

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

**PARTICIPAÇÃO DA NAPE-PLD E DE MECANISMOS DE NEUROPLASTICIDADE DO
CÓRTEX PRÉ-FRONTAL VENTROMEDIAL NOS EFEITOS ANTIESTRESSE DA
COMBINAÇÃO DE DOSES SUBEFETIVAS DE CANABIDIOL E ESCITALOPRAM.**

FRANCIELE FRANCO SCARANTE

RIBEIRÃO PRETO

2023

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

FRANCIELE FRANCO SCARANTE

Participação da NAPE-PLD e de mecanismos de neuroplasticidade do córtex pré-frontal ventromedial nos efeitos antiestresse da combinação de doses subefetivas de canabidiol e escitalopram.

Versão corrigida

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Doutor em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

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

RIBEIRÃO PRETO

2023

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

Scarante, Franciele Franco

Participação da NAPE-PLD e de mecanismos de neuroplasticidade do córtex pré-frontal ventromedial nos efeitos antiestresse da combinação de doses subefetivas de canabidiol e escitalopram. Ribeirão Preto, 2023.

175 p.: il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Campos, Aline Cristina de.

1. Escitalopram. 2. Canabidiol. 3. Estresse. 4. Córtex Pré-frontal. 5. Endocanabinoidoma. 6. Neuroplasticidade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SCARANTE, Franciele Franco

Título: Participação da NAPE-PLD e de mecanismos de neuroplasticidade do córtex pré-frontal ventromedial nos efeitos antiestresse da combinação de doses subefetivas de canabidiol e escitalopram.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Doutor em Ciências. Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: ___/___/ 2023

Banca examinadora

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

FMRP/USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Membro 1: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Membro 2: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Membro 3: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

*Aos meus pais pelo apoio, às minhas irmãs
pela inspiração, aos amigos por serem
pessoas tão brilhantes, aos meus gatos por
me manterem viva.*

AGRADECIMENTOS

Obrigada à espiritualidade, às entidades que me acompanharam e aos Orixás que regem essa minha existência. Perdão por ser fraca e falha.

Obrigada à minha família por ter me apoiado até onde conseguiram. Desculpa não conseguir ser o que vocês esperavam de mim e ser uma constante decepção.

Obrigada aos meus gatos. Panceta, dona da minha existência, e Guiné, meu amor: obrigada por salvarem a minha vida todos os dias. Magali, minha princepessa, e meu prínceso maluquinho Clotrimix: obrigada por me fazerem sorrir.

Obrigada à Macumbaria. Obrigada Edu por ser meu irmão e por me estender a mão em todas as vezes que precisei (mesmo eu não merecendo). Obrigada Mel pela parceria e pela paciência. Desculpa ser tão bagunceira e chata. Obrigada Moita pela sua pureza e fofura. Saudades. Perdão aos três, eu sei que vocês merecem conviver com alguém melhor que eu.

Obrigada à meus amigos e colegas de laboratório.

Obrigada ao Team Covid. Pacu, obrigada por me aturar e escutar as lamentações patéticas dessa sua amiga incompetente. Obrigada, Karla, por ser tão incrível e parceira.

Obrigada, Rafa, por ser um ser humano tão lindo e especial com todos a sua volta, você é uma inspiração. Obrigada, Isa, por ser tão fofa e tão forte e sempre iluminar nossos dias com a sua luz. Vocês não tem noção do quanto são importantes para mim. Sem vocês, essa tese não existiria.

Obrigada à Tamires por ser uma amiga tão incrível em todos os momentos. Você é fantástica. Obrigada por toda a força e ajuda no laboratório. Obrigada por toda a parceria nos rolês da vida.

Obrigada à Dri e Zz. Não é à toa que Maria, Maria é um dom, é uma certa magia, uma força que nos alerta. Vocês me ajudaram muito mais do que eu poderia imaginar. Não tenho palavras para agradecer por tudo que vocês fizeram por mim.

Obrigada a todos que passaram pelo laboratório e já se despediram. Rafa Aguiar, meu Manolo, obrigada por ser tão maravilhoso. Erika por ser a Alemoa mais linda e competente do mundo, meeu. Fer, obrigada por ser essa mulher inspiradora. Mari, o mundo é um lugar mais lindo porque você existe. Gabs, obrigada pela sua energia caótica que nos alegrava sempre.

Obrigada aos membros mais recentes do laboratório. Obrigada a Pedro por ser tão lindo e maravilhoso. Seja bem-vindo.

Obrigada à Felipe por toda ajuda nas análises. Que você tenha muito sucesso na sua vida!

Obrigada à Bianca pela ajuda na manutenção dos animais e em toda e qualquer questão envolvendo o biotério.

Obrigada à Bárbara pela ajuda e boa sorte no mestrado e em toda a sua jornada.

Obrigada Fábio, Bruno e a todos os alunos de iniciação científica.

Agradeço aos outros amigos que a pós-graduação me deu ao longo desses anos.

Obrigada Atlante, Ivaldo, Nicole, Jeimi, Nai, Jéssica, Gobira, Isaac, Téó, Andrezinha, Douglas, Alice, Prots, Renato, Dobby... Ao longo de tantos anos de pós eu sempre fiquei impressionada com o brilhantismo de todos vocês. Vocês são pessoas maravilhosas e eu me sinto honrada por ter conhecido vocês.

Obrigada à Fernanda, minha psicóloga, por tentar me manter enraizada e firme.

Agradeço à minha orientadora, professora Alline, por todos os ensinamentos e pela confiança. Obrigada por me orientar durante todos esses anos e tentar fazer dessa pessoa perturbada que sou uma cientista. Desculpa qualquer coisa.

Obrigada à Gislaine por toda a prestatividade, paciência e competência. Eu não sei o que eu faria sem você. Obrigada pelas conversas e por me dar forças quando eu aparecia derrotada na secretaria. Desculpa por deixar sempre as coisas para a última hora, te encher de perguntas sempre e ir te perturbar na secretaria. Obrigada por ser o coração desse departamento e sempre nos acolher.

Obrigada ao Waldik por sempre nos ajudar, mesmo que resmungando. Obrigada por sua incrível competência e por tornar a vida de todos do departamento mais fácil.

Obrigada à Eleni por toda a prestatividade para a preparação dos tecidos para as técnicas histológicas. Obrigada por ser sempre muito competente e por ter achado a caixa de cérebros que eu achei que tinha perdido.

Obrigada aos técnicos: Inês, Marquinhos, Giuliana e Tadeu (in memoriam), os quais contribuíram diretamente para esse trabalho.

Obrigada ao Departamento de Farmacologia e a todos os professores.

Obrigada ao Professor Francisco Guimarães por gentilmente ceder o espaço físico do seu laboratório para que eu pudesse executar parte dos experimentos. Obrigada pelas discussões científicas sempre proveitosas e por compartilhar também seu vasto conhecimento sobre cultura, cinema, música e história.

Obrigada à equipe do CEQIL e a Prof. Lucia Faccioli pela colaboração para a quantificação de endocanabinóides.

Obrigada ao Prof. Benedikt Berninger por me orientar durante o estágio supervisionado realizado em seu laboratório, na King's College London. Obrigada por todos os ensinamentos e por me aceitar no grupo de braços abertos. Danke.

Obrigada ao Dr. Nicolás Marichal por me co-orientar durante o estágio em Londres e por ser sempre muito paciente e muito prestativo em todos os momentos.

Obrigada à Ana Beltrán, Laia, Nancy, Marcelo, Sidney, Emilio, Andrea, Jero, Litza, Rocío e todos os alunos, técnicos, pós-docs e professores com quem tive a honra de conviver durante o estágio no Centre for Developmental Neurobiology.

Obrigada à Ju Fagotti por me acolher em Londres no momento que eu mais precisava. Não tenho como agradecer toda a ajuda. Que você tenha muito sucesso na sua vida sempre! Obrigada à Ju, Lucas, Gus, Flávia e Jenna por me acolherem em Londres e me mostrarem um pouco da perspectiva de vocês nessa cidade.

Obrigada às pessoas que me ajudaram nos primeiros passos na carreira acadêmica e que me inspiraram a seguir em frente, especialmente a Prof^a Dr^a Joice Maria da Cunha, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), e aos membros do laboratório de farmacologia da dor, e ao Prof. Dr. Marcelo de Meira Santos Lima e aos membros do laboratório de neurofisiologia da UFPR. Obrigada, ainda, a todos os colegas da primeira turma de Biomedicina de UFPR.

Obrigada às entidades estudantis ANPG, as APGs da USP e a todos que seguiram com força na luta, mesmo com repetidos ataques à ciência e à educação.

Obrigada aos membros da banca por aceitarem contribuir nesse trabalho e participar dessa etapa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Processos 2019/09178-3 e 2021/13515-5) pelo apoio financeiro.

“Que fase louca

Que fase doida

Que ano é esse?

O que é que vem depois?

Eu tô exausta, eu tô perdida

Já me disseram que só começou”

– Alinhamento Energético (Fafá de Belém)

RESUMO

RESUMO

SCARANTE, F. F. PARTICIPAÇÃO DA NAPE-PLD E DE MECANISMOS DE NEUROPLASTICIDADE DO CORTEX PRÉ-FRONTAL VENTROMEDIAL NOS EFEITOS ANTIESTRESSE DA COMBINAÇÃO DE DOSES SUBEFETIVAS DE CANABIDIOL E ESCITALOPRAM. 2023. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Estresse crônico precipita a manifestação de sintomas de transtornos psiquiátricos como transtornos de humor e ansiedade. Inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS) são frequentemente utilizados para o tratamento desses transtornos psiquiátricos associados a estresse. Entretanto, uma das limitações de ISRSs é que requerem entre 4-8 semanas de tratamento para induzir uma melhora significativa nos sintomas. Previamente, relatamos que a combinação de escitalopram (ESC; 10mg/kg) com uma dose subefetiva de canabidiol (CBD; 7,5mg/kg) acelera o efeito do tipo-ansiolítico do ISRS em camundongos expostos a 10 dias de estresse. Aqui, nós hipotetizamos que o efeito antiestresse da combinação ESC+CBD é dependente da sinalização de mediadores lipídicos do endocanabinoidoma (ECBoma), um sistema que parece ser um alvo em comum entre CBD e ESC, no córtex pré-frontal (CPF) ventromedial (vm). Para testar isso, camundongos machos C57Bl6 (10-12 semanas) receberam a injeção intra-CPFvm de vetores virais que direcionavam a deleção mediada por um sistema CRISPR-Cas9 da enzima NAPE-PLD ou da enzima DAGL α , às quais estão envolvidas em vias de síntese de ligantes do ECBoma. Após 15 dias, os animais foram expostos a 10 dias de estresse crônico imprevisível (CUS) e tratados por 7 dias com veículo ou com ESC+CBD. Nós observamos que o efeito do tipo-ansiolítico de ESC+CBD no *novelty-suppressed feeding* (NSF) foi abolido em animais com deleção da enzima NAPE-PLD, mas não DAGL α , no CPFvm. Além disso, a combinação de ESC+CBD, apesar de não alterar significativamente a resposta comportamental de animais expostos a 10 dias de CUS no *splash-test*, induziu um efeito do tipo-ansiolítico em camundongos expostos a 21 dias de estresse e tratados com as combinações de Veículo ou ESC (10mg/kg) com Veículo ou CBD (7,5mg/kg) apenas durante os últimos 7 dias do protocolo de estresse. Ademais, estresse reduziu significativamente a expressão da enzima NAPE-PLD no CPF medial e o tratamento com ESC e CBD gerou um aumento na expressão da enzima e aumentou a porcentagem de interneurônios parvalbumina que expressavam NAPE-PLD no CPF

medial. A exposição a CUS aumentou a densidade de células precursoras de oligodendrócitos (CPOs) e a sobrevivência de CPOs em atividade proliferativa no CPF medial. Os resultados indicam que 7 dias de tratamento com a combinação ESC+CBD induz um efeito do tipo-ansiolítico mesmo em animais expostos a 3 semanas de CUS. O efeito antiestresse do tratamento é dependente da expressão de NAPE-PLD no CPFvm e é caracterizado por alterações plásticas no CPF de camundongos estressados.

Palavras-chave: escitalopram, canabidiol, estresse, neuroplasticidade, córtex pré-frontal, endocanabinoidoma.

ABSTRACT

ABSTRACT

SCARANTE, F. F. **INVOLVEMENT OF NAPE-PLD AND NEUROPLASTIC MEDIATED MECHANISMS IN THE VENTRAL PREFRONTAL CORTEX IN THE ANTI-STRESS EFFECTS OF SUB-EFFECTIVE DOSES OF CANNABIDIOL AND ESCITALOPRAM.** 2023 (Ph.D thesis). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Chronic stress precipitates the symptoms of psychiatric disorders, including mood and anxiety disorders. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are often used for treating these stress-associated psychiatric disorders. However, a main limitation of SSRIs is their late-onset of action (only after 4-8 weeks of treatment). Previously, we have shown that the combination of escitalopram (ESC; 10mg/kg) with a sub effective dose of cannabidiol (CBD; 7.5mg/kg) accelerates the anxiolytic-like effects of the SSRI in mice submitted to a 10-day stress protocol. Here, we hypothesize that the anti-stress effect of ESC+CBD is dependent on the signaling mediated by lipid ligands of the Endocannabinoidome (ECBome), a system that seems to be a common target for ESC and CBD, in the ventromedial prefrontal cortex (vmPFC). To test this, C57Bl6 male mice (10-12weeks) received an intra-vmPFC injection of viral vectors directing the CRISPR-Cas9-mediated deletion of the enzyme NAPE-PLD or the enzyme DAGL α , which are involved in the synthesis of ECBome ligands. After 15 days, mice were exposed to 10 days of chronic unpredictable stress (CUS) and treated for 7 days with vehicle or with ESC+CBD. The anxiolytic-like effect of ESC+CBD in the novelty-suppressed feeding (NSF) test was abolished in mice with induced deletion of NAPE-PLD, but not DAGL α , in the vmPFC. Furthermore, the combination of ESC+CBD, despite not altering the behavior of mice exposed to a 10-day stress protocol in the splash-test, induced anxiolytic-like effect in mice exposed to 21 days of stress and treated with the combinations of vehicle or ESC (10mg/kg) with Vehicle or CBD (7.5mg/kg) only in the last 7 days of the stress protocol. Moreover, stress decreased the expression of NAPE-PLD in the medial PFC and the treatment with ESC+CBD increased the expression of the enzyme while also increased the percentage of parvalbumin (PV) interneurons that expressed NAPE-PLD in the medial PFC. In addition, CUS increased the density of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) and the survival of proliferating OPCs in the medial PFC. Our results indicate that

ESC+CBD induce an anxiolytic-like effect after 7 days of treatment even in mice exposed to 3 weeks of stress. The anti-stress effects of ESC+CBD rely on the expression of NAPE-PLD in the vmPFC and are characterized by plastic alterations in the PFC of stressed mice.

.

Key-words: escitalopram, cannabidiol, stress, neuroplasticity, prefrontal cortex, endocannabinoidome.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. Introdução	21
1.1. Estresse e transtornos psiquiátricos	22
1.2. Estresse e psicofarmacologia.....	26
1.2.1. “Velhas” estratégias de tratamento farmacológico antiestresse	26
1.2.2. Canabidiol como uma “nova” alternativa para tratamento farmacológico anti-estresse.....	31
1.3. Neurobiologia de transtornos psiquiátricos associados a estresse: mecanismos do efeito farmacológico antiestresse.....	34
1.3.1. Neuroplasticidade e estresse: Onde e o que acontece?	34
1.3.2. O “endocanabinoidoma” na regulação de respostas neuroplásticas a estresse	45
1.4. Combinação de escitalopram e CBD em modelos de estresse repetido: envolvimento de processos plásticos no córtex pré-frontal	49
1.5. Hipótese	52
2. Objetivos	53
2.1. Objetivo Geral	54
2.1. Objetivos específicos.....	54
3. Materiais e Método	56
3.1. Animais	57
3.2. Drogas.....	57
3.3. Vetores virais.....	58
3.4. Cirurgia estereotáxica.....	59
3.5 Estresse crônico imprevisível (CUS – <i>Chronic unpredictable stress</i>).....	60
3.6. Testes comportamentais	60
3.6.1 Novelty suppressed feeding test (NSF).....	60
3.6.2 Splash-test.....	61

3.7. Procedimentos experimentais	62
3.7.1. Expandindo o entendimento sobre os efeitos comportamentais e respostas neurobiológicas da combinação de escitalopram e CBD em camundongos estressados ...	62
3.7.2. O ECBoma no CPF desempenha um papel importante no efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD?	65
3.8. Quantificação de endocanabinóides	68
3.9. Técnica de Golgi	68
3.10. Imunohistoquímica	70
3.10.1. Processamento dos tecidos	70
3.10.2. Imunomarcção	70
3.10.3. Aquisição e análise de imagens	73
3.11. Análise estatística.....	74
4. Resultados	75
4.1. Expandindo o entendimento sobre os efeitos comportamentais antiestresse da combinação de escitalopram e CBD.....	76
4.1.1. A exposição a 10 dias de CUS não induz um fenótipo do tipo-depressivo	76
4.1.2. A combinação de Escitalopram e CBD por 7 dias induz um efeito do tipo-ansiolítico em animais expostos a 21 dias de estresse	79
4.2. Bases neurobiológicas do efeito da combinação de escitalopram e CBD no CPF	82
4.2.1. A exposição a 10 dias de estresse induz uma redução de espinhos dendríticos de neurônios piramidais no CPF.....	82
4.2.2. Animais estressados tem um aumento na densidade de CPOs e na sobrevivência de CPOs proliferativas.....	85
4.2.3. Estresse e combinação de escitalopram e CBD não alteraram a proliferação de precursores neurais no giro denteado	88
4.2.4. Estresse e combinação de tratamento alteram o padrão de expressão de NAPE-PLD no CPF	91
4.3. O ECBoma no CPF desempenha um papel importante no efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD?.....	95

4.3.1 A deleção da enzima NAPE-PLD no CPF impede o efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD	95
4.3.2. A combinação de escitalopram e CBD induz um efeito do tipo-ansiolítico em camundongos com deleção da enzima DAGLa no CPF	98
5. Discussão	102
5.1. CBD como terapia complementar para melhorar o efeito antiestresse do escitalopram	103
5.2. Estresse e tratamento não alteraram comportamento do tipo-depressivo no splash-test	105
5.3. A combinação de escitalopram e CBD: 1 semana é suficiente contra 3 semanas de estresse	108
5.4. Estresse e o tratamento com escitalopram e CBD alteram o padrão de expressão de NAPE-PLD no CPF	112
5.5. Papel do ECBoma no efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD em camundongos estressados.....	115
5.6. Estresse induz uma hipofunção cortical.....	120
5.7. Impacto do estresse sobre a plasticidade de CPOs.....	122
5.8. Efeito do estresse e tratamento sobre a proliferação de células precursoras neurais...	123
6. Conclusão	127
7. Referências	131
ANEXOS	153
Anexo 1	154
Anexo 2	174

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estresse e transtornos psiquiátricos

A palavra estresse é derivada do termo latim *stringere*, que significa estreitar ou apertar. Na Física, o estresse é uma grandeza que descreve a resistência interna da matéria aos efeitos de distorção gerados por uma força ou carga externas. Em 1936, Hugo Hanz Selye emprestou o termo da Física e introduziu “estresse” ao léxico médico para se referir a qualquer resposta não específica do organismo a qualquer demanda por mudança (SELYE, 1956).

