a diminuição dos níveis de NO corticais. No entanto, essa hipótese não foi sistematicamente investigada no presente trabalho e são necessários mais estudos para melhor elucidar esse mecanismo.

Além das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica, estudos recentes indicam que o sistema endocanabinóide pode ainda modular a neurotransmissão serotoninérgica. Essa afirmação está baseada em evidências de que agonista CB1R administrado no CPFm estimula a taxa de disparo de neurônios serotoninérgicos do NDR, produzindo aumento de serotonina em regiões de projeção como o CPFm (BAMBICO et al., 2007). Além disso, o efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração do agonista CB1R, WIN55,212-2, no CPFm de animais submetidos ao teste do nado forçado é dependente dos níveis locais de serotonina, uma vez que o

bloqueio das projeções serotoninérgicas da rafe aboliu esse efeito (BAMBICO et al., 2007). Os autores sugerem que esse efeito esteja relacionado à ativação de CB1 em terminais glutamatérgicos, levando à redução da ativação de interneurônios gabaérgicos, o que resultaria na desinibição de vias glutamatérgicas corticais envolvidas no controle da atividade do NDR.

Desse modo, podemos especular que o efeito tipo-antidepressivo final obtido pela administração da AEA intra-CPFmv possa também envolver o aumento do disparo do NDR e da liberação de serotonina no CPFm. De fato, estudo anterior desenvolvido no nosso grupo demonstrou que o efeito tipo-antidepressivo induzido pela AEA intra-CPFmv depende da ativação de receptores 5-HT_{1A} locais, uma vez que esse efeito foi prevenido pela pré-administração de antagonista 5-HT_{1A} (SARTIM; GUIMARÃES; JOCA, 2016). Além disso, estudos eletrofisiológicos mostram que a administração intraperitoneal de agonista CB1 (WIN55,212-2) em baixas doses aumenta a atividade de disparo neuronal serotoninérgico, enquanto que em maiores doses a atividade serotoninérgica fica diminuída (BAMBICO et al., 2007). Esse dado revela um perfil de resposta bifásico sobre a atividade de vias serotoninérgicas, semelhante ao efeito comportamental obtido por Bambico e colaboradores (2007) com a administração de WIN55,212-2 e reproduzido no presente trabalho com a administração de AEA. Além disso, os autores demonstraram, ainda, que a excitabilidade serotoninérgica promovida pela administração de baixas doses de WIN55,212-2 foi bloqueada pelo antagonista CB1, rimonabanto, enquanto que a atenuação da atividade serotoninérgica de doses mais elevadas não foi alterada por essa droga (BAMBICO et al., 2007). Por outro lado, a atenuação do disparo serotoninérgico promovido por maiores doses de WIN55,212-2 foi sensível ao antagonista TRPV1R, capsazepina (BAMBICO et al., 2007). Os

autores sugerem que os receptores CB1 corticais localizados em interneurônios gabaérgicos sejam responsáveis pela redução do controle inibitório sobre neurônios glutamatérgicos, resultando em aumento desta neurotransmissão, que emite projeções para o núcleo dorsal da rafe.

Fazendo uma correlação dos dados discutidos acima e os resultados do presente trabalho podemos especular que o efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração de AEA no CPFm-PL também envolva desinibição do NDR e aumento da liberação de serotonina no CPFm-PL. Nesse contexto, a perda de efeito observada após administração da AEA em doses maiores (250 pmol) seria decorrente da ativação de receptores TRPV1 localizados pós-sinápticamente em interneurônios gabaérgicos, resultando em inibição de vias corticais que controlam a atividade do NDR. Desse modo, haveria a modulação serotoninérgica contrária à ativação de CB1R no CPFmv.

No entanto, outras evidências indicam que a ativação de TRPV1 favorece a ativação de neurônios glutamatérgicos, uma vez que aumenta a corrente pós-sináptica excitatória dependente de glutamato em estruturas cerebrais como o estriado e locus cerúleos (MARINELLI et al., 2002; MUSELLA et al., 2009). Porém, vários trabalhos indicam que a ativação de TRPV1, pela administração do agonista capsaicina, promove efeito neuroprotetor (VELDHUIS et al., 2003; PEGORINI et al., 2005; SAKAMOTO et al., 2014). Considerando-se que dano cerebral, em geral, está relacionado à aumentada neurotransmissão glutamatérgica, esses dados indicam um papel contraditório da modulação glutamatérgica mediada por receptores TRPV1. Nesse sentido, estudo recente aponta que o agonista TRPV1, capsaicina, aplicado em cultura de neurônios corticais, protege os neurônios contra injúria cerebral e reduz o influxo de cálcio induzido por glutamato (HUANG et al., 2017).

Além disso, o tratamento com capsaicina diminui o dano cerebral induzido por modelo animal de isquemia através da diminuição da expressão de receptores NMDA (HUANG et al, 2017). Esses efeitos modulatórios contrários podem ser devido à localização de receptores TRPV1 em diferentes populações neuronais, tanto em terminações glutamatérgicas, onde aumentaria a liberação de glutamato, quanto em interneurônios gabaérgicos, o que promoveria inibição de vias glutamatérgicas corticais. Esses dados indicam a elevada complexidade da neurotransmissão mediada por TRPV1.

Dessa forma, é possível que o efeito tipo-antidepressivo do antagonista TRPV1 (SB366791) intra-CPFmv-PL obtido no presente trabalho seja devido à diminuição da liberação de glutamato, pelo bloqueio de receptores TRPV1 localizados em terminações glutamatérgicas corticais. Nesse sentido, a perda do efeito da AEA, observado após a administração de maiores doses, envolveria a desinibição da liberação de glutamato e consequente ativação de receptores NMDA. Essa hipótese vai de acordo com dados do nosso grupo mostrando que a administração i.c.v. do antagonista TRPV1, capsazepina (CPZ), induz efeito tipo-antidepressivo no TNF. Este efeito parece ser decorrente da diminuição das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica, visto que ocorreu somação de efeito quando da coadministração de doses subefetivas de antagonista NMDA (LY235959) ou inibidor da Nos (NPA) com CPZ (Sartim et al, 2017 - dados não publicados).

De fato, dados da literatura indicam que receptores CB1 e TRPV1 são colocalizados em neurônios do CPF (FOGAÇA et al., 2012). Além disso, há evidências de que a modulação da ativação de NMDAR promovida por TRPV1 esteja envolvida na resposta ao estresse. De fato, Manna e Umathe (2012) observaram que o efeito tipo-antidepressivo do antagonista TRPV1, capsazepina, foi

prevenido pela pré-administração de agonista de receptores NMDA, sugerindo que o efeito tipo-antidepressivo da capsazepina envolva a diminuição da neurotransmissão mediada por NMDA (MANNA; UMATHE, 2012). Além disso, animais KO para TRPV1, que apresentam fenótipo tipo-antidepressivo no teste do nado forçado e no teste da alimentação suprimida pela novidade, também possuem diminuída expressão da subunidade NR2A dos receptores NMDA no hipocampo (YOU et al, 2012).

Além de NMDA, outros trabalhos sugerem que a ativação de TRPV1 também modula a neurotransmissão glutamatérgica dependente de AMPA, uma vez que favorece a internalização destes receptores (CHÁVEZ; CHIU; CASTILLO, 2010; GRUETER; BRASNJO; MALENKA, 2010). Considerando-se que estudos têm mostrado uma correlação entre a ativação de receptores AMPA com efeito antidepressivo (ALT et al., 2006), podemos especular que a perda de efeito da AEA, observada pela administração das maiores doses, além de envolver a facilitação da neurotransmissão mediada por NMDA, também se deva à diminuição da ativação de receptores AMPA. Essa hipótese não foi testada no presente trabalho e são necessários estudos para sua confirmação.

Em conjunto, esses dados demonstram a elevada complexidade da interação entre CB1R, TRPV1 e glutamato no CPFm-PL na modulação da resposta emocional ao estresse de nado forçado.

5.3 Discussão geral

Em conjunto, nossos dados nos permitem especular que os receptores CB1, a anandamida endógena e os receptores TRPV1 corticais formam uma sinalização tríplice que favorece o fino controle da resposta emocional ao estresse. Moreira e

colaboradores (2012) já sugeriram esse balanço fisiológico para respostas de medo e ansiedade (MOREIRA et al., 2012). Em situações fisiológicas normais, ocorreria um equilíbrio entre a inibição e a excitação de circuitos mediadores da resposta ao estresse, através da ativação de CB1R e TRPV1R, respectivamente. Esse sistema funcionando normalmente garante uma resposta fisiológica adequada ao estresse, favorecendo ou inibindo mecanismos centrais como a ativação do eixo HPA ou de vias monoaminérgicas, de acordo com a intensidade do estresse.