Na década de 70, o neurocientista norte-americano Bruce McEwen expandiu o conceito proposto por Selye ao sugerir o estresse não como um sistema de emergência acionado sob demandas pontuais, mas sim um sistema contínuo que permite a adaptação aos mais diversos estímulos do dia-a-dia (mesmo os que não definiríamos como “estressantes”) (MCEWEN; AKIL, 2020). São inúmeros os exemplos dessas situações. Uma hora a mais ou a menos de sono pode determinar se vamos acordar com “o pé direito” ou com “o pé esquerdo”. Sair de casa e ser surpreendido por uma chuva inesperada, olhar pela janela do escritório aquele dia ensolarado que você não pode aproveitar para o seu lazer, sair correndo para pegar o ônibus que você está prestes a perder, ser surpreendido pelo preço dos produtos no supermercado ou por uma fila inesperada no banco. Atividade física, estímulos sonoros, interações sociais, mídias sociais, fofocas sobre a vida de conhecidos ou notícias sobre a pobreza e a fome em outro continente. Estamos diariamente expostos aos mais diversos estímulos psicossociais, físicos e ambientais e, em geral, seguimos nossas vidas sem perceber como esses estímulos alteraram nossa frequência cardíaca, respostas neuroendócrinas

ou a atividade de uma determinada população de neurônios em nosso cérebro. O nosso sistema biológico de estresse permite que haja um controle dinâmico e contínuo de nossas funções vitais de modo a estabelecer um novo equilíbrio frente a cada desafio e garantir a manutenção da homeostase (MCEWEN; STELLAR, 1993). A esse processo ativo de adaptação e manutenção da homeostase denomina-se alostase (STERLING, 1988).

Entretanto, se somos equipados com esse sistema de adaptação e temos a capacidade de manter a homeostase frente a estímulos estressores, por que a Organização Mundial da Saúde considerou o estresse como “a epidemia do século XXI”? Para entendermos este processo, podemos voltar a definição de estresse da Física: Se estresse corresponde a resistência a uma força ou carga externas, o que acontece quando a força ou a carga são superiores a capacidade da matéria de resistir? Na Física, existe uma relação entre estresse e deformação (*stress-strain curve*) que descreve a força ou carga que pode ser aplicada em um material até que haja uma deformação ou falha permanente. Em sistemas biológicos, a homeostase do sistema é mantida frente a força ou carga gerada por diferentes desafios físicos, ambientais e psicossociais devido à resistência assegurada pela alostase. O recrutamento de mecanismos alostáticos, entretanto, demanda um custo energético do sistema. A esse custo denomina-se carga alostática. Entretanto, uma frequência ou a uma intensidade exacerbada de força ou de carga demandando do sistema de alostase ou uma resposta ineficiente de mecanismos alostáticos pode fazer com que o custo energético seja superior ao que o sistema consegue comportar, instalando um processo de sobrecarga alostática (uma “deformação” ou falha permanente do sistema de alostase) (MCEWEN, 2000; MCEWEN;

STELLAR, 1993; MCEWEN; WINGFIELD, 2010). Essa sobrecarga alostática pode acelerar processos patológicos e contribuir para a precipitação de sintomas de transtornos psiquiátricos (MCEWEN, 2000).

Breslau e Davis (1986) compararam a incidência de sintomas em pacientes com diagnóstico de transtorno de depressão maior (TDM) e a idade de início do transtorno em uma amostra de indivíduos controle em comparação a uma amostra de indivíduos expostos a estresse crônico (mães ou outros cuidadores de crianças portadoras de deficiência. Eles descreveram que, apesar de o estresse crônico não aumentar significativamente a incidência de TDM, a idade de início de manifestação dos sintomas foi significativamente menor no grupo de indivíduos expostos a estresse crônico, evidenciando o estresse não como um agente etiológico, mas sim como um fator que precipita a manifestação de sintomas de transtornos psiquiátricos (BRESLAU; DAVIS, 1986).

Indivíduos expostos de forma sustentada a dificuldades econômicas apresentam uma maior probabilidade de manifestar sintomas de depressão (OHN et al., 1997). Em outro estudo, Felitti e colaboradores (1998) investigaram a influência da exposição a diferentes estímulos estressores severos durante a infância (abuso físico ou psicológico, membros da família com transtorno de uso de substância, membros da família com outros transtornos psiquiátricos severos, presenciar a violência contra a mãe, membros da família encarcerados etc.) sobre a manifestação de sintomas de diferentes doenças relacionadas a significativas taxas de mortalidade em adultos. Eles indicaram que os indivíduos categorizados nas categorias correspondentes a uma maior intensidade ou severidade de exposição a tais fatores estressantes durante a infância apresentaram um

risco 4 vezes maior de exibirem um humor deprimido de forma sustentada (por 2 semanas ou mais) e tiveram um risco 12 vezes maior de manifestar comportamentos suicidas (FELITTI et al., 1998).

Um dos exemplos mais recentes do impacto do estresse na precipitação de sintomas de transtornos psiquiátricos foi a pandemia da COVID-19 que recentemente assolou a humanidade. Vivenciar a pandemia da COVID-19 significou mais do que enfrentar um vírus. Em uma sociedade cada vez mais conectada, o isolamento social, a imposta redução da mobilidade, o constante medo por si mesmo e por entes queridos, as constantes notícias sobre o crescente número de vítimas, a emergência de novas variantes, a incerteza sobre vacinas e tratamentos e os mais diversos desafios impostos por diferentes contextos políticos e socioeconômicos representaram estímulos estressores que impactaram o bem-estar e a saúde mental de indivíduos a nível global. Uma análise conduzida pelo *Global Burden of Disease Resource Center* concluiu que, durante a pandemia, a redução da mobilidade e aumento das taxas de infecção por COVID-19 foram correlacionados com uma maior prevalência de transtornos de depressão e de ansiedade (SANTOMAURO et al., 2021). Estimou-se cerca de 53,2 milhões de casos adicionais de transtorno de depressão maior e 76,2 milhões de casos adicionais de transtornos de ansiedade em 2020 em consequência da pandemia de COVID-19 (SANTOMAURO et al., 2021).

A partir daqui, chamaremos de transtornos associados a estresse os transtornos para os quais a sobrecarga alostática decorrente da falha do em responder a estresse acarreta na precipitação de sintomas desses transtornos (especialmente transtorno de depressão e ansiedade). Note que a definição assumida aqui é diferente do critério

diagnóstico estabelecido pelo DSM-V para transtornos psiquiátricos a trauma e estressores ou o critério definido pelo CID-11, que enquadra transtornos associados a estresse como uma subcategoria da categoria diagnóstica “estresse pós-traumático.”

Estudos pré-clínicos que tem como objetivo investigar a neurobiologia de transtornos associados ao estresse ou caracterizar o potencial efeito terapêutico antiestresse de fármacos. As intervenções fazem uso da exposição a estímulos estressores de forma crônica como uma forma de induzir alterações comportamentais que possam ser relacionados a sintomas observados em transtornos psiquiátricos associados ao estresse. Os modelos podem ser homotípicos (quando os animais são expostos repetidamente ao mesmo estímulo estressor) ou heterotípicos (quando os estímulos estressores são variados) (COSTA-FERREIRA et al., 2016). Um dos modelos mais amplamente utilizados foi descrito inicialmente por Willner e colaboradores e consiste no estresse crônico imprevisível (*chronic unpredictable stress*). Nesse modelo, a exposição repetida a diferentes estressores de forma randomizada promove uma resposta do tipo-ansiosgênica e gera um comportamento do tipo-anedônico (CAMPOS et al., 2013; PAPP; WILLNER; MUSCAT, 1991; WILLNER; MUSCAT; PAPP, 1992). Fármacos com potencial ação terapêutica em transtornos associados a estresse revertem, atenuam ou previnem as alterações comportamentais desencadeadas pelo estresse em modelos animais.

1.2. Estresse e psicofarmacologia

1.2.1. “Velhas” estratégias de tratamento farmacológico antiestresse

A história da psicofarmacologia de transtornos associados a estresse é anterior à própria utilização do termo “psicofarmacologia”. No final do século XIX e começo do

século XX, o uso de sedativos como derivados do ácido barbitúrico era uma prática comum para “aquietar o paciente”. A partir dos anos 1950, no entanto, ocorreu o que podemos chamar de “A Era de Ouro da Psicofarmacologia”. O início da ascensão da Psicofarmacologia, entretanto, foi marcada por *serendipity*. Em 1952, foi descrito o efeito do anti-tuberculostático, iproniazida, em melhorar o humor de pacientes com tuberculose (BRASLOW; MARDER, 2019). Em um ensaio clínico em 1957, Nathan Kline descreveu que pacientes com transtorno de depressão tratados com iproniazida apresentavam uma significativa melhora em seus sintomas (LOOMER; SAUNDERS; KLINE, 1957). Quase na mesma época, Kuhn reportou o efeito antidepressivo da imipramina, um fármaco inicialmente sintetizado como um potencial antipsicótico (BRASLOW; MARDER, 2019; KUHN, 1958).

Em 1952, Zeller descreveu a atividade da iproniazida como um inibidor da enzima monoamina oxidase (MAO) (ZELLER; BARSKY, 1952). Na década de 60, uma série de estudos desenvolvidos por Julius Axelrod e Arvid Carlsson descreveram a capacidade da imipramina em aumentar a disponibilidade de monoaminas através da inibição dos transportadores que fazem a recaptação desses neurotransmissores (AXELROD; WHITBY; HERTTING, 1961; AXELROD, 1964; AXELROD; HERTTING; POTTER, 1962; CARLSSON; FUXE; UNGERSTEDT, 2011; GLOWINSKI; AXELROD, 1964; HERTTING; AXELROD, 1961). A partir dessas evidências farmacológicas, surgiu a Teoria Monoaminérgica, que propõe que o efeito antidepressivo de psicofármacos está associado com um aumento na disponibilidade de neurotransmissores monoaminérgicos, com destaque para a serotonina (COPPEN, 1967). Munidos por essa hipótese, foram destinados esforços para o desenvolvimento de fármacos que atuassem de maneira mais

seletiva sobre a neurotransmissão serotoninérgica. Arvid Carlsson sintetizou o primeiro inibidor seletivo de recaptção de serotonina (ISRS), a zimeldina, em 1971. Em 1982, a zimeldina foi lançada pela Indústria sueca Astra, mas foi retirada do mercado no ano seguinte devido a relatos de efeitos adversos severos (BRASLOW; MARDER, 2019; MULINARI, 2015). O segundo ISRS a chegar ao mercado, fluoxetina, teve sua ação como um ISRS descrita em 1974 e chegou ao mercado em 1988. Não muito tempo depois, outros ISRS foram introduzidos no mercado: sertralina, paroxetina, citalopram e escitalopram, entre outros (HILLHOUSE; PORTER, 2015).

Os ISRS são prescritos atualmente não só para o tratamento de transtornos de depressão, como também para o tratamento de outros transtornos associados ao estresse. Por exemplo, o Escitalopram tem aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para seu uso no tratamento, além de transtornos de depressão, de transtorno do pânico com ou sem agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade social e transtorno obsessivo compulsivo. A Fluoxetina, por sua vez, é aprovada pela ANVISA para o tratamento de bulimia nervosa, transtorno disfórico pré-menstrual e transtorno obsessivo compulsivo. A Tabela 1 apresenta os principais ISRS e os transtornos para os quais esses fármacos têm seu uso aprovado pela ANVISA.

Tabela 1. Usos de ISRS aprovados pela ANVISA e posologia para cada transtorno psiquiátrico.

ISRS	TDM	TAG	TAS	TOC	TEPT	TP	TDPM	BN
Escitalopram	10-20mg	10-20mg	5-20mg	5-20mg		10-20mg		
Fluoxetina	20mg			20-60mg			20mg	60mg
Citalopram	20-40mg			20-40mg		20-40mg		
Sertralina	50-200mg			50-200mg	50-200mg	50-200mg	50-150mg	
Paroxetina	20-50mg	20-50mg	20-50mg	40-60mg	20-50mg	40-50mg		
Fluvoxamina	100-300mg			100-300mg				

ISRS: Inibidor Seletivo de Receptação de Serotonina; TDM: Transtorno de depressão maior; TAG: Transtorno de ansiedade generalizada; TAS: Transtorno de ansiedade social; TOC: Transtorno obsessivo compulsivo; TEPT: Transtorno de estresse pós-traumático; TP: Transtorno do pânico (com ou sem agorafobia); TDPM: Transtorno disfórico pré-menstrual; BN: Bulimia nervosa. Os dados sobre a posologia foram

Outras classes de fármacos utilizados para o tratamento de transtornos psiquiátricos associados a estresse incluem outras classes de antidepressivos (inibidores da MAO, antidepressivos tricíclicos, inibidores de recaptação de noradrenalina e serotonina, azapironas), antipsicóticos (p.e., risperidona, quetiapina, olanzapina), estabilizadores de humor (p.e., lítio, valproato, carbamazepina) e benzodiazepínicos (p.e., Alprazolam, Lorazepam, Bromazepam, Clonazepam, Diazepam). Em um estudo transversal de base populacional realizado em Campinas-SP, caracterizou-se que dentre os 2472 indivíduos adultos (idade entre 20 e 59 anos) e idosos (>60 anos) entrevistados, 6,8% faziam uso de fármacos psicotrópicos. Dentre os psicotrópicos utilizados, 52,6% correspondiam a antidepressivos, dos quais 29,8% correspondiam a fármacos da classe dos ISRS (PRADO; FRANCISCO; BARROS, 2017). Ademais, um estudo que investigou dados de venda de antidepressivos no Brasil entre Novembro de 2014 e Outubro de 2019, demonstraram que os ISRS foram a classe de fármacos antidepressivos mais vendida nesse período. Desta lista, o escitalopram foi o antidepressivo líder na lista de vendas, seguido pela sertralina e fluoxetina como os mais vendidos no Brasil nesse intervalo de 5 anos (HOEFLER et al., 2022). O uso de antidepressivos e ansiolíticos foi intensificado durante a pandemia de COVID-19 e, segundo Saavedra e colaboradores (2022), escitalopram seguiu como o psicotrópico mais descrito e dispensado (ESCALANTE SAAVEDRA et al., 2022).

Portanto, Escitalopram se destaca dentre os ISRS por ser um dos fármacos mais prescritos tanto para o tratamento de transtornos de depressão quanto de ansiedade. Uma meta-análise e revisão sistemática publicada em 2018 comparando 21

antidepressivos de diferentes classes caracterizou o Escitalopram como um dos fármacos que combina o melhor perfil de eficácia (considerada no estudo como o número de pacientes que tiveram uma redução igual ou maior que 50% no escore de instrumentos utilizados para avaliar sintomas de depressão) com melhor perfil de aceitabilidade (medida no estudo considerando a taxa de descontinuação do tratamento pelos pacientes) (CIPRIANI et al., 2018).

ISRS, assim como outros antidepressivos, apresentam limitações relevantes no tratamento de transtornos psiquiátricos associados ao estresse. Uma das limitações mais relevantes é o tempo de tratamento necessário para que haja uma melhora significativa dos sintomas dos pacientes: entre 4 e 8 semanas. Alguns autores defendem que exista uma melhora inicial de aproximadamente 20% nas primeiras semanas de tratamento, o que poderia ser preditivo da responsividade do paciente no prosseguimento do tratamento (STASSEN; ANGST; DELINI-STULA, 1997). Essa demora para a apresentação do efeito terapêutico é particularmente relevante por também impactar na taxa de aderência dos pacientes ao tratamento, principalmente porque os efeitos adversos são anteriores aos efeitos positivos do tratamento (CARVALHO et al., 2016; WARDEN et al., 2010).

Uma porcentagem significativa de pacientes não responde a monoterapia com antidepressivos. Além disso, alguns pacientes são enquadrados na categoria de resistentes a tratamento, ou seja, não responsivos a nenhuma das abordagens terapêuticas atualmente disponíveis (ANSARA, 2020; SOARES et al., 2021). Essas limitações evidenciam a necessidade de otimizar o efeito dos fármacos atualmente

disponíveis ou encontrar novos fármacos que possam ter uma eficácia terapêutica nesta população de pacientes.

1.2.2. Canabidiol como uma “nova” alternativa para tratamento farmacológico antiestresse

O Canabidiol (CBD) é o principal fitocanabinóide desprovido de efeitos psicotomiméticos. Seu uso no contexto de psicofarmacologia se iniciou com Zuardi e colaboradores (1982), que caracterizaram o efeito ansiolítico do CBD em indivíduos saudáveis tratados com uma dose elevada de tetrahidrocanabinol (THC) que promoveu nestes indivíduos efeitos ansiogênicos (ZUARDI et al., 1982). Mais tarde, na década de 90, em outro protocolo, voluntários sadios foram expostos a um estímulo ansiogênico desencadeado pela exposição dos indivíduos a uma situação de estresse agudo, o teste de simulação de falar em público. Neste teste, após a mensuração de sintomas de ansiedade basais dos indivíduos, eles receberam tratamento com placebo ou com CBD (300mg), além de um grupo de indivíduos tratados com diazepam, um ansiolítico benzodiazepínico, ou ipsapirona, um agonista parcial de receptores 5HT1A. Os sintomas de ansiedade foram avaliados novamente em 4 momentos: no pré-teste para avaliar um efeito do tratamento sobre a resposta basal, logo antes do indivíduo iniciar o discurso para avaliar ansiedade antecipatória, no meio do discurso para avaliar ansiedade subjetiva de desempenho e 15 minutos após o final do discurso para avaliar ansiedade pós-estresse. Foi observado que, enquanto o benzodiazepínico Diazepam reduziu a ansiedade basal dos indivíduos logo na medida pré-teste. Entretanto, ipsapirona e CBD, mas não o diazepam, reduziram a ansiedade de indivíduos apenas após a exposição ao estímulo estressor, indicando um efeito antiestresse do CBD. Adicionalmente, ao

contrário do Diazepam, o CBD não induziu efeitos sedativos nos voluntários (ZUARDI et al., 1993). Um estudo observacional transversal recente indicou que usuários de CBD reportam uma significativa melhora em problemas de sono, uma redução do estresse e de ansiedade (MOLTKE; HINDOCHA, 2021).

O primeiro estudo a investigar o potencial efeito do CBD em um contexto de ansiedade patológica foi desenvolvido por Crippa e colaboradores (2011). Em pacientes com transtorno de ansiedade social, uma única administração de CBD (400mg, via oral) reduziu significativamente os sintomas de ansiedade (CRIPPA et al., 2011). O tratamento repetido com CBD reduz os sintomas de depressão em pacientes dependentes de *Cannabis*, tanto em pacientes que permanecem em uso da substância quanto em pacientes em síndrome de retirada (CRIPPA et al., 2013; SOLOWIJ et al., 2018). Ademais, em um paciente com depressão severa, ansiedade social e com transtorno de uso de múltiplas substâncias que não foi responsivo ao tratamento com antidepressivos, o tratamento com CBD por 8 semanas (sendo apenas as 3 primeiras em combinação com o ISRS sertralina) induziu um efeito antidepressivo e ansiolítico acompanhado de uma cessação do uso de substâncias pelo paciente (LACZKOVICS et al., 2021). Recentemente, Berger e colaboradores (2022) descreveram o efeito ansiolítico do CBD em pacientes com transtorno de ansiedade que não são responsivos a antidepressivos e a terapia cognitivo-comportamental, reforçando o potencial do CBD como uma alternativa terapêutica para os fármacos atualmente utilizados para o tratamento de transtornos associados a estresse (BERGER et al., 2022).

Uma parte significativa das evidências sobre o potencial efeito do CBD em transtornos psiquiátricos associados a estresse são fornecidos por estudos em modelos

animais. Em testes em modelos murinos como o labirinto em cruz elevado e o teste de Vogel, o tratamento agudo com CBD induz um efeito do tipo-ansiolítico (GUIMARÃES et al., 1990; MOREIRA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2006). Em testes comportamentais como o nado forçado, o tratamento com CBD induz um aumento de estratégias ativas de enfrentamento frente à exposição a um estresse agudo, uma resposta preditiva de um efeito do tipo-antidepressivo (ZANELATI et al., 2010). No teste de *marble-burying*, o tratamento agudo com CBD reduz significativamente o comportamento compulsivo de camundongos (CASAROTTO et al., 2010).