Dados do presente trabalho e evidências da literatura permitem sugerir que a ativação de CB1R pré-sináptico no CPFm-PL pela AEA endógena promoveria a diminuição da liberação de glutamato e, favoreceria a adaptação ao estresse. Por outro lado, a ativação de TRPV1 promoveria ativação de terminal pré-sináptico glutamatérgico, com aumento da liberação de glutamato e prejuízos para a adaptação ao estresse. A ativação de TRPV1 também poderia acontecer em neurônios pós-sinápticos seja em interneurônios gabaérgicos ou neurônios glutamatérgicos, favorecendo o desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse. A ativação de TRPV1 também leva à produção de 2-AG (MACCARRONE et al., 2008) a partir do terminal pós-sináptico, que, por sua vez, restringe a liberação de glutamato por atuar em CB1 pré-sináptico. Esse seria um mecanismo fisiológico de controle importante quando há excessiva atividade glutamatérgica, como em situações de estresse intenso.

Diante disso, a redução nos níveis de AEA endógena ou níveis excessivamente elevados poderiam promover o desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse por favorecer a ativação de TRPV1R sobre a ativação CB1R. Assim, a facilitação da neurotransmissão mediada por CB1R, assim como o bloqueio de TRPV1R corticais, favoreceriam a recuperação do

equilíbrio entre CB1 e TRPV1 nesse sistema, promovendo adaptação ao estresse e efeito tipo-antidepressivo. A manipulação de ambos os sistemas parece ser um interessante alvo a ser explorado visando o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de desordens psiquiátricas relacionadas ao estresse, como a depressão.

Figura 20. Representação hipotética para a contribuição oposta dos receptores CB1 e TRPV1 do CPFmv-PL na modulação do comportamento tipo-depressivo no teste do nado forçado. **a)** ativação de receptores CB1 pré-sinápticos (URB597, AA-5HT e baixas doses de AEA) no CPFmv-PL, diminuem a liberação de glutamato e, consequentemente, a despolarização neuronal, promovendo efeito tipo-antidepressivo **b)** altas doses de AEA promove ativação de receptores TRPV1 pré- e pós-sinápticos no CPFmv-PL, consequentemente, prejudicando a resposta tipo-antidepressiva observada pela administração de baixas doses. **c)** bloqueio de receptores TRPV1 (pelo SB366791 e AA-5HT) no CPFmv-PL, impediria a ativação de vias que facilitam o desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse, promovendo efeito tipo-antidepressivo. A ativação de receptores CB1 e TRPV1 localizados em interneurônios gabaérgicos também pode estar envolvida nesse mecanismo.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram que receptores CB1 e TRPV1 do CPFm-PL modulam a resposta comportamental ao estresse de nado forçado de maneiras opostas. Nesse sentido, a facilitação da neurotransmissão mediada por CB1R (pela administração de AEA, URB597 ou AA-5HT) induz efeito tipo-antidepressivo, enquanto que o bloqueio de TRPV1R (pela administração de SB366791 ou AA-5HT) promove o mesmo efeito. Além disso, o efeito tipo-antidepressivo da AEA se deve, provavelmente, à diminuição da neurotransmissão glutamatérgica mediada por NMDAR no CPFm-PL

7 LIMITAÇÕES

- O teste escolhido para a realização dos experimentos, o nado forçado, apresenta limitações, especialmente relacionadas às validades de face e constructo, e recebe críticas quanto a sua utilização para o estudo da neurobiologia da depressão. Por outro lado, trabalho recente demonstrou que o comportamento passivo (imobilidade) no TNF é aumentado pela exposição do animal a diferentes tipos de estressores que respondem ao tratamento antidepressivo (SLATTERY; CRYAN, 2012). Além disso, a manipulação farmacológica de uma mesma região cerebral (inativação do córtex infralímbico) de ratos submetidos ao TNF reproduziu os resultados obtidos pela manipulação em humanos (SLATTERY DA, NEUMANN ID, 2011). Com base nisso, os autores sugerem que, mesmo com as limitações que o modelo apresenta, ele é uma ferramenta útil para se investigar a participação de estruturas límbicas no controle da resposta emocional ao estresse inescapável, bem como na modulação do efeito antidepressivo.

Paralelo a isso, o TNF é de fácil execução e baixo custo, além de possuir elevada validade preditiva. Dessa forma, a utilização desse teste possibilitou que fizéssemos uma abordagem ampla da participação dos receptores CB1 e TRPV1 do CPFmv-PL, que seria dificultada pela utilização de modelos como o desamparo aprendido ou o estresse crônico variado. De fato, a realização de cirurgia estereotáxica, exigida pela proposta do trabalho, inviabiliza a realização de experimentos de grande durabilidade que é o caso dos modelos crônicos ou subcrônicos.

Dessa forma, apesar de apresentar importantes limitações, o TNF também é considerado uma ferramenta experimental importante para o estudo de neurocircuitos envolvidos no desenvolvimento de alterações comportamentais induzidas pelo estresse, as quais podem estar também relacionadas à depressão,

uma vez que são sensíveis ao tratamento com antidepressivos (SLATTERY; CRYAN, 2012).

- Os experimentos foram realizados em apenas um modelo animal. A reprodução dos resultados obtidos no presente trabalho em outro modelo animal de depressão aumentará a relevância dos resultados encontrados.

- Os experimentos realizados foram exclusivamente de análise comportamental. A utilização de técnicas de biologia molecular para avaliar possíveis mudanças que possam estar relacionadas ao comportamento analisado seria de grande interesse. Como exemplo, podemos citar: alterações na expressão e fosforilação de receptores NMDA e da enzima NOS induzidas pelas drogas utilizadas no presente trabalho que alteram a ativação dos sistemas canabinoide e vanilóide.

REFERÊNCIAS

ABEL, E. L.; BILITZKE, P. J. A possible alarm substance in the forced swimming test. **Physiology and Behavior**, v. 48, n. 2, p. 233–239, 1990.

ABELAIRA, H. M.; RÉUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)**, v. 35 Suppl 2, p. S112-20, 2013.

ADAMCZYK, P.; MCCREARY, A. C.; FILIP, M. Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 940, p. 217–228, 2008.

AGUIAR, D. C.; TERZIAN, A. L. B.; GUIMARAES, F. S.; MOREIRA, F. A. Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats. **Psychopharmacology**, v. 205, n. 2, p. 217–225, 2009.

ALT, A.; NISENBAUM, E. S.; BLEAKMAN, D.; WITKIN, J. M. A role for AMPA receptors in mood disorders. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n.9, p. 1273-1288, 2006.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical manual of mental disorders (5th ed)**. American Psychiatric Publishing, 2013.

AZAD, S. C.; KURZ, J.; MARSICANO, G.; LUTZ, B.; ZIEGLGANSBERGER, W.; RAMMES, G. Activation of CB1 specifically located on GABAergic interneurons inhibits LTD in the lateral amygdala. **Learning & Memory**, v. 15, n. 3, p. 143–152, 2008.

BAMBICO, F. R.; CASSANO, T.; DOMINGUEZ-LOPEZ, S.; KATZ, N.; WALKER, C. D.; PIOMELLI, D.; GOBBI, G. Genetic Deletion of Fatty Acid Amide Hydrolase Alters Emotional Behavior and Serotonergic Transmission in the Dorsal Raphe , Prefrontal Cortex , and Hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 10, p. 2083–2100, 2010.

BAMBICO, F. R.; KATZ, N.; DEBONNEL, G.; GOBBI, G. Cannabinoids Elicit Antidepressant-Like Behavior and Activate Serotonergic Neurons through the Medial Prefrontal Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 43, p. 11700–11711, 2007.

BARBON, a; BARLATI, S. Glutamate receptor RNA editing in health and disease. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 76, n. 8, p. 882–9, 2011.

BELDA, X.; FUENTES, S.; DAVIU, N.; NADAL, R.; ARMARIO, A. Stress-induced sensitization: the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and beyond. **Stress**, v. 18, n. 3, p. 269–279, 2015.

BELLOCCHIO, L.; SORIA-GOMEZ, E.; QUARTA, C.; METNA-LAURENT, M.; CARDINAL, P.; BINDER, E.; CANNICH, A.; DELAMARRE, A.; HARING, M.; MARTIN-FONTECHA, M.; VEGA, D.; LESTE-LASSERRE, T.; BARTSCH, D.; MONORY, K.; LUTZ, B.; CHAOULOFF, F.; PAGOTTO, U.; GUZMAN, M.; COTA, D.; MARSICANO, G. Activation of the sympathetic nervous system mediates hypophagic and anxiety-like effects of CB1 receptor blockade. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 12, p. 4786–4791, 2013.

BENEYTO, M., MEADOR-WOODRUFF, J. H. Lamina-specific abnormalities of NMDA receptor-associated postsynaptic protein transcripts in the prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 2175–2186, 2008.

BERMAN, R. M.; CAPPIELLO, a; ANAND, a; OREN, D. a; HENINGER, G. R.; CHARNEY, D. S.; KRYSTAL, J. H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological psychiatry**, v. 47, n. 99, p. 351–354, 2000.

BIVER, F.; GOLDMAN, S.; DELVENNE, V.; LUXEN, A.; DEMAERTELAER, V.; HUBAIN, P.; MENDLEWICZ, J.; LOTSTRA, F. Frontal and Parietal Metabolic Disturbances in Unipolar Depression. **Biological Psychiatry**, v. 36, n. 6, p. 381–388, 1994.

BLIER, P.; ABBOTT, F. V. Putative mechanisms of action of antidepressant drugs in affective and anxiety disorders and pain. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 37–43, 2001.

BRODY, A. L.; SAXENA, S.; MANDELKERN, M. A.; FAIRBANKS, L. A.; HO, M. L.; BAXTER, L. R. Brain metabolic changes associated with symptom factor improvement in major depressive disorder. **Biological Psychiatry**, v. 50, n. 3, p. 171–178, 2001.

BROWN, T. M.; BROTHIE, J. M.; FITZJOHN, S. M. Cannabinoids decrease corticostriatal synaptic transmission via an effect on glutamate uptake. **J Neurosci**, v. 23, n. 35, p. 11073–11077, 2003.

C. KIRKEDAL, G. WEGENER, F. MOREIRA, SR. JOCA, N. L. A dual inhibitor of FAAH and TRPV1 channels shows dose-dependent effect on depression-like behaviour in rats. **Acta Neuropsychiatr**, v. 12, p. 1–6, 2016.

CABRAL, G. A. Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 6, p. 1192–1197, 2005.

CALABRESE, F.; MOLTENI, R.; RACAGNI, G.; RIVA, M. A. Neuronal plasticity: A link between stress and mood disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34 Suppl 1, S208–16, 2009.

CARRIER, E. J. Cultured Rat Microglial Cells Synthesize the Endocannabinoid 2-Arachidonylglycerol, Which Increases Proliferation via a CB2 Receptor-Dependent Mechanism. **Molecular Pharmacology**, v. 65, n. 4, p. 999–1007, 2004.

CASAROTTO, P. C.; TERZIAN, A. L. B.; AGUIAR, D. C.; ZANGROSSI, H.; GUIMARÃES, F. S.; WOTJAK, C. T.; MOREIRA, F. A. Opposing Roles for Cannabinoid Receptor Type-1 (CB1) and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel (TRPV1) on the Modulation of Panic-Like Responses in Rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 2, p. 478–486, 2012.

CASTILLO, P. E.; YOUNTS, T. J.; CHÁVEZ, A. E.; HASHIMOTODANI, Y. Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 70-81, 2012.

CHANDLEY, M. J.; SZE BENI, A.; SZE BENI, K.; CRAWFORD, J. D.; STOCKMEIER, C. a; TURECKI, G.; KOSTRZEWA, R. M.; ORDWAY, G. a. Elevated gene expression of glutamate receptors in noradrenergic neurons from the locus coeruleus in major depression. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 10, p. 1569–78, 2014.

CHÁVEZ, A. E.; CHIU, C. Q.; CASTILLO, P. E. TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 12, p. 1511–1518, 2010.

CHIBA, S.; NUMAKAWA, T.; NINOMIYA, M.; RICHARDS, M. C.; WAKABAYASHI, C.; KUNUGI, H. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 39, n. 1, p. 112–119, 2012.

CHU, J.; ZHENG, H.; ZHANG, Y.; LOH, H. H.; LAW, P. Y. Agonist-dependent ??-opioid receptor signaling can lead to heterologous desensitization. **Cellular Signalling**, v. 22, n. 4, p. 684–696, 2010.

CLAPHAM, D. E.; JULIUS, D.; MONTELL, C.; SCHULTZ, G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 4, p. 427–450, 2005.

COVINGTON, H. E.; LOBO, M. K.; MAZE, I.; VIALOU, V.; HYMAN, J. M.; ZAMAN, S.; LAPLANT, Q.; MOUZON, E.; GHOSE, S.; TAMMINGA, C. A.; NEVE, R. L.; DEISSEROTH, K.; NESTLER, E. J. Antidepressant Effect of Optogenetic Stimulation of the Medial Prefrontal Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 48, p. 16082–16090, 2010.

CRISTINO, L.; STAROWICZ, K.; PETROCELLIS, L. D. E. Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. **Neuroscience**, v. 151, p. 955–968, 2008.

CZÉH, B.; PEREZ-CRUZ, C.; FUCHS, E.; FLÜGGE, G. Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: Does hemisphere location matter? **Behavioural Brain Research**, v. 190, n. 1, p. 1-13, 2008.

DE KLOET, E. R.; OITZL, M. S.; JOËLS, M. Stress and cognition: Are corticosteroids good or bad guys? **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 10, p. 422-6, 1999.

DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 66–72, 1995.

DEVANE, W.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R.; STEVENSON, L.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946–1949, 1992.

DI, S.; MALCHER-LOPES, R.; MARCHESELLI, V. L.; BAZAN, N. G.; TASKER, J. G. Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and γ -aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4292–4301, 2005.

DI MARZO, V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 5, p. 438–455, 2008a.

DI MARZO, V. Endocannabinoids: Synthesis and degradation. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 160, p. 1-24, 2008b.

DI MARZO, V. The endocannabinoid system: Its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. **Pharmacological Research**, v. 60, n. 2, p. 77-84, 2009.

DI MARZO, V.; BISOGNO, T.; DE PETROCELLIS, L. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 7, p. 346-9, 2001.

DÍAZ-LAVIADA, I.; RUIZ-LLORENTE, L. Signal transduction activated by cannabinoid receptors. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 5, n. 7, p. 619–30, 2005.

DOMSCHKE, K.; DANNLOWSKI, U.; OHRMANN, P.; LAWFORD, B.; BAUER, J.; KUGEL, H.; HEINDEL, W.; YOUNG, R.; MORRIS, P.; AROLT, V.; DECKERT, J.; SUSLOW, T.; BAUNE, B. T. Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: Impact on antidepressant treatment response and emotion processing in Major Depression. **European Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 10, p. 751–759, 2008.

DREVETS, W. C. Functional neuroimaging studies of depression: the anatomy of melancholia. **Annual Review of Medicine**, v. 49, p. 341–361, 1998.

DREVETS, W. C.; PRICE, J. L.; FUREY, M. L. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: Implications for neurocircuitry models of depression. **Brain Structure and Function**, v. 213, n. 1–2, p. 93–118, 2008.

DREVETS, W. C.; VIDEEN, T. O.; PRICE, J. L.; PRESKORN, S. H.; CARMICHAEL, S. T.; RAICHLE, M. E. A functional anatomical study of unipolar depression. **Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 3628–3641, 1992.

DUBREUCQ, S.; MATIAS, I.; CARDINAL, P.; HÄRING, M.; LUTZ, B.; MARSICANO, G.; CHAOULOFF, F. Genetic Dissection of the Role of Cannabinoid Type-1 Receptors in the Emotional Consequences of Repeated Social Stress in Mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 8, p. 1885–1900,

E. HAKIMIZADEH, S. ORYAN, A. HAJIZADEH MOGHADDAM, A. SHAMSIZADEH, A. R. Endocannabinoid System and TRPV1 Receptors in the Dorsal Hippocampus of the Rats Modulate Anxiety-like Behaviors. **Iran J Basic Med Sci**, v. 15, n. 3, p. 795–802, 2012.