Em modelos animais baseados na exposição a estresse, Campos e colaboradores (2013) expuseram camundongos a 14 dias de estresse crônico imprevisível (*chronic unpredictable stress*, CUS) e trataram os animais durante os menos 14 dias com CBD (30mg/kg). O estresse induziu uma resposta do tipo-ansiosgênica em testes comportamentais de comportamentos associados à ansiedade e esse efeito foi significativamente reduzido nos animais estressados tratados com CBD (CAMPOS et al., 2013). Em um modelo de exposição crônica a estresse de restrição, o tratamento com CBD reduziu significativamente o comportamento do tipo-anedônico de animais estressados (HOU et al., 2022). Um efeito pró-hedônico do CBD também foi descrito em ratos expostos a um estresse heterotípico por 28 dias (GÁLL et al., 2020).

Frente a essas evidências do efeito benéfico do CBD no contexto de estresse crônico, durante a pandemia de COVID-19, os líderes de grupos de pesquisa do Centro de Pesquisa em Canabinóides (CPC), vinculado a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), reuniram esforços para investigar se o tratamento com CBD poderia ser benéfico para uma população severamente exposta aos fatores estressores associados

a pandemia: trabalhadores da saúde atuando linha de frente de combate à COVID-19. Foi observado que o tratamento com CBD por 4 semanas reduziu de maneira significativa sintomas de exaustão emocional, depressão e ansiedade nos participantes (CRIPPA et al., 2021). Os efeitos do CBD nesses indivíduos persistiram por 1 mês após a descontinuação do tratamento (SOUZA et al., 2022).

1.3. Neurobiologia de transtornos psiquiátricos associados a estresse: mecanismos do efeito farmacológico antiestresse

1.3.1. Neuroplasticidade e estresse: Onde e o que acontece?

O que acontece no cérebro frente a uma condição de sobrecarga alostática para gerar as alterações que levam a precipitação de sintomas de transtornos psiquiátricos? O cérebro é um dos principais responsáveis pela regulação de mecanismos alostáticos. Frente a exposição ao estresse, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o sistema nervoso autônomo coordenam respostas neuroendócrinas essenciais para garantir a alostase. Além disso, o sistema límbico, particularmente o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal (CPF), se comunicam com as estruturas que geram respostas neuroendócrinas, desempenham um papel crucial em funções cognitivas, emocionais e no controle de impulsividade, desta forma participando na consolidação, evocação e interpretação de experiências prévias, o que pode influenciar a reação a um determinado estímulo estressor (MCEWEN; GIANAROS, 2011).

Chiapelli e colaboradores (2017) definiram um índice de sobrecarga alostática a partir de 13 biomarcadores (cardiovasculares, metabólicos e endócrinos) e encontraram que tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes diagnosticados com

esquizofrenia, o índice de sobrecarga alostática se correlacionou negativamente com a espessura cortical média do cérebro (CHIAPPELLI et al., 2017). Zhou et al. (2021) encontraram resultados semelhantes e reportaram que das 6 regiões corticais em que altos índices de sobrecarga alostática foram associados a uma menor espessura cortical, 5 correspondiam a subregiões do CPF (ZHOU et al., 2021). Um elevado índice de sobrecarga alostática também foi associado a uma redução no volume hipocampal e uma alteração no padrão de conectividade do hipocampo (GLOVER; ELENA; MOHLMAN, 2008; HARE et al., 2020).

Essas alterações no volume e no padrão de conectividade do CPF e do hipocampo associadas a sobrecarga alostática evidenciam as respostas neuroplásticas desencadeadas pelo estresse nessas regiões encefálicas. Neuroplasticidade é um termo que se refere à capacidade do sistema nervoso de modificar e adaptar sua estrutura e função em resposta a estímulos intrínsecos ou extrínsecos (VOSS et al., 2017).

Uma das respostas plásticas consequentes do estresse crônico são alterações morfológicas nos neurônios. A exposição repetida ao estresse reduz a arborização dendrítica e o comprimento do dendrito apical de neurônios piramidais do CPF de roedores (BROWN; HENNING; WELLMAN, 2005; COOK; WELLMAN, 2004; RADLEY et al., 2004). Estresse repetido também causa uma atrofia de neurônios piramidais da região CA3 do hipocampo (MAGARIÑOS et al., 1996; VYAS et al., 2002). Bessa e colaboradores (2009) reportaram que o tratamento com o ISRS, fluoxetina, por 3 semanas foi capaz de atenuar o efeito do estresse sobre a arborização de neurônios granulares e piramidais das regiões do giro denteado e CA3 do hipocampo, respectivamente, mas não o efeito do estresse sobre a arborização dendrítica de neurônios piramidais do CPF (BESSA et

al., 2009). Similar ao efeito de ISRS, Fogaça e colaboradores (2018) descreveram que o tratamento com CBD foi capaz de prevenir a atrofia dendrítica promovida pelo estresse em neurônios granulares do giro denteado do hipocampo (FOGAÇA et al., 2018).

Estresse crônico também impacta o processo de sinaptogênese no CPF e hipocampo. Uma das formas de avaliar o processo de sinaptogênese, particularmente associado a neurotransmissão excitatória, é através da quantificação de espinhos dendríticos, pequenas protusões encontradas nos dendritos que se apresentam em diferentes morfologias e que correspondem a majoritária estrutura pós-sináptica de sinapses excitatórias. A exposição a estresse reduz significamente o número de espinhos dendríticos em neurônios piramidais do CPF e da região CA3 do hipocampo e em neurônios granulares do giro denteado do hipocampo (BESSA et al., 2009; FOGAÇA et al., 2018). Tanto ISRSs quanto o CBD parecem apresentar um efeito protetor, impedindo o efeito deletério do estresse sobre a formação de contatos sinápticos (BESSA et al., 2009; FOGAÇA et al., 2018).

Outra evidência do impacto do estresse na plasticidade sináptica é que em modelos animais o estresse crônico reduz significativamente a expressão de proteínas sinápticas no CPF (LI et al., 2011). A cetamina, um fármaco aprovado para o tratamento de transtornos de depressão em pacientes que não respondem a antidepressivos convencionais, gera um efeito do tipo-antidepressivo rápido após uma única administração em camundongos expostos a estresse e Li e colaboradores (2011) demonstraram que esse efeito foi acompanhado por um aumento tanto no número de espinhos dendríticos em neurônios piramidais como na expressão de proteínas sinápticas no CPF (LI et al., 2011).

Além de neurônios glutamatérgicos, outras populações neuronais também são afetadas em modelos animais de estresse repetido. Camundongos expostos a estresse repetido apresentaram uma redução na expressão de proteínas associadas a neurotransmissão GABAérgica no CPF. Os níveis de expressão dessas proteínas foram normalizados em camundongos estressados tratados com cetamina (GHOSAL et al., 2020). Nieto-Gonzalez e colegas (2015) definiram duas populações de ratos estressados: os que desenvolveram um comportamento do tipo-anedônico (chamados de susceptíveis) e os que não desenvolveram um comportamento do tipo-anedônico (chamados de resilientes). Em animais susceptíveis, mas não nos resilientes, foi observado uma disfunção na neurotransmissão GABAérgica evidenciada por uma redução de correntes inibitórias espontâneas em neurônios granulares do giro denteado do hipocampo. Além disso, os animais susceptíveis foram tratados com o ISRS escitalopram por 8 semanas e subdivididos em dois grupos: responsivos (nos quais o tratamento gerou um efeito pró-hedônico) e não-responsivos (nos quais o tratamento não alterou o comportamento do tipo-anedônico). Apenas nos animais estressados susceptíveis responsivos o tratamento com escitalopram foi capaz de restaurar a neurotransmissão GABAérgica no giro denteado (NIETO-GONZALEZ et al., 2015). Em conjunto, as respostas de plasticidade sináptica de neurotransmissões glutamatérgicas e GABAérgicas desencadeadas pelo estresse produzem um desbalanço excitatório/inibitório e podem estar diretamente associadas às alterações comportamentais desencadeadas por estresse e consistem, portanto, em um potencial alvo de intervenção farmacológica para transtornos psiquiátricos associados a estresse (LIU et al., 2020; OHTA et al., 2020; PACE et al., 2020; YOON et al., 2020).

Além de alterações em mecanismos relacionados à plasticidade sináptica, outro importante processo que é alvo tanto do estresse quanto de fármacos utilizados para o tratamento de transtornos psiquiátricos associados ao estresse é a neurogênese hipocampal adulta.

O processo de formação de novos neurônios no cérebro adulto está restrito a regiões específicas do encéfalo nas quais se encontram células precursoras neurais, os chamados nichos neurogênicos. Os dois nichos neurogênicos mais bem caracterizados no cérebro murino são a zona subventricular (ZSV) e a zona subgranular (ZSG) do giro denteado do hipocampo. Outros potenciais nichos neurogênicos são descritos, incluindo o hipotálamo, estriado, substância nigra, córtex e amígdala. Entretanto, as evidências variam com relação a existência de *pools* de células tronco neurais nessas regiões ou se novos neurônios poderiam ser formados nessas regiões a partir de células precursoras que migram da ZSV (JURKOWSKI et al., 2020).

Na ZSG encontram-se células tronco neurais do tipo glia-radial (tipo 1) que expressam marcadores como GFAP, Sox2 e Nestina. Essas células podem sofrer divisões celulares simétricas para gerar células filhas idênticas e manter o *pool* dessa população celular ou podem passar por divisões celulares assimétricas para gerar células progenitoras intermediárias do tipo-2, células com alta capacidade proliferativa que não expressam GFAP. As células do tipo-2 podem ser subdivididas com base na expressão do marcador doublecortina (DCX) em células com um fenótipo glial (tipo-2a, DCX-negativas) e células com fenótipo neuronal (tipo-2b; DCX-positivas). Células do tipo-2b podem, então, dar origem a células do tipo-3, as quais perdem a expressão de Sox2 e Nestina e mantêm a expressão de DCX. Células do tipo-3 tem uma capacidade

proliferativa limitada. Em conjunto, células dos tipos 1, 2 e 3 compreendem a população de células precursoras neurais na ZSG. As etapas seguintes no processo de neurogênese são pós-mitóticas. Nessa fase, os neurônios imaturos DCX-positivos migram para a camada granular e sofrem neuritogênese, desenvolvendo as características morfológicas de neurônios granulares. A etapa final do processo é a integração sináptica dos novos neurônios na circuitaria hipocampal. Uma vez que a maturação esteja completa, a expressão de DCX é perdida e os marcadores de neurônios imaturos NeuN e calbindina se mantêm (JURKOWSKI et al., 2020; KEMPERMANN; SONG; GAGE, 2015) (Figura 1).

Tratamento com antidepressivos ou CBD produzem efeitos opostos ao do estresse sobre o processo de neurogênese hipocampal adulta. Gould e colaboradores (1997) demonstraram que uma única exposição de musaranhos de árvore a um estresse psicossocial reduz a proliferação de células na ZSG (GOULD et al., 1997). A exposição repetida a estresse psicossocial reduz tanto a proliferação quanto a sobrevivência de novas células na ZSG (CZÉH et al., 2002). Exposição crônica a estresse homotípico de restrição e estresse heterotípico imprevisível também impactam negativamente o processo neurogênico no giro denteado do hipocampo (DE ANDRADE et al., 2013; PARUL et al., 2021; PHAM et al., 2003; RIBEIRO et al., 2022). Por outro lado, o tratamento repetido com ISRS tem um efeito pró-neurogênico na ZSG (MALBERG et al., 2000). Um aumento da neurogênese hipocampal adulta também é um efeito neuroplástico associado ao tratamento com CBD (CAMPOS et al., 2013; SCHIAVON et al., 2016; WOLF et al., 2010). ISRS e CBD também compartilham a capacidade de prevenir ou reverter os efeitos deletérios do estresse sobre o processo de neurogênese

hipocampal adulta (CAMPOS et al., 2013; FOGAÇA et al., 2018; JAYATISSA et al., 2006, 2008).

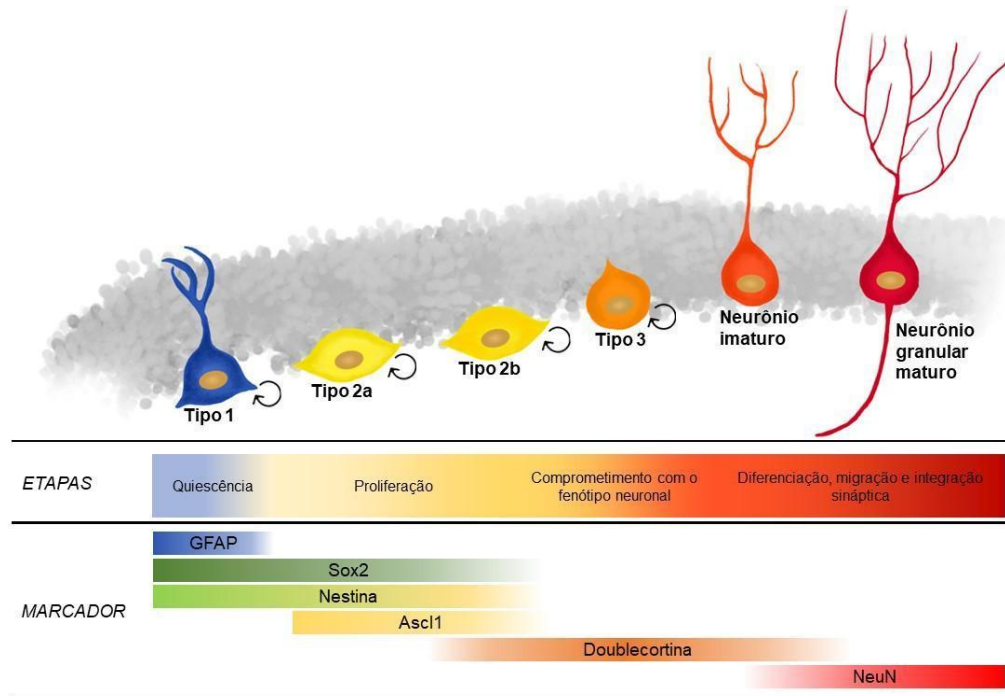


Figura 1. Representação esquemática do processo de neurogênese hipocampal adulta. O processo de neurogênese na zona subgranular do giro dentado do hipocampo envolve diferentes precursores neurais (células do tipo 1, tipo 2a, tipo 2b e tipo 3) que apresentam capacidade proliferativa e expressam diferencialmente marcadores como GFAP, Sox2, Nestina, Ascl1 e doublecortina (DCX). Nas fases pós-mitóticas, neurônios imaturos DCX-positivos adquirem progressivamente características morfológicas e eletrofisiológicas de neurônios granulares e migram em direção a camada granular do giro dentado. A maturação acontece frente a integração dos novos neurônios na rede sináptica hipocampal.

Além de respostas plásticas que envolvem a função neuronal, outras populações celulares no encéfalo tem sua função impactada significativamente pelo estresse e tratamento com fármacos com potencial terapêutico antiestresse. Czéh e colaboradores (2007) descreveram que ratos expostos a 5 semanas de estresse psicossocial apresentaram uma significativa redução da proliferação celular e na sobrevivência de células em proliferação no CPF, uma resposta que foi prevenido pelo

tratamento com o ISRS fluoxetina. Entre 63-80% das células em proliferação expressavam o proteoglicano de condroitina-sulfato *neural-glia 2* (NG2), um marcador de uma população de células da glia comumente denominadas como células precursoras de oligodendrócitos (CPO) (CZÉH et al., 2007).

As CPO (também chamadas de células NG2 ou polidendrócitos) compreendem uma população glial com alta capacidade proliferativa presentes tanto na substância branca quanto na substância cinzenta do cérebro (GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013). Além de sua função como precursoras de oligodendrócitos, células da glia responsáveis pelo processo de mielinização, células NG2 desempenham um papel de integrar e modular a atividade neuronal por receber contatos sinápticos diretos de neurônios inibitórios e excitatórios e sintetizar fatores neuromoduladores (BERGLES et al., 2000; LIN; BERGLES, 2004; SAKRY et al., 2015). Ademais, estudos propõem que, além da capacidade de se diferenciar em oligodendrócitos, células NG2 também poderiam ser precursoras de populações neuronais glutamatérgicas e GABAérgicas (DAYER et al., 2005; GUO et al., 2010).

A exposição ao estresse altera a proliferação e a diferenciação de CPO em diferentes regiões cerebrais, dependendo da duração do estresse. As alterações nessa população celular são acompanhadas por prejuízo no processo de mielinização em animais expostos a estresse (BIREY et al., 2015; CHEN et al., 2023; KOKKOSIS et al., 2022; POGGI; ALBIEZ; PRYCE, 2022). Por outro lado, o tratamento com ISRS contrapõe os efeitos do estresse em reduzir a proliferação de células da linhagem oligodendrocítica no CPF (CZÉH et al., 2007; ELSAYED et al., 2012) e tanto ISRSs quanto CBD parecem exercer efeitos protetores sobre a sobrevivência, diferenciação e proliferação de CPO

(CHAO et al., 2021; GHAREGHANI et al., 2017; KODAMA; FUJIOKA; DUMAN, 2004; MECHA et al., 2012).

Existem evidências que os efeitos comportamentais do tratamento com ISRS ou CBD são dependentes das alterações neuroplásticas promovidas por esses fármacos em modelos animais de estresse crônico. Santarelli e colaboradores (2003) descreveram que o efeito do tipo-ansiolítico da fluoxetina em camundongos estressados foi abolido em animais nos quais o efeito pró-neurogênico do ISRS foi prevenido através da exposição da ZSG a radiação X (SANTARELLI et al., 2003). Surget e colaboradores (2011) utilizaram uma metodologia semelhante para caracterizar que o tratamento com fluoxetina reestaura o feedback negativo do eixo HPA em animais estressados de uma forma dependente do processo de neurogênese hipocampal (SURGET et al., 2011). De modo semelhante, Campos e colaboradores (2013) demonstraram que o tratamento com CBD não induziu um efeito do tipo-ansiolítico em camundongos estressados nos quais o efeito protetor do CBD sobre neurogênese hipocampal adulta foi impedido através de uma abordagem de manipulação genética em camundongos transgênicos (GFAP-TK).

Um dos fenômenos que evidenciam a relação direta entre o efeito terapêutico de psicofármacos e seus efeitos neuroplásticos, é que o tempo para a indução de alterações neuroplásticas coincide com o tempo de tratamento necessário para que se observe um efeito terapêutico do tratamento. Bambico e Belzung (2012) propõem que o efeito antidepressivo de fármacos seria explicado por uma integração entre efeitos pró-sinaptogênicos e pró-neurogênicos no CPF e hipocampo. Fármacos como ketamina e escopolamina, que induzem um efeito antidepressivo de ação rápida, seriam capazes de modular de forma rápida a plasticidade sináptica no CPF e no hipocampo (BAMBICO;

BELZUNG, 2012). De fato, estudos indicam que o efeito do tipo-antidepressivo rápido da ketamina é dependente da indução de sinaptogênese nessa região encefálica (LI et al., 2010). De modo interessante, Sales e colaboradores (2019) propuseram que o CBD pode gerar um efeito do tipo-antidepressivo de ação rápida que está associado a um efeito pró-sinaptogênico no CPF (SALES et al., 2019). Essa ação inicial de fármacos com ação rápida sobre a plasticidade sináptica cortical and hipocampal, restauraria a função dessas estruturas sobre o controle de mecanismos alostáticos, permitindo uma regulação da atividade do eixo HPA e a modulação da neurotransmissão monoaminérgica através de aferentes corticais. Essas respostas poderiam, então, promover um efeito neuroprotetor sobre o processo de neurogênese hipocampal adulta, o que, por ser um processo mais lento, estaria relacionado com a manutenção do efeito terapêutico do tratamento. Fármacos monoaminérgicos, como é o caso de ISRSs, teriam uma maior latência para induzir seu efeito terapêutico por depender de um efeito direto sobre o processo de neurogênese hipocampal adulta e por modular respostas de plasticidade sináptica de forma mais lenta (BAMBICO; BELZUNG, 2012) (Figura 2).