FAVA, M.; DAVIDSON, K. G. Definition and epidemiology of treatment-resistant depression. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 179–200, 1996.

FAVA, M.; KENDLER, K. S. Major Depressive Disorder. **Neuron**, v. 28, n. 2, p. 335–341, 2000.

FERREIRA-JUNIOR, N. C.; FEDOCE, A. G.; ALVES, F. H. F.; CORREA, F. M. A.; RESSEL, L. B. M. Medial prefrontal cortex endocannabinoid system modulates baroreflex activity through CB1 receptors. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 7, p. R876–R885, 2012.

FOGAÇA, M. V.; AGUIAR, D. C.; MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S. The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 2, p. 202–210, 2012.

FRANK MG, WATKINS LR, M. S. Stress-induced glucocorticoids as a neuroendocrine alarm signal of danger. **Brain Behav Immun**, v. 33, p. 1-6, 2013.

GARTHWAITE, G.; GARTHWAITE, J. Differential dependence on Ca²⁺ of N-methyl-d-aspartate and quisqualate neurotoxicity in young rat hippocampal slices. **Neuroscience Letters**, v. 97, n. 3, p. 316–322, 1989.

GARTHWAITE, J.; GARTHWAITE, G.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **European journal of pharmacology**, v. 172, n. 4–5, p. 413–6, 1989.

GLASS, M. Modulation of neurotransmission by cannabinoids in the basal ganglia. **European Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 2, p. 199-203, 1997.

GOBBI, G.; BAMBICO, F. R.; MANGIERI, R.; BORTOLATO, M.; CAMPOLONGO, P.; SOLINAS, M.; CASSANO, T.; MORGESE, M. G.; DEBONNEL, G.; DURANTI, A.; TONTINI, A.; TARZIA, G.; MOR, M.; TREZZA, V.; GOLDBERG, S. R.; CUOMO, V.; PIOMELLI, D. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 51, p. 18620–18625, 2005.

GORZALKA, B. B.; HILL, M. N.; HILLARD, C. J. Regulation of endocannabinoid signaling by stress: Implications for stress-related affective disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 6, p. 1152-60, 2008.

GRAY, J. M.; WILSON, C. D.; LEE, T. T. Y.; PITTMAN, Q. J.; DEUSSING, J. M.; HILLARD, C. J.; MCEWEN, B. S.; SCHULKIN, J.; KARATSOREOS, I. N.; PATEL, S.; HILL, M. N. Sustained glucocorticoid exposure recruits cortico-limbic CRH signaling to modulate endocannabinoid function. **Psychoneuroendocrinology**, v. 66, p. 151–158, 2016.

GREICIUS, M. D.; FLORES, B. H.; MENON, V.; GLOVER, G. H.; SOLVASON, H. B.; KENNA, H.; REISS, A. L.; SCHATZBERG, A. F. Resting-State Functional Connectivity in Major Depression: Abnormally Increased Contributions from Subgenual Cingulate Cortex and Thalamus. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 5, p. 429–437, 2007.

GROENEWEGEN, H. J.; UYLINGS, H. B. M. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. **Progress in Brain Research**, v. 126, p. 3-28, 2000.

GRUETER, B. A.; BRASNJO, G.; MALENKA, R. C. Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 12, p. 1519–1525, 2010.

HALL, W.; SOLOWIJ, N. Adverse effects of cannabis. **Lancet**, v. 352, n. 9140, p. 1611–1616, 1998.

HAMANI, C.; DIWAN, M.; MACEDO, C. E.; BRANDÃO, M. L.; SHUMAKE, J.; GONZALEZ-LIMA, F.; RAYMOND, R.; LOZANO, A. M.; FLETCHER, P. J.; NOBREGA, J. N. Antidepressant-Like Effects of Medial Prefrontal Cortex Deep Brain Stimulation in Rats. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 2, p. 117–124, 2010.

HANSEN, H. H.; SCHMID, P. C.; BITTIGAU, P.; LASTRES-BECKER, I.; BERRENDERO, F.; MANZANARES, J.; IKONOMIDOU, C.; SCHMID, H. H. O.; JAVIER FERNÁNDEZ-RUIZ, J.; HANSEN, H. S. Anandamide, but not 2-arachidonoylglycerol, accumulates during in vivo neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, n. 6, p. 1415–1427, 2001.

HANSEN, H. S.; LAURITZEN, L.; MOESGAARD, B.; STRAND, A. M.; HANSEN, H. H. Formation of N-acyl-phosphatidylethanolamines and N-acylethanolamines: Proposed role in neurotoxicity. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 719-25, 1998.

HÄRING, M.; GRIEB, M.; MONORY, K.; LUTZ, B.; MOREIRA, F. A. Neuropharmacology Cannabinoid CB 1 receptor in the modulation of stress coping behavior in mice: The role of serotonin and different forebrain neuronal subpopulations. **Neuropharmacology**, n. September, p. 1–7, 2012.

HÄRING, M.; KAISER, N.; MONORY, K.; LUTZ, B. Circuit specific functions of cannabinoid CB1 receptor in the balance of investigatory drive and exploration. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

HÄRING, M.; MARSICANO, G.; LUTZ, B.; MONORY, K. Identification of the cannabinoid receptor type 1 in serotonergic cells of raphe nuclei in mice. **Neuroscience**, v. 146, n. 3, p. 1212–1219, 2007.

HERKENHAM, M. Cannabinoid Receptor Localization in Brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 5, p. 1932-6 1990.

HERMANN, H.; LUTZ, B. Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with the corticotropin-releasing hormone receptor type 1 in distinct regions of the adult mouse forebrain. **Neuroscience Letters**, v. 375, n. 1, p. 13–18, 2005.

HILL, E. L.; GALLOPIN, T.; FEREZOU, I.; CAULI, B.; ROSSIER, J.; SCHWEITZER, P.; LAMBOLEZ, B. Functional CB1 Receptors Are Broadly Expressed in Neocortical GABAergic and Glutamatergic Neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 97, n. 4, p. 2580–2589, 2007.

HILL, M. N.; CARRIER, E. J.; MCLAUGHLIN, R. J.; MORRISH, A. C.; MEIER, S. E.; HILLARD, C. J.; GORZALKA, B. B. Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: Effects of concurrent antidepressant treatment. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, n. 6, p. 2322–2336, 2008a.

HILL, M. N.; FROESE, L. M.; MORRISH, A. C.; SUN, J. C.; FLORESCO, S. B. Alterations in behavioral flexibility by cannabinoid CB1 receptor agonists and antagonists. **Psychopharmacology**, v. 187, n. 2, p. 245–259, 2006.

HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB1 receptor agonist HU -210 following chronic stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 499, n. 3, p. 291–295, 2004.

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

HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. Pharmacological enhancement of cannabinoid CB 1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. **European Neuropsychopharmacology**, v. 15, p. 593–599, 2005b.

HILL, M. N.; HILLARD, C. J.; MCEWEN, B. S. Alterations in corticolimbic dendritic morphology and emotional behavior in cannabinoid CB 1 receptor-deficient mice parallel the effects of chronic stress. **Cerebral Cortex**, v. 21, n. 9, p. 2056–2064, 2011.

HILL, M. N.; HO, W. S.; HILLARD, C. J.; GORZALKA, B. B. Differential effects of the antidepressants tranylcypromine and fluoxetine on limbic cannabinoid receptor binding and endocannabinoid contents. **Journal of Neural Transmission**, v. 115, n. 12, p. 1673–1679, 2008b.

HILL, M. N.; MCEWEN, B. S. Involvement of the Endocannabinoid System in the Neurobehavioral Effects of Stress and Glucocorticoids. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 791–97, 2010.

HILL, M. N.; MILLER, G. E.; HO, W. S. V; GORZALKA, B. B.; HILLARD, C. J. Serum endocannabinoid content is altered in females with depressive disorders: A preliminary report. **Pharmacopsychiatry**, v. 41, n. 2, p. 48–53, 2008c.

HILLHOUSE, T. M.; PORTER, J. H. A brief history of the development of antidepressant drugs: From monoamines to glutamate. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 1–21, 2015.