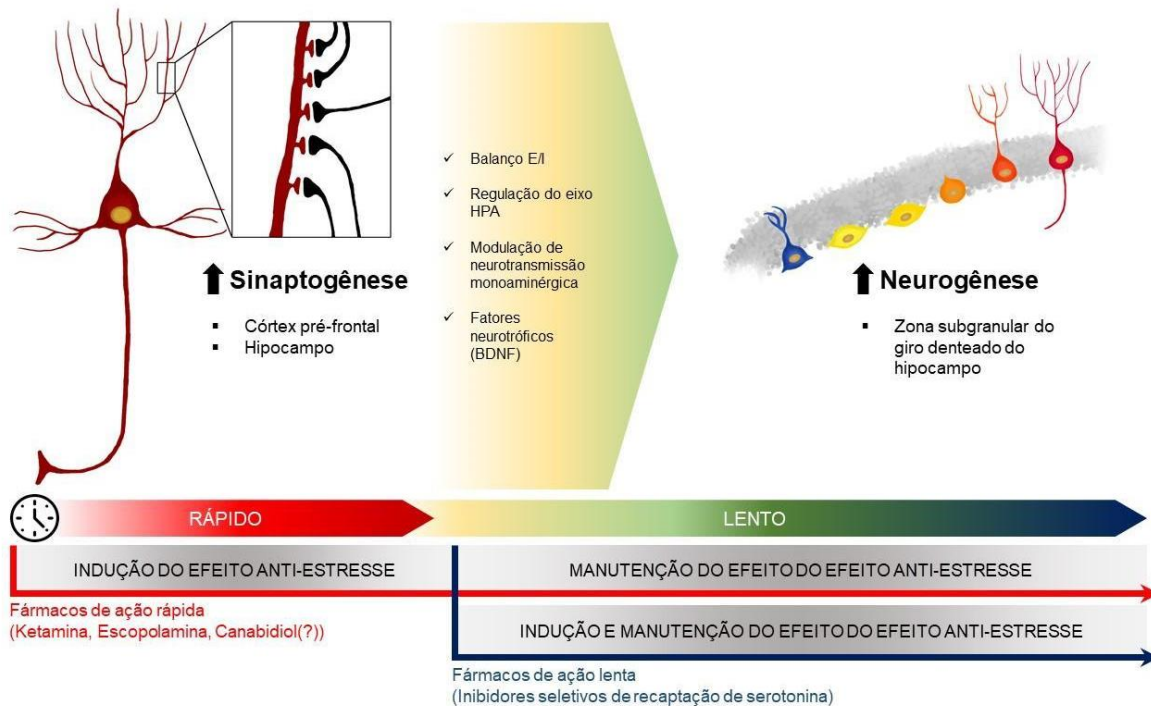


Figura 2. Efeito antiestresse de psicofármacos como uma função dos seus efeitos pró-sinaptogênicos e pró-neurogênicos. Baseado na hipótese de Bambico e Belzung (2012), o efeito de psicofármacos de rápida ação terapêutica em transtornos psiquiátricos associados a estresse seria associado a facilitação da plasticidade sináptica no córtex pré-frontal e hipocampo, auxiliando no restabelecimento de um balanço excitatório/inibitório, na regulação de mecanismos alostáticos neuroendócrinos mediados pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e regulando aferentes corticais que regulam neurotransmissores monoaminérgicas. Em conjunto, essas respostas conduzem a um efeito neuroprotetor sobre o processo de neurogênese hipocampal adulta, o que contribuiria para a manutenção do efeito terapêutico. Fármacos como inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS) não seriam capazes de gerar um efeito pró-sinaptogênico a atuariam mais diretamente no processo de neurogênese hipocampal, o que faz com que a janela temporal para que tais fármacos induzam um efeito terapêutico seja estendida.

Considerando o papel de respostas neuroplásticas no efeito antiestresse, entender as bases moleculares associadas ao efeito terapêutico e neuroplástico de psicofármacos pode ser uma estratégia importante na busca pela otimização do tratamento de transtornos psiquiátricos antiestresse. Uma vez que o foco deste estudo é o estudo do mecanismo de ISRS e do CBD, no tópico seguinte falaremos em potenciais alvos

moleculares de ambos que podem estar relacionados com a modulação de respostas neuroplásticas no contexto de estresse.

1.3.2. O “endocanabinoidoma” na regulação de respostas neuroplásticas a estresse

Respostas neuroplásticas são orquestradas por uma série de fatores e sistemas de neurotransmissão e neuromodulação. Alguns desses sistemas podem ser alvos de psicofármacos como ISRS e CBD. Dentre esses sistemas, destacamos o chamado sistema endocanabinóide (SeCB).

O SeCB consiste em um sistema de neuromodulação cuja descoberta foi motivada pela gana de desvendar os alvos moleculares do THC. Entre o final dos anos 1980 e o início dos anos 90, foi descrito o primeiro receptor do SeCB: o receptor canabinóide do tipo 1 (CB1) (DEVANE et al., 1988; MATSUDA et al., 1990). Não muito tempo depois, o receptor canabinóide do tipo 2 (CB2) foi descrito (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). Ambos consistem em receptores metabotrópicos cuja via de sinalização canônica envolve a ativação da proteína Gi e a inibição da enzima adenilato ciclase. Dois dos ligantes endógenos mais bem caracterizados dos receptores canabinóides são o 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) e a N-araquidonoil-etanolamina (ou anandamida, AEA).

O 2-AG é um agonista pleno de ambos os receptores canabinóides, é sintetizado pela enzima diacilglicerol lipase (DAGL) e degradado pela enzima monoacilglicerol lipase (MAGL). Já a AEA é um agonista parcial de receptores canabinóides e é sintetizada pela enzima N-acilfosfatidiletanolamina fosfolipase D (NAPE-PLD) e alvo de degradação da enzima amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH). Os níveis teciduais de 2-AG são

usualmente na escala de centenas ou milhares de vezes superiores aos níveis de AEA (TSUBOI et al., 2018).

Outros mediadores lipídicos são gerados nas mesmas vias de biossíntese tanto de 2-AG quanto de AEA. Esses mediadores incluem 2-acil-gliceróis (que compartilham a via de síntese do 2-AG) e N-acil-etanolaminas (NAEs) e N-acil-aminoácidos e neurotransmissores (NAANs) (que compartilham a via de síntese da AEA). Esses mediadores não necessariamente possuem uma afinidade significativa por receptores canabinóides e, portanto, não são chamados de endocanabinóides, mas sim de ligantes do tipo-endocanabinóides (LTEs). Os LTEs, entretanto, compartilham outros alvos com os endocanabinóides clássicos, incluindo receptores de potencial transitório vanilóide (como TRPV1, TRPV2 e TRPV4), receptores ativados por proliferadores de peroxisoma (PPAR α e γ), receptores acoplados à proteína G órfãos (como GPR18, GPR55, GPR110 e GPR119) e canais de cálcio do tipo-T (Canais Ca_{v3}). Tanto os LTEs quanto os receptores não-canabinóides que são potencial alvo da ação de endocanabinóides e LTEs são enquadrados no conceito de SeCB expandido ou endocanabinoidoma (eCBoma), o qual também engloba enzimas que metabolizam os LTEs (Figura 3). O endocanabinoidoma compreende mais de 100 mediadores lipídicos, 20 enzimas e 20 receptores (CRISTINO; BISOGNO; DI MARZO, 2020; DI MARZO, 2020).

O eCBoma desempenha um papel importante na regulação de respostas neuroplásticas. O antagonismo de receptores CB1 ou a ou a inibição farmacológica das enzimas NAPE-PLD e DAGL prejudica a expressão de potenciação de longo prazo na região CA1 do hipocampo de camundongos. Esse efeito da sinalização do eCBoma sobre a plasticidade sináptica hipocampal foi mediada por uma supressão da inibição de

sinapse GABAérgicas, evidenciando o papel do eCBoma na regulação de respostas de plasticidade sináptica e controle do balanço inibitório/excitatório (LEMTIRI-CHLIEH; LEVINE, 2022). O eCBoma também participa na coordenação da proliferação de precursores neurais e sobrevivência de novos neurônios na ZNG (AGUADO et al., 2005; PALAZUELOS et al., 2012; SCHUELE et al., 2020; WOLF et al., 2010).

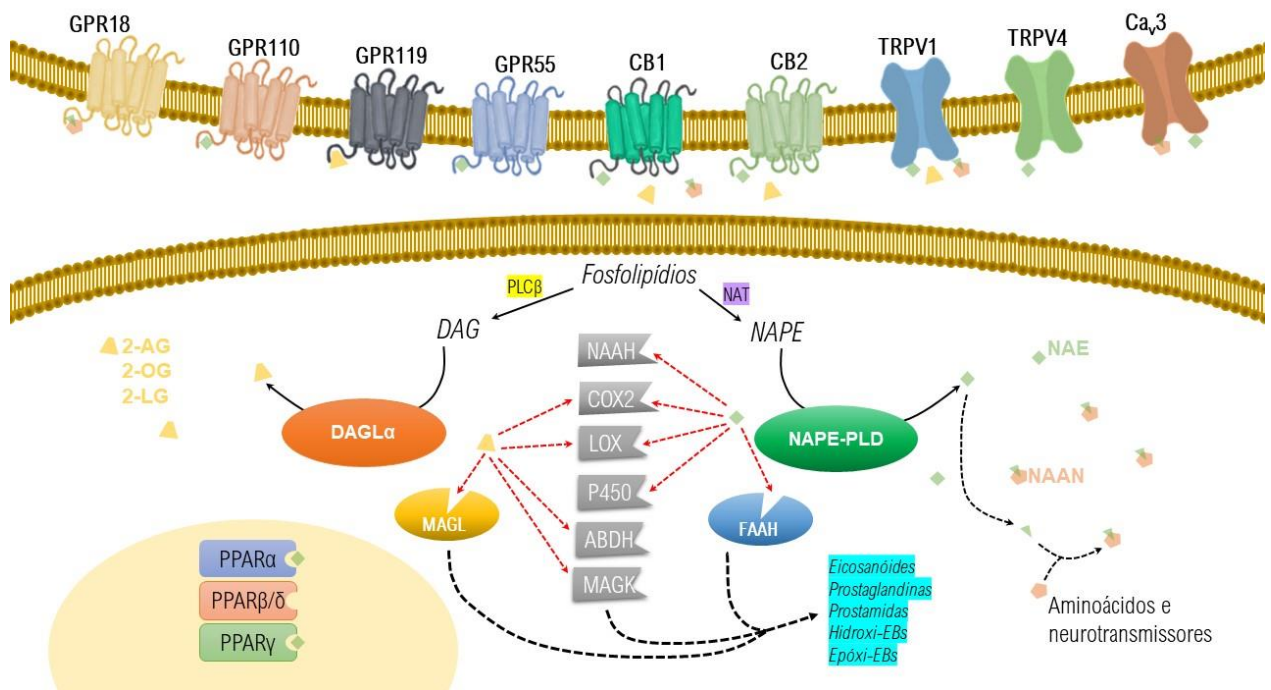


Figura 3. Representação esquemática simplificada do Endocanabinoidoma. O endocanabinoidoma compreende não só os componentes clássicos do sistema endocanabinóide, como também ligantes lipídicos que compartilham vias de síntese com os endocanabinóides clássicos (anandamida e 2-AG), vias de degradação que não apenas os mediados por MAGL e FAAH e outros receptores como potenciais alvos de ligantes canabinóides que não apenas CB1 e CB2, incluindo GPR18, GPR110, GPR119, GPR55, TRPV1, TRPV4 e canal de cálcio Ca_v3 .

Hill e colaboradores (2010) demonstraram que a exposição aguda e repetida a estresse de restrição reduz os níveis de AEA no hipocampo e CPF de ratos (HILL et al., 2010). Manipulações farmacológicas dos níveis de AEA sugeriram que essa redução nos níveis do endocanabinóide são necessárias para que ocorra o aumento nos níveis de

corticosterona em resposta ao estresse. Em humanos expostos a um protocolo de condicionamento ao medo, uma maior resposta fisiológica a estresse, medida através da avaliação da atividade eletrodérmica como um parâmetro que reflete a ativação do sistema nervoso simpático, foi correlacionada com menores níveis plasmáticos de AEA e 2-AG (SPOHRS et al., 2022).

Petrie e colaboradores (2022) utilizaram diferentes estratégias farmacológicas para modular a função do receptor CB1 e das enzimas de síntese de endocanabinóides e LTEs. O antagonismo farmacológico da atividade induzida por agonista e da atividade constitutiva do receptor CB1 induziu um fenótipo do tipo-estressado em camundongos, com aumento na atividade do eixo HPA e de comportamentos repetitivos. O mesmo foi observado frente ao antagonismo apenas da atividade de receptor CB1 induzida por agonista, indicando que o papel de CB1 é dependente de uma liberação tônica de ligantes endógenos e não se deve a uma atividade constitutiva do receptor. A inibição da biossíntese de AEA, NAEs e NAANs através de uma única administração de LEI401 (inibidor da enzima NAPE-PLD) também mimetiza os efeitos neuroendócrinos e comportamentais do estresse (PETRIE et al., 2022).

Yasmin e colaboradores (2020) demonstraram que o aumento da sinalização mediada pela AEA, através da administração de um inibidor da FAAH, previne o efeito do estresse em aumentar a frequência de disparo de neurônios na amígdala basolateral (YASMIN et al., 2020). Füsse e colaboradores (em revisão - *Frontiers in Pharmacology*) demonstraram que o tratamento com um inibidor da FAAH aumentou o número de células expressando o marcador de neurônios imaturos DCX no giro denteado do hipocampo de camundongos estressados. Ademais, camundongos submetidos a um estresse de

privação de sono por 96h apresentam uma redução da proliferação celular e do número de células expressando o marcador de precursores neurais, nestina, na ZSG do hipocampo, um efeito atenuado pelo tratamento com a NAAN N-acetil-serotonina (SOMPOL et al., 2011). Kondev e colaboradores (2022) demonstraram que a deleção de DAGL α promove um fenótipo de resiliência a estresse (KONDEV et al., 2023).

Fármacos com potencial ação terapêutica antiestresse interferem com a sinalização mediada pelo eCBoma. O tratamento crônico com escitalopram aumenta os níveis de 2-AG, AEA e outras NAEs no hipocampo de ratos, além de aumentar a expressão dos receptores CB1 e CB2 (SMAGA et al., 2014, 2017). O aumento dos níveis de AEA frente ao tratamento com CBD é uma resposta consistentemente demonstrada em diferentes modelos (BISOGNO et al., 2001; CAMPOS et al., 2013; LEWEKE et al., 2012; WATANABE et al., 1996). Leishman e colaboradores (2018) demonstraram que uma única administração de CBD gerou um aumento nos níveis de NAEs e NAANs em diferentes regiões cerebrais. Entretanto, esse efeito do CBD não foi observado em animais que não expressavam a enzima NAPE-PLD (LEISHMAN et al., 2018).

O antagonismo de receptores CB2 preveniu os efeitos pró-neurogênicos do ISRS escitalopram em animais expostos a 21 dias de estresse e tratamento (RIBEIRO et al., 2022). Ribeiro e colaboradores (em revisão) demonstraram que o efeito pró-proliferativo do escitalopram na ZSG de camundongos estressados foi bloqueado em animais tratados com o agonista inverso CB1 AM251. De modo interessante, tanto os efeitos neuroplásticos quanto os efeitos comportamentais antiestresse do CBD em camundongos expostos a estresse crônico heterotípico foram dependentes da atividade de receptores canabinóides CB1 e CB2 (CAMPOS et al., 2013; FOGAÇA et al., 2018).

Ademais, o tratamento com CBD em camundongos estressados reduziu a expressão hipocampal da enzima FAAH (FOGAÇA et al., 2018).

Dessa forma, o eCBoma modula respostas neuroplásticas, está relacionado ao controle de mecanismos alostáticos e é alvo da ação de fármacos com potencial terapêutico em transtornos psiquiátricos associados a estresse, especialmente escitalopram e CBD.

1.4. Combinação de escitalopram e CBD em modelos de estresse repetido: envolvimento de processos plásticos no CPF

Conforme exposto até aqui: (1) fármacos ISRS são amplamente utilizados na clínica para o tratamento de transtornos psiquiátricos associados a estresse; (2) os ISRS possuem limitações relevantes na clínica, incluindo uma latência significativa para que o tratamento induza um efeito terapêutico; (3) o CBD pode gerar efeitos comportamentais e neuroplásticos semelhantes ao de ISRS em modelos animais e (4) CBD e ISRS podem atuar através de mecanismos em comum, nós hipotetizamos que a combinação com CBD poderia ser uma estratégia para otimizar a ação antiestresse de ISRSs.

A combinação de fármacos é uma estratégia comumente utilizada na clínica como uma alternativa para pacientes que não respondem de maneira satisfatória à monoterapia. Uma das vantagens da adição de uma terapia adjunta é a possibilidade de utilizar doses reduzidas de cada fármaco, reduzindo, conseqüentemente, a incidência ou a severidade de efeitos colaterais. Em um estudo inicial, nós caracterizamos que escitalopram (20mg/kg) induz um efeito antiestresse em camundongos estressados após 2 semanas de estresse e tratamento. Ao combinar metade dessa dose de escitalopram

com uma dose subefetiva de CBD, nós observamos um efeito do tipo-ansiolítico após apenas 7 dias de tratamento em camundongos expostos a 10 dias de estresse. O efeito da combinação de escitalopram e CBD foi observado tanto em camundongos expostos a um estresse psicossocial homotípico quanto em camundongos expostos a um protocolo de estresse heterotípico (Figura 4).

(SCARANTE et al., 2021)

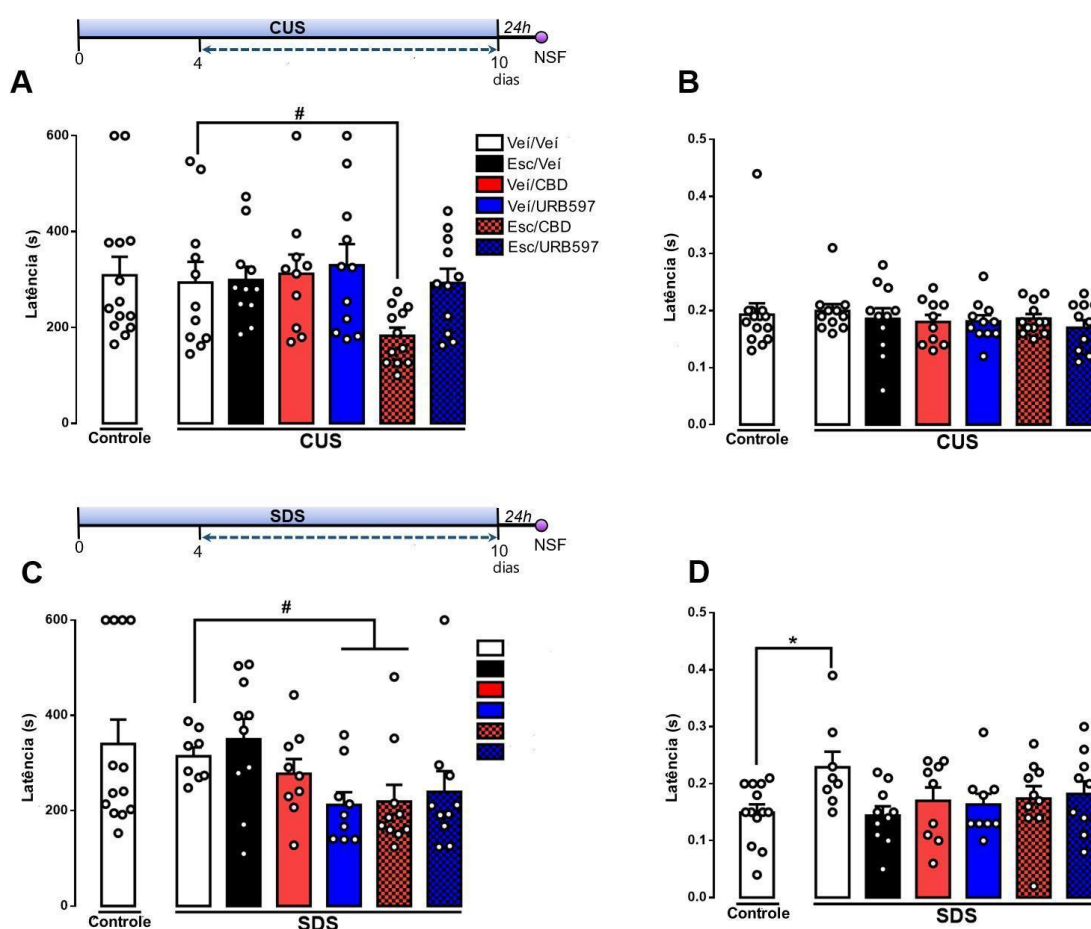


Figura 4. A combinação de escitalopram e canabidiol induz um efeito do tipo-ansiolítico após apenas 7 dias de tratamento em animais estressados. Latência para início do consumo de alimento no teste de supressão da alimentação pela novidade (A e C) e consumo de alimento na caixa moradia (B e D) de camundongos expostos a 10 dias de estresse heterotípico (estresse crônico imprevisível, CUS) (A e B) ou a 10 dias de estresse homotípico (estresse de derrota social, SDS) (C e D) e tratados por 7 dias com as combinações de veículo ou escitalopram (10mg/kg) com veículo, CBD (7,5mg/kg) ou URB597 (inibidor da FAAH; 0,1mg/kg). (*) indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (não estressado) (teste t de amostras 51

independentes); (#) indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo estressado tratado apenas com veículo (ANOVA de duas vias; ANOVA de uma via seguido de teste de Duncan).