HOHMANN, A. G.; SUPLITA, R. L.; BOLTON, N. M.; NEELY, M. H.; FEGLEY, D.; MANGIERI, R.; KREY, J. F.; MICHAEL WALKER, J.; HOLMES, P. V.; CRYSTAL, J. D.; DURANTI, A.; TONTINI, A.; MOR, M.; TARZIA, G.; PIOMELLI, D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**, v. 435, n. 7045, p. 1108–1112, 2005.

HONKALAMPI, K.; HINTIKKA, J.; HAATAINEN, K.; KOIVUMAA-HONKANEN, H.; TANSKANEN, A.; VIINAMÄKI, H. Adverse childhood experiences, stressful life events or demographic factors: which are important in women's depression? A 2-year follow-up population study. **The Australian and New Zealand journal of psychiatry**, v. 39, n. 7, p. 627–632, 2005.

HUNGUND, B. L.; VINOD, K. Y.; KASSIR, S. A.; BASAVARAJAPPA, B. S.; YALAMANCHILI, R.; COOPER, T. B.; MANN, J. J.; ARANGO, V. Upregulation of CB1 receptors and agonist-stimulated [35S]GTPγS binding in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. **Molecular Psychiatry**, v. 9, n. 2, p. 184–190, 2004.

IKENOUCHI-SUGITA, A.; YOSHIMURA, R.; HORI, H.; UMENE-NAKANO, W.; UEDA, N.; NAKAMURA, J. Effects of antidepressants on plasma metabolites of nitric oxide in major depressive disorder: comparison between milnacipran and paroxetine. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1451–3, 2009.

JACOB, W.; YASSOURIDIS, A.; MARSICANO, G.; MONORY, K.; LUTZ, B.; WOTJAK, C. T. Endocannabinoids render exploratory behaviour largely independent of the test aversiveness: Role of glutamatergic transmission. **Genes, Brain and Behavior**, v. 8, n. 7, p. 685–698, 2009.

JOCA, S. R.; GUIMARAES, F. S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. **Psychopharmacology**, v. 185, n. 3, p. 298–305, 2006.

JOCA, S. R.; MOREIRA, F. A.; WEGENER, G. Atypical neurotransmitters and the neurobiology of depression. **CNS and Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 14, n. 8, p. 1001–1011, 2015.

JURUENA, M. F. Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. **Epilepsy and Behavior**, v. 38, p. 148-59, 2014.

K. MONORY, H. BLAUDZUN, F. MASSA, N. KAISER, T. LEMBERGER, G. SCHÜTZ, C. W.; B. LUTZ, G. M. Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. **PLoS Biol**, v. 5, n. 10, p. e269, 2007.

KANO, M.; OHNO-SHOSAKU, T.; HASHIMOTODANI, Y.; UCHIGASHIMA, M.; WATANABE, M. Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 1, p. 309–380, 2009.

KAROLEWICZ, B.; PAUL, I. a; ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. Effect of NOS inhibitor on forced swim test and neurotransmitters turnover in the mouse brain. **Polish journal of pharmacology**, v. 53, n. 6, p. 587–96, 2001.

KAROLEWICZ, B.; SZE BENI, K.; GILMORE, T.; MACIAG, D.; STOCKMEIER, C. A.; ORDWAY, G. A. Elevated levels of NR2A and PSD-95 in the lateral amygdala in depression. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 12, n. 2, p. 143, 2009.

KASCKOW JW, MULCHAHEY JJ, G. T. Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, p. 291–295, 2004.

KATONA, I.; FREUND, T. F. Multiple Functions of Endocannabinoid Signaling in the Brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 35, n. 1, p. 529–558, 2012.

KATZ, R. J.; HERSH, S. Amitriptyline and scopolamine in an animal model of depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 5, n. 2, p. 265–271, 1981.

KENDLER; KUHN; PRESCOTT. The interrelationship of neuroticism, sex, and stressful life events in the prediction of episodes of major depression. **Am J Psychiatry**, v. Apr;161(4), p. 631–6, 2004.

KENDLER, K. S.; GARDNER, C. O.; PRESCOTT, C. A. Toward a comprehensive developmental model for major depression in men. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 1, p. 115–124, 2006.

KENDLER, K. S.; KARKOWSKI-SHUMAN, L. Stressful life events and genetic liability to major depression: genetic control of exposure to the environment? **Psychological Medicine**, v. 27, n. 3, p. S0033291797004716, 1997.

KENDLER, K. S.; KARKOWSKI, L. M.; PRESCOTT, C. a. Stressful life events and major depression: risk period, long-term contextual threat, and diagnostic specificity. **The Journal of nervous and mental disease**, v. 186, n. 11, p. 661-9, 1998.

KESSLER, R. C.; BROMET, E. J. The Epidemiology of Depression Across Cultures. **Annual Review of Public Health**, v. 34, n. 1, p. 119–138, 2013.

KEW, J. N.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 179, n. 0033–3158 (Print), p. 4–29, 2005.

KIM, S. H. Role for Neuronal Nitric-Oxide Synthase in Cannabinoid-Induced Neurogenesis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 1, p. 150–154, 2006.

KRETTEK JE, P. J. An autoradiographic study of projections from the amygdaloid complex to the thalamus and cerebral cortex. **Journal Comp Neurol**, v. 172, p. 723–752, 1977.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. Animal models of depression: Molecular perspectives. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 7, n. 1, p. 121–147, 2011.

KRYSTAL KARPER, LP., SEIBYL, JP., FREEMAN, GK., DELANEY, R., BREMNER, JD., HENINGER, GR., BOWERS, MB JR., CHARNEY, DS., J. H. Subanesthetic effects of the NMDA antagonist, ketamine, in humans: psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine effects. **Arch Gen Psychiatry**, v. 51, n. 3, p. 199–214, 1994.

KULISCH, C.; ALBRECHT, D. Effects of single swim stress on changes in TRPV1-mediated plasticity in the amygdala. **Behavioural Brain Research**, v. 236, n. 1, p. 344–349, 2013.

LAFENÊTRE, P.; CHAOULOFF, F.; MARSICANO, G. Bidirectional regulation of novelty-induced behavioral inhibition by the endocannabinoid system. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 7–8, p. 715–721, 2009.

LAHMANIE, A.; ARMARIO, A. Differential responsiveness of inbred strains of rats to antidepressants in the forced swimming test: Are Wistar Kyoto rats an animal model of subsensitivity to antidepressants? **Psychopharmacology**, v. 123, n. 2, p. 191–198, 1996.

LEE, B.-H.; LEE, S.-W.; YOON, D.; LEE, H.-J.; YANG, J.-C.; SHIM, S.-H.; KIM, D.-H.; RYU, S.-H.; HAN, C.; KIM, Y.-K. Increased plasma nitric oxide metabolites in suicide attempters. **Neuropsychobiology**, v. 53, n. 3, p. 127–132, 2006.

LI, Q.; YAN, H.; WILSON, W. A.; SWARTZWELDER, H. S. Modulation of NMDA and AMPA-mediated synaptic transmission by CB1 receptors in frontal cortical pyramidal cells. **Brain Research**, v. 1342, p. 127–137, 2010.

LI, X.; TIZZANO, J. P.; GRIFFEY, K.; CLAY, M.; LINDSTROM, T.; SKOLNICK, P. Antidepressant-like actions of an AMPA receptor potentiator (LY392098). **Neuropharmacology**, v. 40, n. 8, p. 1028–1033, 2001.

LINDHOLM, J. S. O.; AUTIO, H.; VESA, L.; ANTILA, H.; LINDEMANN, L.; HOENER, M. C.; SKOLNICK, P.; RANTAMÄKI, T.; CASTRÉN, E. The antidepressant-like effects of glutamatergic drugs ketamine and AMPA receptor potentiator LY 451646 are preserved in bdnf +/- heterozygous null mice. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 391-7, 2012.

LISBOA, S. F.; BORGES, A. A.; NEJO, P.; FASSINI, A.; GUIMARAES, F. S.; RESSEL, L. B. Cannabinoid CB1 receptors in the dorsal hippocampus and prelimbic medial prefrontal cortex modulate anxiety-like behavior in rats: additional evidence. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 59, p. 76–83, 2015.

LISBOA, S. F.; CAMARGO, L. H. A.; MAGESTO, A. C.; RESSEL, L. B. M.; GUIMARÃES, F. S. Cannabinoid modulation of predator fear: involvement of the dorsolateral periaqueductal gray. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 8, p. 1193–1206, 2014.

LISBOA, S. F.; GUIMARÃES, F. S. Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 8, p. 2455–2462, 2012a.