Os efeitos comportamentais da combinação de escitalopram e CBD foram acompanhados pelo aumento na expressão das proteínas pré-sinápticas sinaptofisina e sinaptotagmina no CPF (SCARANTE et al., 2021). Essa resposta está de acordo com a hipótese de Bambico e Belzung (2012) descrita anteriormente. A combinação com CBD potencialmente acelera o efeito antiestresse do escitalopram por induzir um efeito pró-sinaptogênico no CPF. Entretanto, ainda é necessário caracterizar os mecanismos moleculares recrutados no CPF para induzir os efeitos da combinação de escitalopram e CBD. Além disso, os efeitos da combinação de escitalopram e CBD em outras respostas neuroplásticas associadas ao efeito antiestresse de psicofármacos permanecem desconhecidos.

1.5. Hipótese

Considerando o exposto, nós hipotetizamos:

1. Que o efeito antiestresse da combinação de escitalopram e CBD é dependente do recrutamento da sinalização promovida por mediadores do eCBoma, especialmente mediadores cuja via de biossíntese depende da atividade da enzima NAPE-PLD, no CPF de camundongos.
2. Que a combinação de escitalopram e CBD pode modular a plasticidade sináptica, a plasticidade de CPOs no CPF e o processo de neurogênese hipocampal adulta em animais expostos a estresse repetido.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar o efeito antiestresse da combinação de escitalopram e CBD através de 3 perspectivas: (1) Mecanismos moleculares: avaliação do papel do ECBoma nos efeitos comportamentais desencadeados pelo tratamento; (2) Efeitos comportamentais antiestresse: investigação do efeito do tratamento em outras respostas comportamentais e em camundongos expostos a um maior período de estresse; e (3) Neuroplasticidade: elucidação de respostas plásticas desencadeadas pelo estresse e pelo tratamento.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar o papel de ligantes do ECBoma sintetizados pela enzima NAPE-PLD no efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD em camundongos estressados;
- Avaliar o papel de ligantes do ECBoma sintetizados pela enzima DAGL α no efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD em camundongos estressados;
- Caracterizar as respostas comportamentais de animais expostos a 10 dias de estresse heterotípico e tratados com a combinação de escitalopram e CBD no *splash-test*;
- Investigar o efeito comportamental do tratamento com escitalopram e CBD por apenas 7 dias em camundongos expostos a 21 dias de estresse heterotípico;
- Avaliar os espinhos dendríticos de neurônios piramidais no CPF de camundongos estressados tratados com a combinação de escitalopram e CBD

- Avaliar o número de células CamKII-positivas e PV-positivas e o padrão de expressão de NAPE-PLD nessas células no CPF de camundongos estressados tratados com a combinação de escitalopram e CBD;
- Investigar a plasticidade de CPOs em camundongos estressados e tratados com a combinação de escitalopram e CBD;
- Caracterizar o efeito do estresse e da combinação de tratamentos sobre a proliferação de células precursoras neurais no giro denteado do hipocampo.

MATERIAIS E MÉTODO

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl6J (10-12 semanas de idade, 22-28g). Para os experimentos 1-3 os animais foram provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB – Universidade Estadual de Campinas) e mantidos no biotério do departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Após serem transportados do CEMIB até o Prédio Central da Medicina (FMRP/USP) pelo serviço de transporte disponibilizado pela USP/Ribeirão Preto, os animais foram mantidos para ambientação por, no mínimo, um mês no biotério do Departamento de Farmacologia da FMRP antes de serem submetidos a qualquer procedimento experimental, apenas com trocas regulares de água, comida e higienização das caixas. Para o experimento 4, os camundongos foram criados e mantidos no biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em condições de temperatura e umidade controladas e em ciclo claro/escuro de 12h/12h (início período iluminado: 7h; início período escuro: 19h), com ração e água *ad libitum*. Todos os protocolos foram conduzidos de acordo com as resoluções do comitê de ética em uso de animais (Protocolo nº032/2015-1 e nº47/2019).

3.2. Drogas

Foram utilizadas:

- Canabidiol (BSPG), Dose: 7,5mg/kg (i.p), diluído em 2% Tween 80 em salina;

- Oxalato de escitalopram, ISRS (Pratti Donaduzzi), Dose: 10mg/kg (i.p.), diluído em salina;
- Cloridrato de cetamina (Syntec; Agener), Dose: 375mg/kg, diluído em salina;
- Cloridrato de Xilazina 2% (Syntex), Dose: 25mg/kg, diluído em salina;
- Tribromoetanol (T484402; Sigma-Aldrich), Dose: 250mg/kg;
- Lidocaína (Lidostesin, Harvey), injeção local;
- Flunixinina meglumina, (Banamine®, Schering-Plough), Dose: 0.25mg/kg (s.c.);
- Amoxicilina (CIMED), Dose: 50mg/kg (v.o.; 0,25mg/ml).

3.3. Vetores virais

Foram empregados vetores lentivirais para expressão do sistema CRISPR/Cas9 e de uma sequência de RNA guia direcionando como alvo o gene que codifica a enzima NAPE-PLD (responsável pela síntese de AEA) ou o gene que codifica a enzima DAGL α (responsável pela síntese de 2-AG). Para ambos os alvos o vetor consistiu em um sistema Gecko2 lentiguido All in One com a co-expressão de Cas9 e tGPF direcionada pelo promotor EF1 α e a expressão do RNA guia direcionada pelo promotor U6 (Gecko2 lentiguido-tGFP, U6-gRNA/EF1a-tGFP; NAPE-PLD Target ID: MM0000610807; NAPE-PLD Exon alvo: 3; DAGL α Target ID: MM0000628057; DAGL α Exon alvo: 10; Sigma-Aldrich). Como controle, foi utilizado o vetor lentiviral CRISPR-lenti Non-targeting Control Plasmid (Sigma-Aldrich). O sistema é similar ao utilizado para os alvos NAPE-PLD e DAGL α , com a diferença que o RNA guia consiste em uma sequência scramble, que não afeta nenhum alvo conhecido no genoma de camundongos. Nesse plasmídeo controle,

a co-expressão de Cas9, GFP e puromicina também é direcionada pelo promotor EF1 α e a expressão da sequência inespecífica (*scramble*) (também é direcionada pelo promotor U6).

A base da metodologia empregada é que, após a indução da expressão da nuclease associada ao CRISPR (Cas9) nas células transfectadas pelo vetor viral, essa nuclease forma um complexo com o RNA guia para clivagem do DNA na sequência alvo específica direcionada pelo RNA guia logo após um motivo PAM (protospacer adaptor motif). A clivagem promovida pela Cas9 gera quebras de dupla-fita, ativando mecanismo de reparo do DNA por união de extremidade não-homóloga (NHEJ), promovendo a mutação do sítio alvo, com consequente inativação do gene.

3.4. Cirurgia estereotáxica

Os animais com 8 semanas de idade foram anestesiados com tribromoetanol e posicionados no aparato de estereotaxia (BIO-ST8001 BIOSEB®). As coordenadas utilizadas para o CPF foram (a partir do Bregma): anteroposterior: (+)1,5; mediolateral: (\pm)0,4; dorsoventral: (-)2,5. A injeção de 200 μ l de vetor direcionando a deleção via CRISPR-Cas9 utilizando como DNA guia uma sequência para DAGL α , para NAPE-PLD ou uma sequência *scramble* foi realizada com uma bomba de infusão utilizando uma seringa Hamilton. A velocidade de injeção foi de 20nl/min e, após 2 minutos de espera, a agulha de injeção foi lentamente retirada do local. A injeção foi realizada de modo bilateral (200 μ l por hemisfério). Em seguida, o animal foi retirado do aparato, teve o local suturado com fio de nylon ou de seda 4.0 e foi colocado para recuperação em uma sala pós-cirúrgica. Os animais foram monitorados por pelo menos 2h após o procedimento

cirúrgico e 1h após despertarem da anestesia. Durante os 7 primeiros dias pós-cirúrgicos, todos os animais receberam tratamento antibiótico com amoxicilina na água de beber (MARX et al., 2014).

3.5. Estresse crônico imprevisível (CUS – *Chronic Unpredictable Stress*)

O modelo, adaptado de Wilner e colaboradores (1992), consistiu em submeter os animais diariamente a um dos seguintes estressores, de forma randomizada:

- (1) Maravalha molhada ou ausência de maravalha (20-24h)
- (2) Nado forçado (15 minutos)
- (3) Restrição de movimento por alojar os animais em tubo Falcon de 50mL adaptados com saída de ar (2h)
- (4) Caixa inclinada (*overnight*)
- (5) Inversão de ciclo claro/escuro (20-24h)
- (6) Ciclo claro/escuro intermitente (20-24h)
- (7) Privação de comida (20-24h)

O protocolo de estresse foi conduzido por 10 ou 21 dias. No protocolo de 10 dias, os animais foram submetidos aos estímulos estressores 4-7 uma única vez e aos estímulos 1-3 por duas vezes. No protocolo de 21 dias, os camundongos foram expostos 3 vezes a cada estímulo estressor.

3.6. Testes comportamentais

3.6.1. Novelty Supressed Feeding test (NSF)

O teste se baseia no fenômeno de hiponeofagia e foi conduzido conforme descrito previamente (DULAWA et al., 2004; DULAWA; HEN, 2005). O teste consiste em colocar

animais privados de comida por 22-24h em um novo ambiente que, no nosso experimento, consistiu em uma arena retangular (40 x 40 x 30cm) com aproximadamente 2cm maravalha. No centro dessa arena, um pellet de ração foi colocado acima de uma plataforma iluminada. O experimento foi conduzido em uma sala escura e a única fonte de luz iluminava apenas a plataforma com o pellet de ração. Foi mensurado o tempo despendido por cada animal antes de começar a comer o pellet de ração. Foi considerado o ato de começar a comer quando o camundongo segurava o pellet com as patas dianteiras e mordia o pellet. Foi estabelecido um tempo de corte de 600 segundos. Considerou-se como um efeito do tipo-ansiolítico a redução da latência para início do consumo da ração nesse contexto de neofobia. Como uma medida controle de apetite, o consumo de comida na caixa moradia foi mensurada por 5 minutos logo depois do teste.

3.6.2. *Splash-test*

O teste consiste em aplicar duas borrifadas de uma solução de sacarose 10% sobre o dorso. A viscosidade da solução desencadeia comportamentos de autolimpeza (*grooming*), comportamento estereotipado e repetitivo de roedores. Alterações no padrão, na quantidade e na qualidade do comportamento de autolimpeza neste teste podem ser preditivos de comportamentos do tipo-depressivos e uma resposta preditiva de um tipo-antidepressivo está, portanto, associada a uma restauração do padrão, da quantidade ou da qualidade desse comportamento. Foi avaliada a latência de início de início da autolimpeza, o tempo total e tempo parcial de autolimpeza gasto entre face e dorso e o tempo de limpeza passivo (quando o animal “mergulha” na maravalha para se limpar). O animal recebe as borrifadas de sacarose na sua caixa moradia e o seu comportamento é gravado por 6 minutos para posterior análise.

3.7. Procedimentos experimentais

3.7.1. *Expandindo o entendimento sobre os efeitos comportamentais e respostas neurobiológicas da combinação de escitalopram e CBD em camundongos estressados*

3.7.1.1. EXPERIMENTO 1: Efeito da combinação de escitalopram e CBD sobre o comportamento do tipo-depressivo de camundongos expostos a 10 dias de estresse

Camundongos machos foram divididos nos seguintes grupos experimentais: (1) Controle (não-estressado) Veículo/Veículo; (2) CUS Veículo/Veículo; (3) CUS Escitalopram/Veículo; (4) CUS Veículo/CBD; (5) CUS Escitalopram/CBD. O protocolo de CUS foi conduzido por 10 dias e o tratamento foi conduzido concomitantemente aos últimos 7 dias do protocolo de estresse. No dia seguinte ao último dia de estresse e tratamento, as respostas comportamentais dos animais foram avaliadas no *splash-test*. Nesse protocolo, todos os animais receberam uma injeção (i.p.) de BrdU (200mg/kg) no 4º dia de estresse e 1º dia de tratamento. Os animais foram eutanasiados 3 dias após o teste comportamental e os tecidos foram coletados e processados para a realização de imunoenaios (Figura 5).

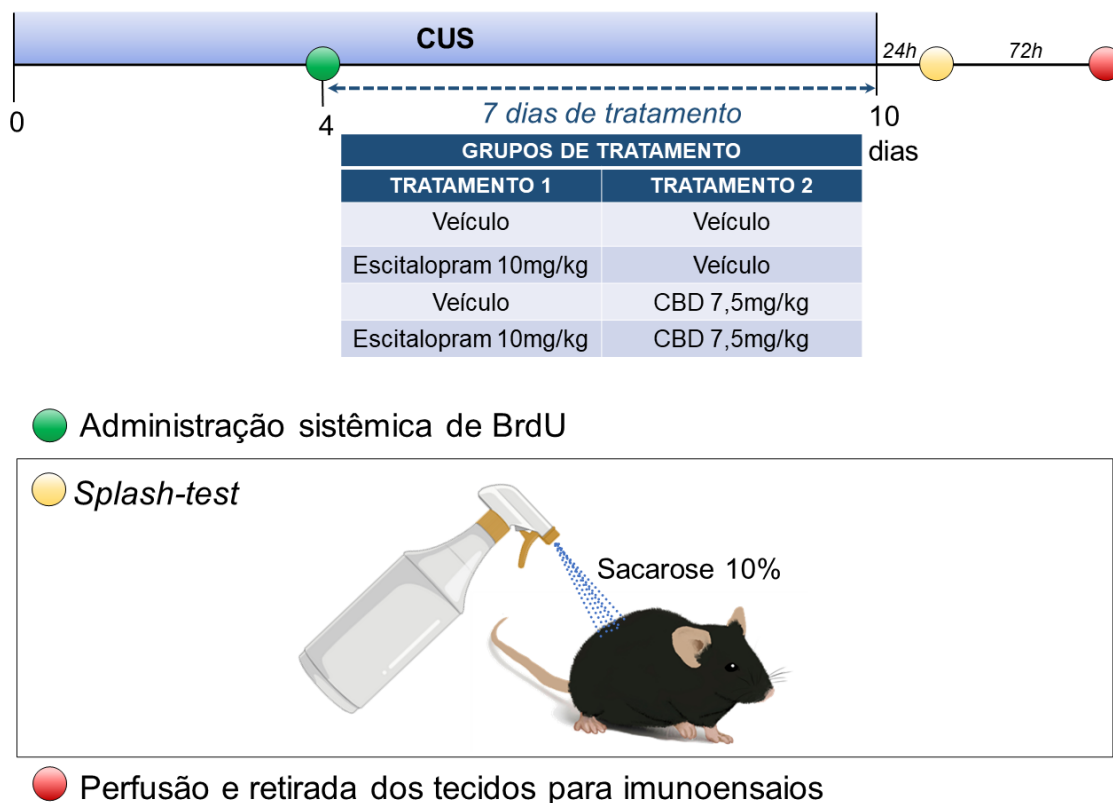
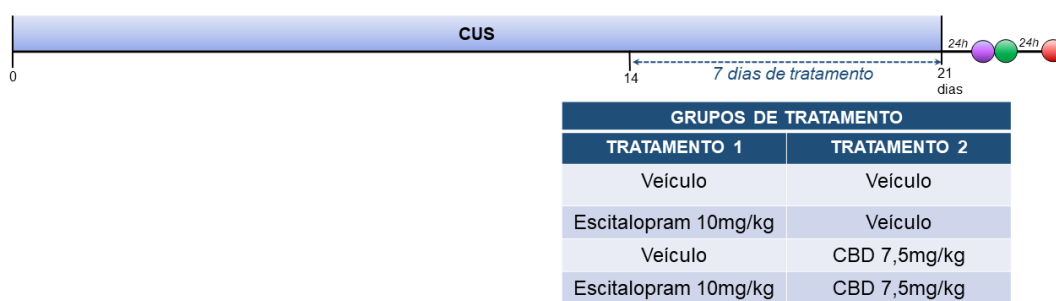


Figura 5. Procedimento experimental conduzido para o Experimento 3. Camundongos machos a 10 dias de estresse crônico imprevisível (CUS) e 7 dias de tratamento com as combinações de veículo ou escitalopram (10mg/kg) com veículo ou canabidiol (CBD; 7,5mg/kg). Os animais receberam uma única administração sistêmica de BrdU (200mg/kg, i.p.) no primeiro dia de tratamento. Vinte e quatro horas depois do último dia de estresse e tratamento, a resposta comportamental dos animais foi avaliada no *splash-test*. Setenta e duas horas após o teste comportamental, os animais foram eutanasiados e tiveram seus encéfalos processados para ensaios de imuno-histoquímica.

3.7.1.2. EXPERIMENTO 2: Efeitos comportamentais da combinação de escitalopram e CBD sobre as respostas comportamentais de camundongos expostos a 21 dias de estresse

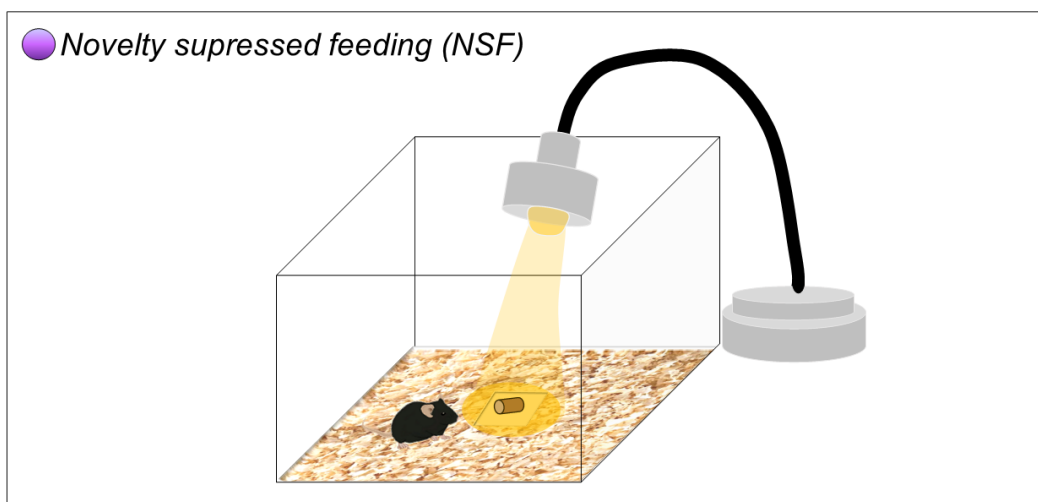
Camundongos machos foram divididos nos seguintes grupos experimentais: (1) Controle (não-estressado) Veículo/Veículo; (2) CUS Veículo/Veículo; (3) CUS Escitalopram/Veículo; (4) CUS Veículo/CBD; (5) CUS Escitalopram/CBD. O protocolo de

CUS foi conduzido por 21 dias e o tratamento foi conduzido concomitantemente aos últimos 7 dias do protocolo de estresse. No dia seguinte ao último dia de estresse e tratamento, as respostas comportamentais dos animais foram avaliadas no NSF. Nesse protocolo, todos os animais receberam uma injeção (i.p.) de BrdU (200mg/kg) no dia do teste comportamental e eutanasiados no dia seguinte para coleta dos tecidos para imunohistoquímica (Figura 6).