LISBOA, S. F.; GUIMARÃES, F. S. Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 8, p. 2455–2462, 2012b.

LISBOA, S. F.; REIS, D. G.; LOPES, A.; CORRÊA, F. M. A.; GUIMARÃES, F. S.; RESSEL, B. M.; CORRE, F. M. A. Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. **Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 9, p. 1163-73, 2010.

LUTZ, B.; MARSICANO, G.; MALDONADO, R.; HILLARD, C. J. The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 12, p. 705–718, 2015.

M. HUANG, G. CHENG, H. TAN, R. QIN, Y. ZOU, Y. WANG, Y. Z. Capsaicin protects cortical neurons against ischemia/reperfusion injury via down-regulating NMDA receptors. **Exp Neurol**, v. 4, n. 295, p. 66–76, 2017.

MACCARRONE, M.; ROSSI, S.; BARI, M.; DE CHIARA, V.; FEZZA, F.; MUSELLA, A.; GASPERI, V.; PROSPERETTI, C.; BERNARDI, G.; FINAZZI-AGRÒ, A.; CRAVATT, B. F.; CENTONZE, D. Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 152–159, 2008.

MAENG, S.; ZARATE JR., C. A.; DU, J.; SCHLOESSER, R. J.; MCCAMMON, J.; CHEN, G.; MANJI, H. K. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. **Biological Psychiatry**, v. 63, n. 4, p. 349–352, 2008.

MAIONE, S.; BISOGNO, T.; NOVELLIS, V. De; PALAZZO, E.; CRISTINO, L.; VALENTI, M.; PETROSINO, S.; GUGLIELMOTTI, V.; ROSSI, F. Elevation of Endocannabinoid Levels in the Ventrolateral Periaqueductal Grey through Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase Affects Descending Nociceptive Pathways via Both Cannabinoid Receptor Type 1 and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Re. v. 316, n. 3, p. 969–982, 2006.

MALCHER-LOPES, R.; DI, S.; MARCHESELLI, V. S.; WENG, F.-J.; STUART, C. T.; BAZAN, N. G.; TASKER, J. G. Opposing Crosstalk between Leptin and Glucocorticoids Rapidly Modulates Synaptic Excitation via Endocannabinoid Release. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 24, p. 6643–6650, 2006.

MANNA, S. S. S.; UMATHE, S. N. A possible participation of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the antidepressant effect of fluoxetine. **European Journal of Pharmacology**, v. 685, n. 1–3, p. 81–90, 2012.

MARINELLI, S.; VAUGHAN, C. W.; CHRISTIE, M. J.; CONNOR, M. Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro. **Journal of Physiology-London**, v. 543, n. 2, p. 531–540, 2002.

MARSCH, R.; FOELLER, E.; RAMMES, G.; BUNCK, M.; KOSSL, M.; HOLSBOER, F.; ZIEGLGANSBERGER, W.; LANDGRAF, R.; LUTZ, B.; WOTJAK, C. T. Reduced Anxiety, Conditioned Fear, and Hippocampal Long-Term Potentiation in Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Receptor-Deficient Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 4, p. 832–839, 2007.

MARSICANO, G. CB1 Cannabinoid Receptors and On-Demand Defense Against Excitotoxicity. **Science**, v. 302, n. 5642, p. 84–88, 2003.

MARSICANO, G.; LUTZ, B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. **Eur J Neurosci**, v. 11, n.12, p. 4213–4225, 1999.

MARSICANO, G.; WOTJAK, C. T.; AZAD, S. C.; BISOGNO, T.; RAMMES, G.; CASCIO, M. G.; HERMANN, H.; TANG, J.; HOFMANN, C.; ZIEGLGÄNSBERGER, W.; DI MARZO, V.; LUTZ, B. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. **Nature**, v. 418, n. 6897, p. 530–534, 2002.

MARTIN, M.; LEDENT, C.; PARMENTIER, M.; MALDONADO, R.; VALVERDE, O. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. **Psychopharmacology**, v. 159, n. 4, p. 379–387, 2002.

MATO, S.; CHEVALEYRE, V.; ROBBE, D.; PAZOS, A.; CASTILLO, P.E.; MANZONI, O. . A single in-vivo exposure to Delta9THC blocks endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. **Nature Neuroscience**, v. 7, p. 585–586, 2004.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J.; YOUNG, A. C.; BONNER, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561–564, 1990.

MAYBERG, H. S.; BRANNAN, S. K.; TEKELL, J. L.; SILVA, J. A.; MAHURIN, R. K.; MCGINNIS, S.; JERABEK, P. A. Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. **Biological Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 830–843, 2000.

MAYBERG, H. S.; LIOTTI, M.; BRANNAN, S. K.; MCGINNIS, S.; MAHURIN, R. K.; JERABEK, P. A.; SILVA, J. A.; TEKELL, J. L.; MARTIN, C. C.; LANCASTER, J. L.; FOX, P. T. Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: Converging PET findings in depression and normal sadness. **American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 5, p. 675–682, 1999.

MAYBERG, H. S.; LOZANO, A. M.; VOON, V.; MCNEELY, H. E.; SEMINOWICZ, D.; HAMANI, C.; SCHWALB, J. M.; KENNEDY, S. H. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. **Neuron**, v. 45, n. 5, p. 651–660, 2005.

MCARTHUR, R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 84, n. 3, p. 436–452, 2006.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: From serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, v. 886, n. 1-2, p. 172-189, 2000.

MCEWEN, B. S. Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 933, p. 265–277, 2001.

MCKLVEEN JM, MYERS B, H. J. The medial prefrontal cortex: coordinator of autonomic, neuroendocrine and behavioural responses to stress. **Journal of neuroendocrinology**, v. 27, n. 6, p. 446–56, 2015.

MCLAUGHLIN, R. J.; GOBBI, G. Cannabinoids and emotionality: A neuroanatomical perspective. **Neuroscience**, v. 204, p. 134-44, 2012a.

MCLAUGHLIN, R. J.; GOBBI, G. Review cannabinoids and emotionality: a neuroanatomical perspective. **NSC**, v. 204, p. 134-144, 2012b.

MCLAUGHLIN, R. J.; HILL, M. N.; BAMBICO, F. R.; STUHR, K. L.; GOBBI, G.; HILLARD, C. J.; GORZALKA, B. B. Prefrontal cortical anandamide signaling coordinates coping responses to stress through a serotonergic pathway. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 9, p. 664-671, 2012.

MCLAUGHLIN, R. J.; HILL, M. N.; DANG, S. S.; WAINWRIGHT, S. R.; GALEA, L. A. M.; HILLARD, C. J.; GORZALKA, B. B. Upregulation of CB 1 receptor binding in the ventromedial prefrontal cortex promotes proactive stress-coping strategies following chronic stress exposure. **Behavioural Brain Research**, v. 237, p. 333-337, 2013.

MCLAUGHLIN, R. J.; HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. A critical role for prefrontocortical endocannabinoid signaling in the regulation of stress and emotional behavior. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 42C, p. 116-131, 2014.

MECHOULAM, R.; PARKER, L. A. The Endocannabinoid System and the Brain. **Annual Review of Psychology**, v. 64, n. 1, p. 21-47, 2013.

MEZEY, E.; TOTH, Z. E.; CORTRIGHT, D. N.; ARZUBI, M. K.; KRAUSE, J. E.; ELDE, R.; GUO, A.; BLUMBERG, P. M.; SZALLASI, A. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1- like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3655-3660, 2000.

MICALE, V.; CRISTINO, L.; TAMBURELLA, A.; PETROSINO, S.; LEGGIO, G. M.; DRAGO, F.; DI MARZO, V. Anxiolytic Effects in Mice of a Dual Blocker of Fatty Acid Amide Hydrolase and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channels. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 3, p. 593-606, 2009.

MICALE, V.; DI, V.; SULCOVA, A.; WOTJAK, C. T.; DRAGO, F. Pharmacology & Therapeutics Endocannabinoid system and mood disorders: Priming a target for new therapies. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 138, n. 1, p. 18-37, 2013.

MILLER, W. R.; SELIGMAN, M. E.; KURLANDER, H. M. Learned helplessness, depression, and anxiety. **The Journal of nervous and mental disease**, v. 161, n. 5, p. 347-57, 1975.

MOGHADDAM, B. Stress Preferentially Increases Extraneuronal Levels of Excitatory Amino Acids in the Prefrontal Cortex: Comparison to Hippocampus and Basal Ganglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, n. 5, p. 1650-1657, 1993.