● Administração sistêmica de BrdU

● *Novelty supressed feeding (NSF)*



● Perfusão e retirada dos tecidos para imunoensaios

Figura 6. Procedimento experimental conduzido para o Experimento 4. Camundongos machos a 21 dias de estresse crônico imprevisível (CUS) e 7 dias de tratamento com as combinações de veículo ou escitalopram (10mg/kg) com veículo ou canabidiol (CBD; 7,5mg/kg). Os animais receberam uma única administração sistêmica de BrdU (200mg/kg, i.p.) no dia do teste comportamental. Vinte e quatro horas depois do último dia de estresse e tratamento, a resposta comportamental dos animais foi avaliada no *novelty supressed feeding* (NSF). Vinte e quatro horas após o teste comportamental, os

animais foram eutanasiados e tiveram seus encéfalos processados para ensaios de imunohistoquímica.

3.7.2. O ECBoma no CPF desempenha um papel importante no efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD?

3.7.2.1. EXPERIMENTO 3: Papel da enzima NAPE-PLD no efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD em camundongos estressados

Para investigar o papel de mediadores de ECBoma sintetizados pela enzima NAPE-PLD nos efeitos comportamentais da combinação de escitalopram e CBD em animais estressados, camundongos machos receberam uma injeção bilateral intra-CPF de vetores virais carreando um constructo que induz o *knock-out* mediado por um sistema CRISPR-Cas9 de parte do gene que sintetiza a enzima NAPE-PLD, gerando a deleção da síntese da enzima em células transfectadas. Uma vez que nem todas as células da região são alvo do lentivírus, o fenômeno resultante é a redução (*knock-down* – KD) da expressão da enzima no CPF. Os grupos que receberam a injeção dos vírus são denominados NAPE-PLD KD. Como controle, animais receberam injeção intra-CPF de vetores virais que apenas induziam a expressão da proteína repórter eGFP (grupos wild-type - WT). Quinze dias após a injeção estereotáxica, camundongos foram submetidos a 10 dias de CUS e 7 dias de tratamento com Veículo ou com a combinação de escitalopram (10mg/kg) e CBD (7,5mg/kg). Vinte e quatro horas após o último dia de estresse e tratamento, a resposta comportamental dos animais foi avaliada no NSF. Logo após o fim dos protocolos, os animais foram eutanasiados e os encéfalos foram retirados e mantidos por 12h em uma solução de 6% Sacarose e 4% paraformaldeído (PFA). Os cérebros foram congelados para posteriormente serem seccionados (20µm) em um

criostato. Os cortes foram imediatamente montados em lâminas. Para o controle de sítio de injeção, foram detectadas células eGFP-positivas no CPF utilizando um microscópio de epifluorescência (BX53, Olympus, Tóquio, Japão). De parte dos encéfalos, o CPF foi dissecado logo após a eutanásia dos animais para a quantificação de AEA e 2-AG (Figura 7).

3.7.2.2. EXPERIMENTO 4: Papel da enzima DAGL no efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD em camundongos estressados

Para investigar o papel de mediadores de ECBoma sintetizados pela enzima DAGL α nos efeitos comportamentais da combinação de escitalopram e CBD em animais estressados, o protocolo foi conduzido de maneira semelhante ao descrito no tópico anterior. A diferença é que os camundongos machos receberam uma injeção bilateral intra-CPF de vetores virais carreando um constructo que induz o *knock-out* mediado por um sistema CRISPR-Cas9 de parte do gene que sintetiza a enzima DAGL α , gerando a deleção da síntese da enzima em células transfectadas nos grupos DAGL α KD. Como controle, os animais receberam injeção intra-CPF de vetores virais que apenas induziam a expressão da proteína repórter eGFP (grupos WT). O protocolo de estresse, tratamento e o teste comportamental, bem como as etapas de processamento dos tecidos para controle do sítio de injeção e análises neuroquímicas foram conduzidos da mesma forma que no tópico anterior (Figura 7).

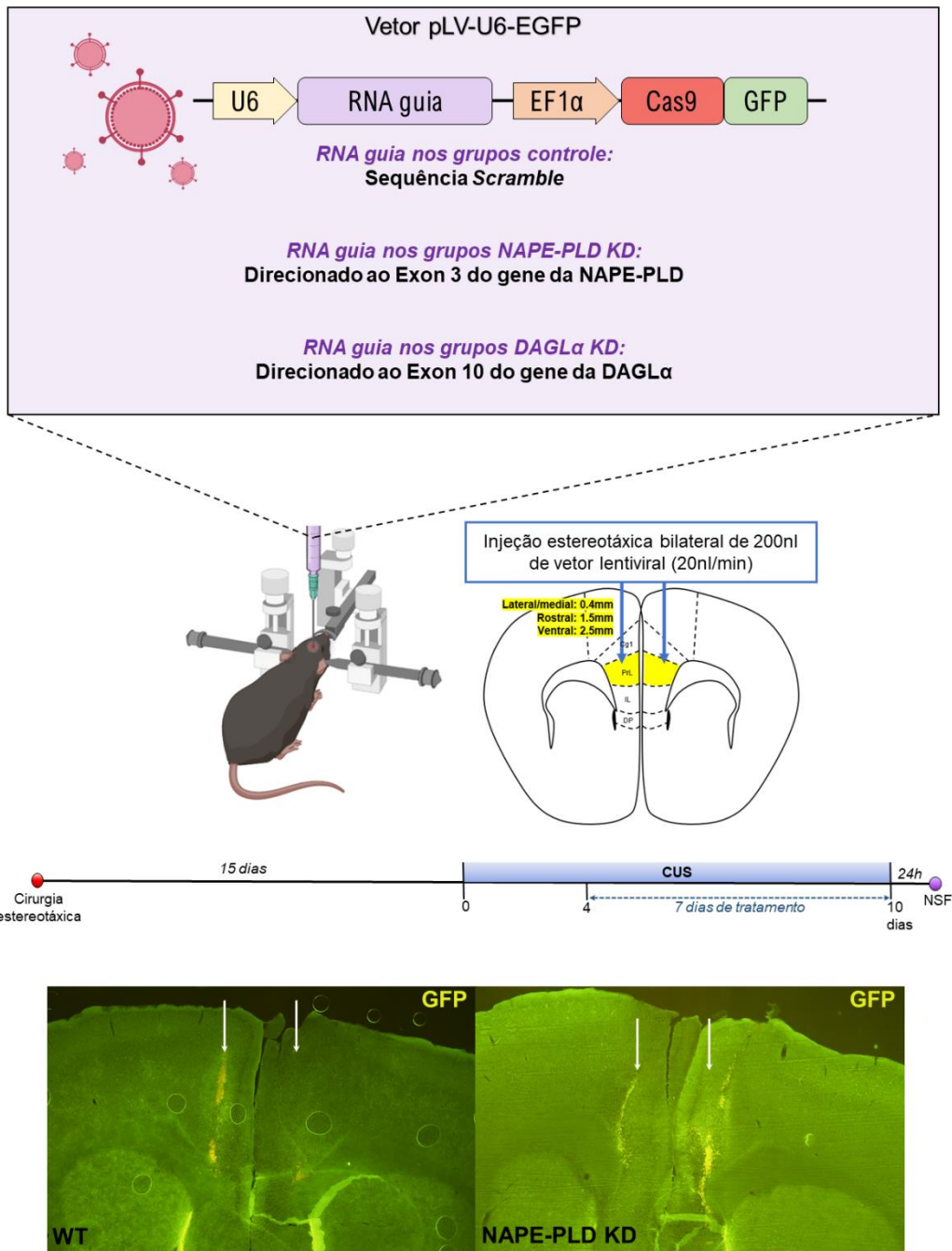


Figura 7. Procedimento experimental conduzido para os Experimentos 1 e 2. Camundongos machos foram submetidos a injeção estereotáxica bilateral intra-córtex pré-frontal (CPF) de vetor lentiviral controle ou vetor lentiviral que direcionava a deleção da enzima NAPE-PLD ou da enzima DAGL α . Quinze dias após a cirurgia, os animais foram submetidos a 10 dias de estresse crônico imprevisível (CUS) e 7 dias de tratamento com veículo ou com a combinação de escitalopram (10mg/kg) e canabidiol (7,5mg/kg). Vinte e quatro horas depois do último dia de estresse e tratamento, a resposta comportamental dos animais foi avaliada no *novelty suppressed feeding* (NSF). As imagens histológicas são representativas do controle de sítio de injeção avaliada através da detecção de células GFP-positivas.

3.8. Quantificação de endocanabinóides

As amostras de CPF total foram adicionadas com 10 pg de AEA-d8, homogeneizadas em H₂O/MeOH e purificadas conforme descrito anteriormente (BLIGH; DYER, 1959). Após a etapa de extração, as amostras foram secas, suspensas em 100 µl de MeOH e aplicadas na cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC–MS/MS). As fases móveis consistiram em água ou acetonitrila, ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. A condição do gradiente foi de 0 a 1 min, 5% em acetonitrila por 5 min, 70% em acetonitrila por 9,5 a 11 min, 98% em acetonitrila. Uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min e coluna Ascentis Express C8 (150 × 2,1 mm; 2,7 µm) foi empregada. A espectrometria de massa foi realizada no modo positivo para análise de MRMHR (monitoramento de reações múltiplas de alta resolução). Os resultados são expressos em pmol por mg de tecido (DE OLIVEIRA et al., 2020).

3.9. Técnica de Golgi

Para o método de impregnação por Golgi foi utilizado o *FD Rapid GolgiStain Kit* (FD NeuroTechnologies, INC) e o protocolo foi conduzido conforme instruções do fabricante. Brevemente, após a eutanásia dos animais, os cérebros foram retirados, imerso na solução de dicromato de potássio e mantido à temperatura ambiente por 10 dias. Em seguida, os tecidos foram transferidos para a solução de lavagem e estocados em temperatura ambiente por pelo menos 72 horas para depois serem seccionados em criostato em secções de 100µm e colocados em lâminas gelatinizadas. As secções foram mantidas hidratadas até o processamento, que consiste em completar a reação com cloreto de mercúrio e posterior processo de desidratação em etapas sucessivas de etanol

e xileno. A análise foi realizada em neurônios piramidais da camada II/III do CPF medial, selecionando 10 μm da porção inicial de dendritos terciários para realizar a quantificação e classificação de espinhos dendríticos após escaneamento no modo de reflexão do microscópio confocal (Leica TCS SPE) (SPIGA et al., 2011). O processo de classificação de morfologia dendrítica (em *stubby*, *thin*, *filopodia* ou *mushroom*) foi realizado conforme esquema representado na Figura 8.

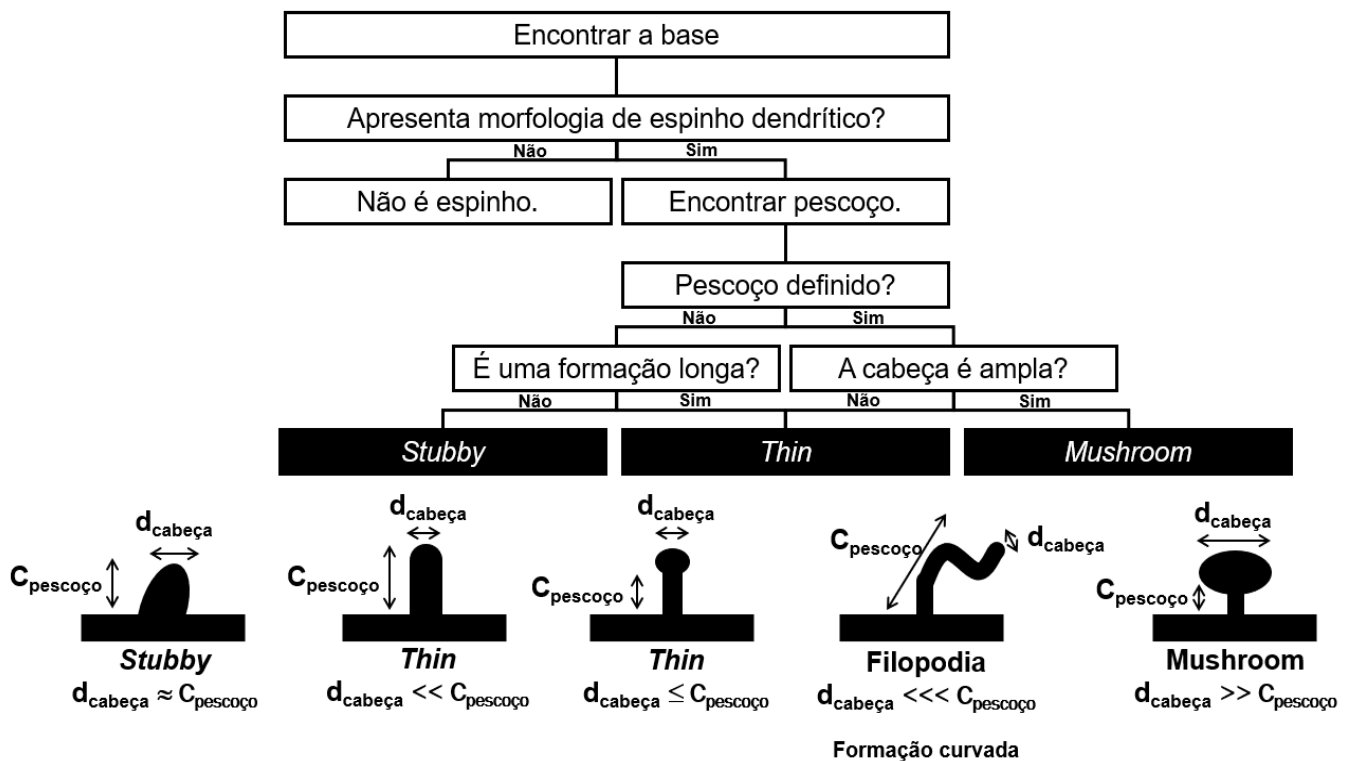


Figura 8. Critérios de classificação de espinhos dendríticos. Uma vez definido como um espinho dendrítico, a classificação será feita a partir da razão entre o comprimento do pescoço ($C_{\text{pescoço}}$) e o diâmetro da cabeça ($d_{\text{cabeça}}$) da formação (Figura retirada de Scarante, 2018).

3.10. Imunohistoquímica

3.10.1. Processamento dos tecidos

Após serem anestesiados com uma mistura de ketamina e xilazina, os animais foram perfundidos por infusão transcardíaca de 30mL de PBS 0,01M (pH=7,4-7,6) seguido de 25mL de PFA 4% diluído em PB 0,2M. Após a remoção, os encéfalos foram mantidos em uma solução de PFA 4% por 24 horas antes de serem transferidos para uma solução de sacarose 30%. Após 5-7 dias, os cérebros foram congelados através de imersão em isopentano a 30°C por 30 segundos. Com o auxílio de criostato (mantido a -20 a -24°C), os encéfalos foram seccionados para obtenção de 6 séries contendo 6-8 secções de CPF (Bregma -2,1 a -1,55mm) e 8 séries contendo 8-10 secções de hipocampo (Bregma 1,46 a 3,08mm). Os cortes foram armazenados imersos em solução anticongelante (etilenoglicol 30% + glicerol 20%) em freezer -20°C até a realização dos ensaios de imunohistoquímica.

3.10.2. Imunomarcção

Os cortes foram selecionados e distribuídos em placas de 24 poços (de maneira alternada, ou seja, um poço com tecido e um poço vazio) para a realização do ensaio de imuno-histoquímica pelo método free-floating. Foram selecionados 6-8 cortes compreendendo diferentes segmentos do CPF para as imunomarcção de NG2+BrdU, NAPE-PLD+PV e NAPE-PLD+CamKII, e 8 cortes compreendendo diferentes porções do hipocampo para a imunomarcção de BrdU+GFAP+Sox2.

Em resumo, o protocolo consistiu nas seguintes etapas consecutivas: (1) Lavagem 3x 15min; (2) Recuperação antigênica; (3) Lavagem 3x 15 min; (4) Bloqueio 3-4h; (5)

Incubação com anticorpo primário (*overnight*); (6) Lavagem 4x 15 min; (7) Incubação com anticorpo secundário; (8) Lavagem 4x 15min; (9) Montagem das lâminas. As etapas de lavagem foram realizadas utilizando tampão TBS (50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,6) e durante os 15 minutos de lavagem os tecidos foram mantidos sob leve agitação em mesa agitadora orbital (Tecnal, TE-140).

Para as imuno-histoquímicas com co-marcação de BrdU, a etapa de recuperação antigênica foi realizada através de incubação por 30 minutos a 37°C com HCl 2N seguido de 2 lavagens com ácido bórico pH 8,9. Para as demais imunomarcações, a etapa de recuperação antigênica consistiu na incubação com tampão citrato (pH 6,0) por 30 min a 70°C seguido de 40 min a temperatura ambiente.

A solução de bloqueio consistiu em albumina do soro bovino (ASB) 1% diluído em TBSt (TBS + 0,25% Triton X-100). Os tecidos foram incubados nessa solução por 3-4h à temperatura ambiente, sob leve agitação. Tanto as soluções de anticorpos primários quanto as de secundários foram preparadas em ASB 0,1% diluído em TBSt. O volume utilizado para incubação com os anticorpos primários e secundários foi de 250µl/poço. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários *overnight* a 18°C sob leve agitação e com os anticorpos secundários por 2h à temperatura ambiente. A Tabela 2 detalha os anticorpos primários e secundários utilizados em cada imunomarcação, bem como a diluição de cada anticorpo.

Tabela 2. Especificações do protocolo de imunofluorescência em cada marcação.