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

MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; TERZIAN, A. L. B.; GUIMARÃES, F. S.; WOTJAK, C. T. Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? **Neuroscience**, v. 204, p. 186-92, 2012.

MOREIRA, F. A.; CRIPPA, J. A. S. The psychiatric side-effects of rimonabant. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 31, n. 2, p. 145–153, 2009.

MOREIRA, F. A.; KAISER, N.; MONORY, K.; LUTZ, B. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 1, p. 141–150, 2008.

MORENA, M.; CAMPOLONGO, P. The endocannabinoid system: An emotional buffer in the modulation of memory function. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 112, p. 30-43, 2014.

MORENA, M.; PATEL, S.; BAINS, J. S.; HILL, M. N. Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 80–102, 2016.

MORGESE, M. G.; CASSANO, T.; CUOMO, V.; GIUFFRIDA, A. Anti-dyskinetic effects of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: Role of CB1 and TRPV1 receptors. **Experimental Neurology**, v. 208, n. 1, p. 110–119, 2007.

MOROZOV, Y. M.; TORII, M.; RAKIC, P. Origin, early commitment, migratory routes, and destination of cannabinoid type 1 receptor-containing interneurons. **Cerebral Cortex**, v. 19, n. SUPPL. 1, p. 78-89, 2009.

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

MUSAZZI, L.; TRECCANI, G.; MALLEI, A.; POPOLI, M. The Action of Antidepressants on the Glutamate System: Regulation of Glutamate Release and Glutamate Receptors. **Biological psychiatry**, p. 1–9, 2012.

MUSELLA, A.; DE CHIARA, V.; ROSSI, S.; PROSPERETTI, C.; BERNARDI, G.; MACCARRONE, M.; CENTONZE, D. TRPV1 channels facilitate glutamate transmission in the striatum. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 40, n. 1, p. 89–97, 2009.

MUTLU, O.; ULAK, G.; LAUGERAY, A.; BELZUNG, C. Effects of neuronal and inducible NOS inhibitor 1-[2-(trifluoromethyl) phenyl] imidazole (TRIM) in unpredictable chronic mild stress procedure in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 92, n. 1, p. 82–87, 2009.

MYERS-SCHULZ, B.; KOENIGS, M. Functional anatomy of ventromedial prefrontal cortex: implications for mood and anxiety disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 17, n. 2, p. 132–141, 2012.

NAVA, N.; TRECCANI, G.; LIEBENBERG, N.; CHEN, F.; POPOLI, M.; WEGENER, G.; NYENGAARD, J. R. Chronic desipramine prevents acute stress-induced reorganization of medial prefrontal cortex architecture by blocking glutamate vesicle accumulation and excitatory synapse increase. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 3, 2015.

NAVARRIA, A.; TAMBURELLA, A.; IANNOTTI, F. A.; MICALÉ, V.; CAMILLIERI, G.; GOZZO, L.; VERDE, R.; IMPERATORE, R.; MARCO, G.; DRAGO, F.; DI, V. The dual blocker of FAAH/TRPV1 N-arachidonoylserotonin reverses the behavioral despair induced by stress in rats and modulates the HPA-axis. **Pharmacological Research**, p. 1–9, 2014.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

OHNO-SHOSAKU, T.; MAEJIMA, T.; KANO, M. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. **Neuron**, v. 29, n. 3, p. 729–738, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **The Global Burden of Disease 2004 update**. Disponível em: <http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Depression and Other Common Mental Disorders. 2017. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254610/1/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf?ua=1>>.

OROPEZA, V. C.; MACKIE, K.; VAN BOCKSTAELE, E. J. Cannabinoid receptors are localized to noradrenergic axon terminals in the rat frontal cortex. **Brain Research**, v. 1127, n. 1, p. 36–44, 2007.

PACHER, P. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 389–462, 2006.

PALAZIDOU, E. The neurobiology of depression. **Br Med Bull**, v. 101, p. 127–145, 2012.

PANLILIO, L. V.; MAZZOLA, C.; MEDALIE, J.; HAHN, B.; JUSTINOVA, Z.; DRAGO, F.; CADET, J. L.; YASAR, S.; GOLDBERG, S. R. Anandamide-induced behavioral disruption through a vanilloid-dependent mechanism in rats. **Psychopharmacology**, v. 203, n. 3, p. 529–538, 2009.

PAROLARO, D. Presence and functional regulation of cannabinoid receptors in immune cells. **Life Sciences**, v. 65, n. 6–7, p. 637–644, 1999.

PATEL, S.; CRAVATT, B. F.; HILLARD, C. J. Synergistic interactions between cannabinoids and environmental stress in the activation of the central amygdala. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 3, p. 497–507, 2005.

PATEL, S.; ROELKE, C. T.; RADEMACHER, D. J.; CULLINAN, W. E.; HILLARD, C. J. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5431–5438, 2004.

PAUL, I. A.; SKOLNICK, P. Glutamate and Depression: Clinical and Preclinical Studies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 121, n. 8, p. 907–24, 2003.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press**, n. 1, p. 1–474, 1998.

PEGORINI, S.; BRAIDA, D.; VERZONI, C.; GUERINI-ROCCO, C.; CONSALEZ, G. G.; CROCI, L.; SALA, M. Capsaicin exhibits neuroprotective effects in a model of transient global cerebral ischemia in Mongolian gerbils. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, n. 5, p. 727–735, 2005.

PEREIRA, V. S.; ROMANO, A.; WEGENER, G.; JOCA, S. R. Antidepressant-like effects induced by NMDA receptor blockade and NO synthesis inhibition in the ventral medial prefrontal cortex of rats exposed to the forced swim test. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 232, n. 1432–2072, p. 2263–2273, 2015.

PERTWEE, R. G. Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 14, p. 1360–81, 2010.

PETRIE, R. X.; REID, I. C.; STEWART, C. a. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder. A critical review. **Pharmacology & therapeutics**, v. 87, n. 1, p. 11–25, 2000.

PLOTSKY, P. M.; OWENS, M. J.; NEMEROFF, C. B. Psychoneuroendocrinology of depression: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 21, n. 2, p. 293-307, 1998.

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

POST, R. M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 149, n. 8, p. 999-1010, 1992.

PRICE, J. L.; DREVETS, W. C. Neurocircuitry of mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1740–634, p. 192–216, 2010.

RADEMACHER, D. J.; HILLARD, C. J. Interactions between endocannabinoids and stress-induced decreased sensitivity to natural reward. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 3, p. 633–641, 2007.

RADEMACHER, D. J.; MEIER, S. E.; SHI, L.; VANESSA HO, W. S.; JARRAHIAN, A.; HILLARD, C. J. Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 1, p. 108–116, 2008.

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

RUBINO, T.; GUIDALI, C.; VIGANO, D.; REALINI, N.; VALENTI, M.; MASSI, P.; PAROLARO, D. CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 1, p. 151–160, 2008a.

RUBINO, T.; REALINI, N.; CASTIGLIONI, C.; GUIDALI, C.; VIGANO, D. Role in Anxiety Behavior of the Endocannabinoid System in the Prefrontal Cortex. **Cereb Cortex**, v. 18, n. 6, p. 1292-301, 2008b.

SAKAMOTO, K.; KUROKI, T.; OKUNO, Y.; SEKIYA, H.; WATANABE, A.; SAGAWA, T.; ITO, H.; MIZUTA, A.; MORI, A.; NAKAHARA, T.; ISHII, K. Activation of the TRPV1 channel attenuates N-methyl-D-aspartic acid-induced neuronal injury in the rat retina. **European Journal of Pharmacology**, v. 733, n. 1, p. 13–22, 2014.

SANCHIS-SEGURA, C.; CLINE, B. H.; MARSICANO, G.; LUTZ, B.; SPANAGEL, R. Reduced sensitivity to reward in CB1 knockout mice. **Psychopharmacology**, v. 176, n. 2, p. 223–232, 2004.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55-89, 2000.

SARTIM, A. G.; GUIMARÃES, F. S.; JOCA, S. R. L. Antidepressant-like effect of cannabidiol injection into the ventral medial prefrontal cortex-Possible involvement of 5-HT_{1A} and CB₁ receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 303, p. 218-227, 2016.

SCHILDKRAUT, J. J. The Catecholamine Hypothesis of Affective Disorders: A Review Of Supporting Evidence. **The American journal of psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509-522, 1965.

SCHMIDER, J.; LAMMERS, C. H.; GOTTHARDT, U.; DETTLING, M.; HOLSBOER, F.; HEUSER, I. J. E. Combined dexamethasone/corticotropin-releasing hormone test in acute and remitted manic patients, in acute depression, and in normal controls: I. **Biological Psychiatry**, v. 38, n. 12, p. 797-802, 1995.

SCOPINHO, A. A.; SCOPINHO, M.; LISBOA, S. F.; CORREA, F. M. de A.; GUIMARÃES, F. S.; JOCA, S. R. L. Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 437-442, 2010.

SH. PRESKORN, B. BAKER, S. KOLLURI, FS. MENNITI, M. KRAMS, J. L. 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**, v. 28, n. 6, p. 631-7, 2008.

SHANSKY, R. M.; HAMO, C.; HOF, P. R.; MCEWEN, B. S.; MORRISON, J. H. Stress-induced dendritic remodeling in the prefrontal cortex is circuit specific. **Cerebral Cortex**, v. 19, n. 10, p. 2479-2484, 2009.

SHORS, T. J.; SEIB, T. B.; LEVINE, S.; THOMPSON, R. F. Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation in the rat hippocampus. **Science**, v. 244, p. 224-226, 1989.

SHORT, K. R.; MAIER, S. F. Stressor controllability, social interaction, and benzodiazepine systems. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 45, n. 4, p. 827-835, 1993.

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

SLATTERY DA, NEUMANN ID, C. J. Transient inactivation of the infralimbic cortex induces antidepressant-like effects in the rat. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, n. 10, p. 1295–303, 2011.

SOFIA, R. D.; HARAKAL, J. J. Evaluation of ketamine HCl for anti-depressant activity. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 214, n. 1, p. 68–74, 1975.

STAROWICZ, K.; MAIONE, S.; CRISTINO, L.; PALAZZO, E.; MARABESE, I.; ROSSI, F.; DE NOVELLIS, V.; DI MARZO, V. Tonic Endovanilloid Facilitation of Glutamate Release in Brainstem Descending Antinociceptive Pathways. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 50, p. 13739–13749, 2007.

STAROWICZ, K.; NIGAM, S.; DI, V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. v. 114, p. 13–33, 2007.

STEINER, M. A.; WANISCH, K.; MONORY, K.; MARSICANO, G.; BORRONI, E.; BÄCHLI, H.; HOLSBOER, F.; LUTZ, B.; WOTJAK, C. T. Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 8, n. 3, p. 196–208, 2008.

SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; NAKANE, S.; SHINODA, A.; ITOH, K.; YAMASHITA, A.; WAKU, K. **2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain** *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. .

TENNANT, C. Work-related stress and depressive disorders. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 5, n. 1, p. 7-12, 2001.

TERZIAN, A. L.; DOS REIS, D. G.; GUIMARAES, F. S.; CORREA, F. M.; RESSEL, L. B. Medial prefrontal cortex Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) in the expression of contextual fear conditioning in Wistar rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 231, n. 1, p. 149–157, 2014.

TOKITA, K.; YAMAJI, T.; HASHIMOTO, K. Roles of glutamate signaling in preclinical and/or mechanistic models of depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 4, p. 688-704, 2012.

TÓTH, A.; BOCZÁN, J.; KEDEI, N.; LIZANECZ, E.; BAGI, Z.; PAPP, Z.; ÉDES, I.; CSIBA, L.; BLUMBERG, P. M. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. **Molecular Brain Research**, v. 135, n. 1–2, p. 162–168, 2005.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. **European Journal of Pharmacology**, v. 185, n. 1, p. 1–10, 1990.

UHER, R. Genes, Environment, and Individual Differences in Responding to Treatment for Depression. **Harvard Review of Psychiatry**, v. 19, n. 3, p. 109–124, 2011.

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

VALVERDE, O.; TORRENS, M. CB1 receptor-deficient mice as a model for depression. **Neuroscience**, v. 204, p. 193–206, 2012.

VAN DER STAAY, F. J. Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. **Brain Research Reviews**, v. 52, n. 1, p. 131–59, 2006.

VAN DER STELT, M.; DI MARZO, V. Endovanilloids: Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 10, p. 1827–34, 2004.

VELDHUIS, W. B.; VAN DER STELT, M.; WADMAN, M. W.; VAN ZADELHOFF, G.; MACCARRONE, M.; FEZZA, F.; VELDINK, G. A.; VLIEGENTHART, J. F. G.; BÄR, P. R.; NICOLAY, K.; DI MARZO, V. Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in vivo excitotoxicity in the rat: role of vanilloid receptors and lipoxygenases. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 10, p. 4127–33, 2003.

VERTES, R. P. Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. **Synapse**, v. 51, n. 1, p. 32–58, 2004.

VINOD, K. Y.; XIE, S.; PSYCHOYOS, D.; HUNGUND, B. L.; COOPER, T. B.; TEJANI-BUTT, S. M. Dysfunction in fatty acid amide hydrolase is associated with depressive-like behavior in Wistar Kyoto rats. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

VRIENS J., A. G. N. B.; VRIENS, J.; APPENDINO, G.; NILIUS, B. Pharmacology of Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channels. **Mol. Pharmacol.**, v. 75, n. 6, p. 1262–1279, 2009.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, n. 1, p. 1–16, 1984.

WOOD, G. E.; YOUNG, L. T.; REAGAN, L. P.; MCEWEN, B. S. Acute and chronic restraint stress alter the incidence of social conflict in male rats. **Hormones and Behavior**, v. 43, n. 1, p. 205–213, 2003.

WORLEY, N. B.; HILL, M. N.; CHRISTIANSON, J. P. Prefrontal endocannabinoids, stress controllability and resilience: A hypothesis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2016.

XING, J.; LI, J. TRPV1 Receptor Mediates Glutamatergic Synaptic Input to Dorsolateral Periaqueductal Gray (dl-PAG) Neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 97, n. 1, p. 503–511, 2007.

YOSHINO, H.; MIYAMAE, T.; HANSEN, G.; ZAMBROWICZ, B.; FLYNN, M.; PEDICORD, D.; BLAT, Y.; WESTPHAL, R. S.; ZACZEK, R.; LEWIS, D. A.; GONZALEZ-BURGOS, G. Postsynaptic diacylglycerol lipase α mediates retrograde endocannabinoid suppression of inhibition in mouse prefrontal cortex. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. 20, p. 4857–4884, 2011.

YOU, I.; JUNG, Y.; KIM, M.; KWON, S.; HONG, S.; LEE, S.; JANG, C. Neuropharmacology Alterations in the emotional and memory behavioral phenotypes of transient receptor potential vanilloid type 1-deficient mice are mediated by changes in expression of 5-HT $1A$, GABA A , and NMDA receptors. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 1034–1043, 2012.

ZARATE, C. A.; SINGH, J. B.; QUIROZ, J. A.; DE JESUS, G.; DENICOFF, K. K.; LUCKENBAUGH, D. A.; MANJI, H. K.; CHARNEY, D. S. A double-blind, placebo-controlled study of memantine in the treatment of major depression. **The American journal of psychiatry**, v. 163, n. 1, p. 153–155, 2006.

ZOPPI S, PÉREZ NIEVAS BG, MADRIGAL JL, MANZANARES J, LEZA JC, G.-B. B. Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 4, p. 805–18, 2011.

ANEXO

ANEXO I**Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

(2ª via)

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 13.1.582.53.5), intitulado "Possível interação entre os sistemas endocanabinóide, glutamatérgico e nitrérgico do CPFmv na modulação de respostas emocionais/comportamentais ao estresse", de autoria de **Ariandra Guerini Sartim e Sâmia Regiane Lourenço Joca**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 07.10.2013.

Colaboradores: Fabrício de Araújo Moreira

This is to certify that the work (Protocol number 13.1.582.53.5), entitled: "Possível interação entre os sistemas endocanabinóide, glutamatérgico e nitrérgico do CPFmv na modulação de respostas emocionais/comportamentais ao estresse", by **Ariandra Guerini Sartim and Sâmia Regiane Lourenço Joca**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, October, 7 2013.

Ribeirão Preto, 2 de setembro de 2015

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Claudia Maria Padovan

Secretário da CEUA
Lucas Gonçalves Nogueira