Imunomarcação	Tecido	Recuperação antigênica	Anticorpos primários	Anticorpos secundários
NG2 + BrdU	Córtex pré-frontal	HCl + ácido bórico	Anti-NG2 Chondroitin Sulfate Proteoglycan Antibody (Millipore Sigma, Cat. AB5320) Hospedeiro: Coelho Diluição: 1:400	Donkey anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross Adsorbed Secondary

			Anti-BrdU Anti-BrdU antibody [BU1/75 (ICR1)] - (Abcam; Cat. ab6326) Hospedeiro: Rato Diluição: 1:200	Antibody, Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific, Cat. A-31573) Diluição: 1:1000
				Goat anti-Rat IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Cat. A-11006) Diluição: 1:1000
<i>NAPE-PLD + PV</i>	Córtex pré-frontal	Tampão citrato	NAPE-PLD (Internal) Polyclonal Antibody (Cayman Chemical Company, Cat. 10305) Hospedeiro: Coelho Diluição: 1:400	Donkey anti Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Cat. A-21206) Diluição: 1:1000
			Anti-Parvalbumin antibody, Mouse monoclonal (Sigma-Andrich, Cat. SAB4200545) Hospedeiro: Camundongo Diluição: 1:500	Goat anti Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific, Cat. A-21235) Diluição: 1:1000
<i>NAPE-PLD +CaMKIIα</i>	Córtex pré-frontal	Tampão citrato	NAPE-PLD (Internal) Polyclonal Antibody (Cayman Chemical Company, Cat. 10305) Hospedeiro: Coelho Diluição: 1:400	Donkey anti Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Cat. A-21206) Diluição: 1:1000
			CaMKII- α (6G9) Mouse mAb (Cell Signaling Technology, Cat. 50049S) Hospedeiro: Camundongo Diluição: 1:500	Goat anti Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific, Cat. A11032) Diluição 1:1000
			Anti-Sox2 Antibody (Millipore Sigma, Cat. AB5603) Hospedeiro: Coelho Diluição:	Donkey anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific, Cat. A-31573) Diluição: 1:1000
<i>GFAP + Sox2 + BrdU</i>	Giro denteado	HCl + ácido bórico	GFAP (GA5) Mouse mAb (Cell Signaling Technology, Cat. 3670S) Hospedeiro: Camundongo Diluição:	Goat anti-Rat IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Cat. A-11006) Diluição: 1:1000
			Anti-BrdU Anti-BrdU antibody [BU1/75 (ICR1)] - (Abcam; Cat. ab6326) Hospedeiro: Rato Diluição: 1:200	Goat anti Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific, Cat. A11032) Diluição 1:1000

Após a última etapa de lavagem e antes da montagem, os cortes foram incubados com Hoechst 1:10000 diluído em TBS por 15min. A montagem foi realizada em lâminas de vidro utilizando como meio de montagem Fluormount ou Mowiol (Glicerol+Tris pH 8,5).

3.10.3. *Aquisição e análise de imagens*

As imagens foram obtidas em microscópio confocal (Leica TSA-SPE) e processadas e analisadas utilizando o software LasX (versão 5.0.2).

Para a imunomarcação de NG2+BrdU, foi quantificado o total de células NG2-positivas/campo e a porcentagem dessas células que também foram positivas para BrdU em no mínimo 4 cortes por animal. Foi analisada a área correspondente a porção pré-límbica do CPF. Para a imunomarcação de NAPE-PLD+PV ou NAPE-PLD+CamKII, foi quantificado o total de células PV-positivas/campo ou CamKII-positivas/campo e a porcentagem dessas células que expressavam NAPE-PLD em no mínimo 6 cortes por animal. A expressão de NAPE-PLD foi quantificada através da contagem de punctas utilizando o plug-in *Particle Analyser* do ImageJ nas imagens de projeção máxima obtidas a partir do escaneamento de cada campo. A expressão de PV e CamKII foi quantificada através da quantificação da intensidade de fluorescência através do plug-in do ImageJ nas imagens de projeção máxima obtidas a partir do escaneamento de cada campo. Os resultados foram normalizados pela área da região analisada. Foi analisada a área correspondente a porção pré-límbica do CPF.

Para a imunomarcação de GFAP+Sox2+BrdU, foi quantificado o total de células BrdU-positivas no giro denteado do hipocampo em no mínimo 8 cortes por animal. Quantificamos a porcentagem de células BrdU-positivas que expressavam os

marcadores de populações de precursores neurais Sox2 e GFAP. Os resultados foram normalizados pela área e volume da região analisada.

3.11. Análise estatística

Os dados estão representados como média \pm Erro Padrão da Média (EPM). A normalidade dos dados foi avaliada através do teste Kolmorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. O efeito do fator estresse foi avaliado através de teste t de amostras independentes comparando o grupo controle (não estressado) com o grupo estressado tratado apenas com veículo. O efeito dos fatores genótipo, tratamento 1 (veículo, escitalopram ou imipramina) e tratamento 2 (veículo, CBD ou URB597) foram avaliados por ANOVA duas vias. Para comparações múltiplas, foi utilizado o teste ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Duncan. Foram considerados significativos valores de p iguais ou inferiores a 0,05.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Expandindo o entendimento sobre os efeitos comportamentais antiestresse da combinação de escitalopram e CBD

4.1.1. A exposição a 10 dias de CUS não induz um fenótipo do tipo-depressivo

Uma vez que observamos anteriormente uma resposta preditiva de um efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD, decidimos verificar o efeito do tratamento em um teste comportamental preditivo de um efeito do tipo-antidepressivo, o *splash-test*. Para isso, submetemos camundongos machos C57Bl6 a 10 dias de CUS e realizamos por 7 dias o tratamento com as combinações de veículo ou escitalopram (Tratamento 1) com veículo ou CBD (Tratamento 2) concomitantemente aos 7 últimos dias do protocolo de estresse. Vinte quatro horas após o último dia de estresse tratamento, os animais foram submetidos ao *splash-test*. Teste t de amostras independentes não indicou um efeito do fator estresse para qualquer um dos parâmetros testados (Latência: $t_{6,083}=0,958$, $p=0,375$; Tempo total de autolimpeza: $t_{15}=0,441$, $p=0,666$; Tempo de autolimpeza do dorso: $t_{15}=0,096$, $p=0,925$; Tempo de autolimpeza da face: $t_{15}=1,307$, $p=0,211$; Tempo de limpeza passiva: $t_{15}=1,002$, $p=0,332$). Considerando o grupo de animais estressados tratados com as diferentes combinações de tratamento, não houve interação entre os tratamentos (Latência: $F_{1,26}=0,066$, $p=0,234$; Tempo total de autolimpeza: $F_{1,26}=0,177$, $p=0,677$; Tempo de autolimpeza do dorso: $F_{1,26}=0,452$, $p=0,507$; Tempo de autolimpeza da face: $F_{1,26}=0,119$, $p=0,733$; Tempo de limpeza passiva: $F_{1,26}=0,008$, $p=0,931$) e não foi observado um efeito significativo dos Tratamento 1 (Latência: $F_{1,26}=1,991$, $p=0,170$; Tempo total de autolimpeza: $F_{1,26}=0,073$, $p=0,789$; Tempo de autolimpeza do dorso: $F_{1,26}=0,087$, $p=0,771$; Tempo de autolimpeza da face:

$F_{1,26}=0,350$, $p=0,559$; Tempo de limpeza passiva: $F_{1,26}=0,118$, $p=0,734$) ou do Tratamento 2 (Latência: $F_{1,26}=0,055$, $p=0,816$; Tempo total de autolimpeza: $F_{1,26}=0,060$, $p=0,808$; Tempo de autolimpeza do dorso: $F_{1,26}=0,008$, $p=0,928$; Tempo de autolimpeza da face: $F_{1,26}=0,129$, $p=0,722$; Tempo de limpeza passiva: $F_{1,26}=1,033$, $p=0,319$) nos parâmetros avaliados (Figura 9A-D). Avaliamos, ainda, a porcentagem dispendida no dorso e na face em relação ao tempo total de autolimpeza (Figura 9E). Embora não tenhamos encontrado diferenças estatisticamente significativas nessa porcentagem, observamos que o padrão de autolimpeza dos animais estressados tratados com escitalopram ou tratados com escitalopram em combinação a CBD parece indicar um aumento de tendência de autolimpeza da região do dorso. O comportamento de autolimpeza (*grooming*) é considerado um comportamento estereotipado e de autocuidado. Ainda que alterações no padrão comportamental de autolimpeza possam ser associados a comportamentos mal-adaptativos, existe a variável de que aplicamos uma solução palatável (de sacarose) no dorso do animal. Essa tendência de animais tratados dispendem uma maior porcentagem de tempo de autolimpeza no dorso em comparação aos outros grupos pode indicar uma maior tendência a buscar essa solução palatável.

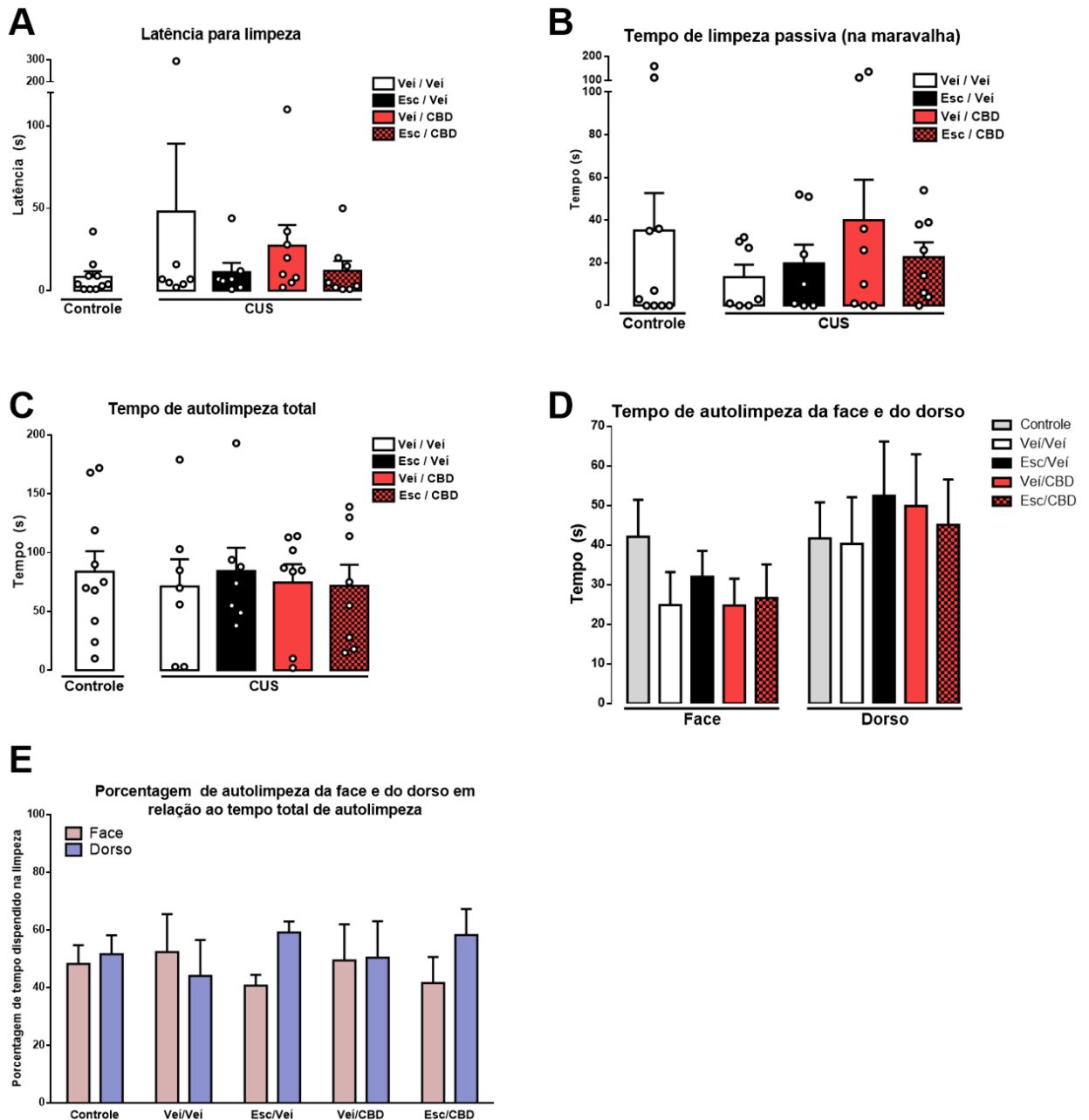
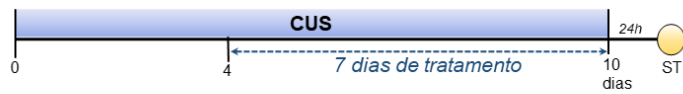


Figura 9. O comportamento de camundongos estressados no *splash-test* não foi significativamente alterado pelo tratamento combinado de escitalopram e CBD. (A) Latência para primeira autolimpeza, (B) tempo dispendido na estratégia de limpeza passiva (utilizando a maravalha), (C) tempo total de autolimpeza, (D) tempo de autolimpeza no dorso e na face e (E) porcentagem de autolimpeza do dorso e da face em relação ao tempo total de autolimpeza de camundongos submetidos a 10 dias de CUS e tratados com veículo ou escitalopram (10mg/kg) em combinação a veículo ou CBD (7,5mg/kg). Dados representados como Média \pm Erro padrão da média (n=7-10).

4.1.2. A combinação de Escitalopram e CBD por 7 dias induz um efeito do tipo-ansiolítico em animais expostos a 21 dias de estresse

Nós observamos um efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD após 7 dias de tratamento em camundongos expostos a 10 dias de estresse repetido. Mas em camundongos expostos a um período estendido de estresse, o efeito do tratamento seria observado mesmo com apenas 7 dias de tratamento? Para investigar isso, camundongos machos foram expostos a 21 dias de CUS e tratados com a combinação de escitalopram e CBD apenas por uma semana (concomitantemente aos últimos 7 dias do protocolo de estresse). Nós não observamos uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo CUS tratado apenas com veículo (teste t de amostras independentes; $t_{18}=0,837$, $p=0,414$). Considerando apenas os animais estressados, uma vez que o teste de Levene indicou que não houve homogeneidade de variâncias ($F_{3,31}=2,991$, $p=0,046$), nós realizamos uma transformação logarítmica dos dados, o que nos permitiu obter homoscedasticidade (teste de Levene: $F_{3,31}=0,679$, $p=0,571$) e seguir a análise dos dados através de uma estatística paramétrica. ANOVA de duas vias seguida revelou que não houve um efeito significativo do tratamento 1 (veículo ou escitalopram) ($F_{1,31}=1,138$, $p=0,294$). Entretanto, houve um efeito estatisticamente significativo do Tratamento 2 (Veículo ou CBD) (ANOVA de duas vias; $F_{1,31}=6,074$, $p=0,019$). Não houve interação entre os tratamentos ($F_{1,31}=2,002$, $p=0,167$). Esses resultados indicam que CBD como um tratamento aditivo induz um efeito significativo na resposta comportamental de animais estressados. Reforçando esses dados, ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan indicou que animais estressados tratados com a combinação de escitalopram e CBD apresentaram uma

latência para consumo de alimento em um contexto de neofobia significativamente reduzida em comparação ao grupo de animais estressados tratados com veículo ($F_{3,31}=3,090$, $p=0,041$) (Figura 10A). Com relação ao consumo de alimento na *home-cage*, não observamos estatisticamente significativos do estresse (teste t de amostras independentes; $t_{16,093}=0,706$, $p=0,490$) ou dos tratamentos (ANOVA de duas vias; Tratamento 1: $F_{1,31}=0,007$, $p=0,936$; Tratamento 2: $F_{1,31}=1,963$, $p=0,171$; Interação: $F_{1,31}=0,436$, $p=0,514$) (Figura 10B). Esses resultados indicam que a combinação de escitalopram com CBD induz um efeito do tipo-ansiolítico após apenas 7 dias de tratamento em animais expostos a um protocolo de 21 dias de estresse repetido.

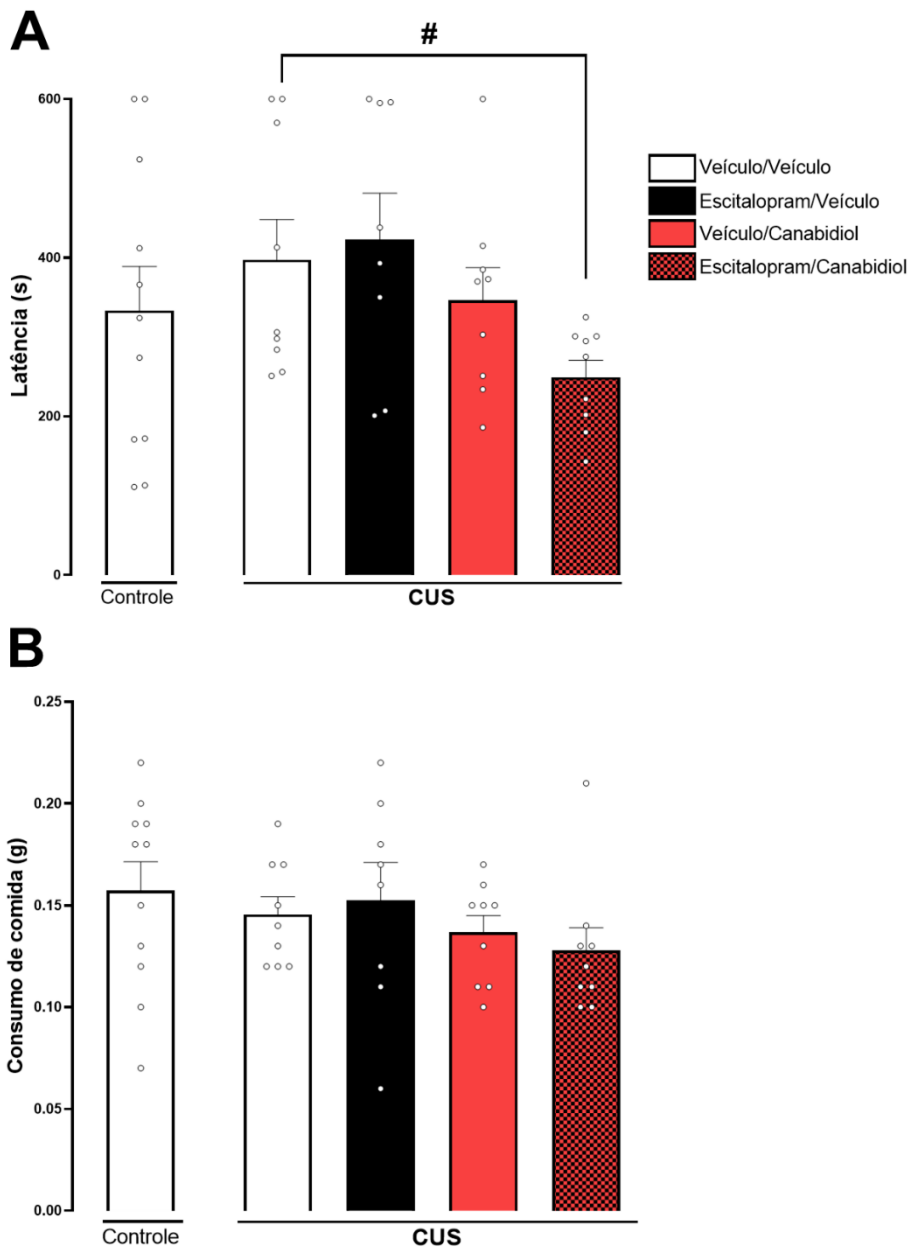
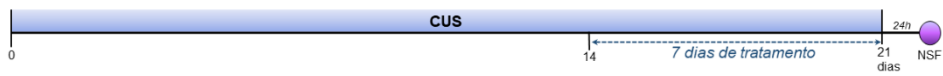


Figura 10. A combinação de escitalopram e canabidiol induz um efeito do tipo-ansiolítico após apenas 7 dias de tratamento em animais expostos a 21 dias de estresse. Latência para início do consumo de alimento no teste de supressão da alimentação pela novidade (A) e consumo de alimento na caixa moradia (B) de camundongos expostos a 21 dias de estresse crônico imprevisível (CUS) e tratados por 7 dias com as combinações de veículo ou escitalopram (10mg/kg) com veículo ou CBD (7,5mg/kg). (#) indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo estressado tratado apenas com veículo (ANOVA de duas vias; ANOVA de uma via seguido de teste de Duncan) ($n=8-11$).

4.2. Bases neurobiológicas do efeito da combinação de escitalopram e CBD no CPF

4.2.1. A exposição a 10 dias de estresse induz uma redução de espinhos dendríticos de neurônios piramidais no CPF

Foram coletados os encéfalos de camundongos machos C57Bl6 submetidos a 10 dias de CUS e tratados por 7 dias o tratamento com as combinações de veículo ou escitalopram (Tratamento 1) com veículo, CBD ou URB597 (Tratamento 2) concomitantemente aos 7 últimos dias do protocolo de estresse. As respostas comportamentais dos animais utilizados para essa análise histológica estão representadas na Figura 3. Os tecidos foram processados através da técnica de impregnação de Golgi. Com o objetivo de caracterizar alterações de plasticidade sináptica em neurônios do CPF medial, investigamos o efeito do estresse e das diferentes combinações de tratamento sobre o número e a morfologia de espinhos dendríticos de dendritos terciários de neurônios piramidais das camadas II/III do CPF medial (Figura 11A). O número de espinhos dendríticos em neurônios piramidais de animais submetidos ao protocolo de CUS e tratados apenas com veículo foi significativamente reduzido em comparação ao grupo controle, não-estressado (teste t de amostras independentes, $t_{5,219}=2,604$, $p=0,046$), indicando um efeito deletério da exposição a 10 dias de CUS sobre a plasticidade sináptica de neurônios corticais. Considerando apenas os grupos de animais estressados, entretanto, ANOVA de duas vias indicou que não houve interação entre os tratamentos ($F_{2,26}=1,532$, $p=0,235$) e que não houve um efeito significativo do tratamento 1 ($F_{1,26}=1,409$, $p=0,246$) ou do tratamento 2 ($F_{2,26}=0,636$, $p=0,538$) (Figura 11B).

A partir de suas características morfológicas, os espinhos dendríticos contabilizados foram classificados em *mushroom*, *thin*, *filopodia* e *stubby* e determinamos a porcentagem de cada morfologia (Figura 11C). As diferentes combinações de tratamento nos animais estressados não alteraram significativamente a porcentagem de espinhos dendríticos de nenhuma das morfologias (ANOVA de duas vias; *Mushroom*: Tratamento 1 - $F_{1,26}=3,267$, $p=0,082$; Tratamento 2 - $F_{2,26}=0,113$, $p=0,893$; Interação - $F_{2,26}=2,310$, $p=0,119$. *Thin*: Tratamento 1 - $F_{1,26}=3,667$, $p=0,067$; Tratamento 2 - $F_{2,26}=0,434$, $p=0,653$; Interação - $F_{2,26}=1,641$, $p=0,213$. *Filopodia*: Tratamento 1 - $F_{1,26}=0,000$, $p=0,991$; Tratamento 2 - $F_{2,26}=0,803$, $p=0,459$; Interação - $F_{2,26}=0,522$, $p=0,599$. *Stubby*: Tratamento 1 - $F_{1,26}=0,018$, $p=0,894$; Tratamento 2 - $F_{2,26}=1,289$, $p=0,293$; Interação - $F_{2,26}=1,140$, $p=0,335$). Com relação ao efeito do fator estresse, observamos que a porcentagem de espinhos com a morfologia *thin* foi significativamente maior no grupo de camundongos estressados tratados apenas com veículo em comparação ao grupo controle, não estressado ($t_8=2,097$, $p=0,020$). Para as demais morfologias, não encontramos um efeito significativo do fator estresse (teste t de amostras independentes; *Mushroom*: $t_8=1,479$, $p=0,177$; *Filopodia*: $t_8=0,965$, $p=0,363$; *Stubby*: $t_8=0,161$, $p=0,876$).

Em conjunto, a redução do número total de espinhos dendríticos e o aumento na proporção espinhos com a morfologia *thin* (característica de espinhos imaturos) observada nos animais estressados revelam que a exposição a 10 dias de estresse repetido causa um déficit de plasticidade sináptica em neurônios piramidais do CPF medial.

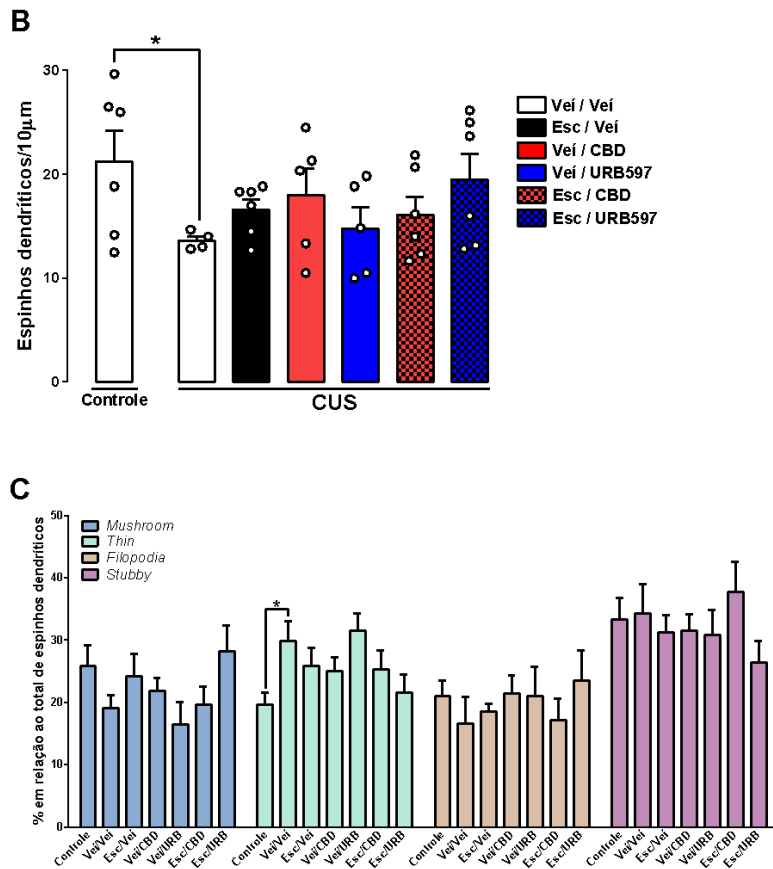
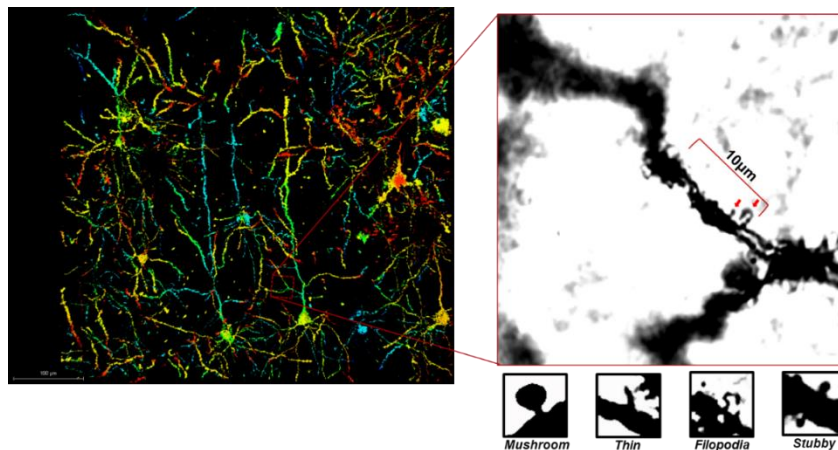


Figura 11. Camundongos expostos a 10 dias de CUS apresentam uma redução no número de espinhos dendríticos em neurônios piramidais da camada II/III do mCPF. (A) Imagens representativas da porção dendrítica analisada e da classificação dos espinhos dendríticos. (B) Número total e (C) porcentagem de espinhos dendríticos de cada morfologia em 10µm de dendritos terciários de neurônios piramidais do mCPF de camundongos controle ou estressados tratados com a combinação de veículo ou escitalopram (10mg/kg) com veículo, CBD (7,5mg/kg) ou URB597 (0,1mg/kg). Dados representados como Média ± Erro padrão da média (n=4-6). (*) indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (não-estressado) (teste t de amostras independentes).

4.2.2. Animais estressados tem um aumento na densidade de CPOs e na sobrevivência de CPOs proliferativas

Além de alterações morfológicas associadas a plasticidade neuronal, a exposição a estresse também pode impactar a plasticidade de células da glia. Com o objetivo de investigar o efeito do estresse e tratamento sobre a plasticidade de CPOs, os animais receberam uma única administração sistêmica de BrdU (200mg/kg) no 4º dia de estresse e primeiro dos 7 dias de tratamento com as combinações de veículo ou escitalopram com veículo ou CBD. Os animais foram sacrificados 3 dias após o fim do protocolo de estresse e tratamento. Nós quantificamos na porção pré-límbica do CPF a densidade de CPOs e a sobrevivência de CPOs que apresentavam atividade proliferativa no momento da injeção de BrdU (Figura 12A). Teste t de amostras independentes indicou que os animais submetidos a CUS e tratados apenas com veículo apresentaram um aumento na densidade de células NG2-positivas no CPF medial em comparação ao grupo controle ($t_{4,332}=2,845$, $p=0,042$). Não observamos diferenças significativas entre os grupos estressados submetidos às diferentes combinações de tratamento (ANOVA de duas vias; Tratamento 1: $F_{1,17}=0,049$, $p=0,828$; Tratamento 2: $F_{1,17}=0,692$, $p=0,417$; Interação: $F_{1,17}=0,457$, $p=0,508$) (Figura 12B).

Com relação à sobrevivência de CPOs em atividade proliferativa, teste t de amostras independentes demonstrou que animais estressados tratados apenas com veículo apresentaram uma redução na porcentagem de células NG2-positivas que tinham co-marcação com BrdU ($t_8=3,534$, $p=0,008$). Nos grupos de animais estressados, não foi observado um efeito significativo do fator Tratamento 1 (ANOVA de duas vias;

$F_{1,12}=2,203$, $p=0,164$) ou do fator Tratamento 2 ($F_{1,12}=0,770$, $p=0,398$) e não houve interação entre os tratamentos ($F_{1,12}=0,138$, $p=0,717$) (Figura 12C).

Os resultados indicam que a exposição a 10 dias de estresse repetido heterotípico aumenta a densidade de CPOs, possivelmente por aumentar a sobrevivência de células em atividade proliferativa na região pré-límbica do CPF.

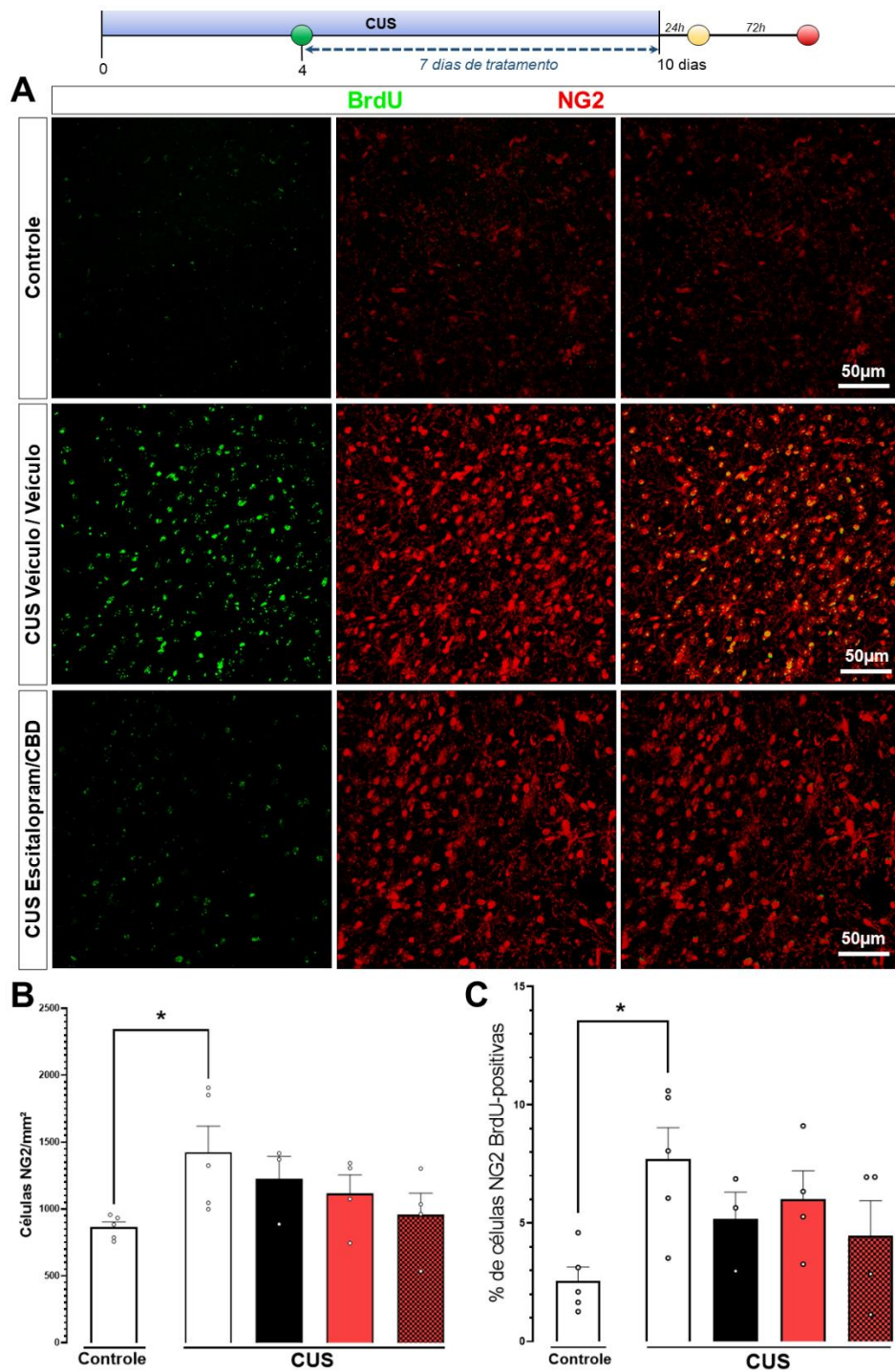


Figura 12. A exposição a 10 dias de CUS aumenta a sobrevivência de células NG2-positivas em atividade proliferativa no CPF medial. (A) Imagens representativas da marcação de células NG2 e BrdU-positivas. (B) Porcentagem de células NG2 com dupla-marcação para o marcador BrdU e (C) densidade de células NG2 no CPF medial de camundongos controle ou estressados tratados com a combinação de veículo ou escitalopram (10mg/kg) com veículo ou CBD (7,5mg/kg). Dados representados como Média \pm

Erro padrão da média (n=3-5). (*) indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (teste t de amostras independentes).

4.2.3. *Estresse e combinação de escitalopram e CBD não alteraram a proliferação de precursores neurais no giro denteado*

Nós avaliamos o efeito da exposição a 21 dias de estresse sobre a proliferação de precursores neurais GFAP⁺/Sox2⁺ (tipo 1) e GFAP⁻/Sox2⁺ (tipo 2) no giro denteado do hipocampo através da avaliação da incorporação de BrdU nessas populações de precursores (Figura 13A). Teste t de amostras independentes indicou que a exposição a CUS não alterou significativamente o número total de células BrdU-positivas no giro denteado em comparação ao grupo controle ($t_4=0,990$, $p=0,378$) e o grupo com a combinação de escitalopram e CBD não diferiu estatisticamente do grupo estressado tratado apenas com veículo (teste t de amostras independentes; $t_4=1,430$, $p=0,226$) (Figura 13B).

Dentre as células em proliferação, a porcentagem de células Sox2-positivas não diferiu significativamente entre o grupo controle e o grupo CUS tratado apenas com veículo (teste t de amostras independentes; $t_4=0,930$, $p=0,405$). Teste t de amostras independentes não indicou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo estressado tratado com veículo e o grupo tratado com escitalopram e CBD ($t_4=1,167$, $p=0,308$) (Figura 13C).

A porcentagem de células GFAP/Sox2-positivas dentre as células em proliferação não foi estatisticamente distinta entre os grupos controle e estressado tratado apenas com veículo (teste t de amostras independentes; $t_4=1,244$, $p=0,281$). A combinação de escitalopram e CBD não alterou significativamente essa proporção de células

GFAP/Sox2 em proliferação no giro denteado em comparação aos camundongos estressados tratados com veículo ($t_4=1,705$, $p=0,163$) (Figura 13D).

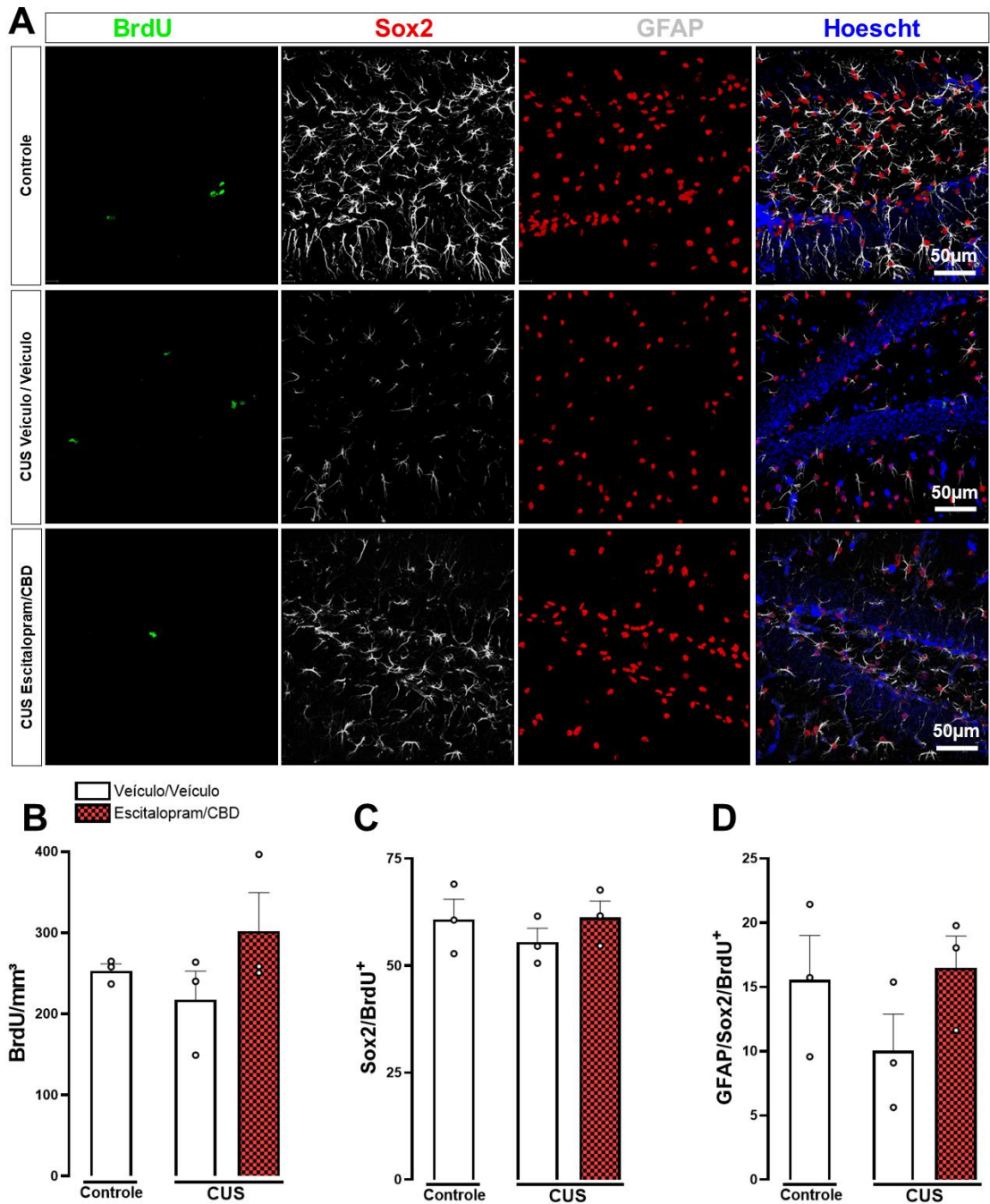


Figura 13. Estresse e a combinação de escitalopram e CBD não alteraram significativamente a proliferação de precursores neurais do tipo 1 e 2 no giro dentado do hipocampo. (A) Imagens representativas da marcação de células Sox2, GFAP e BrdU-positivas. Porcentagem de células Sox2-positivas (B) e GFAP/Sox2-positivas dentro as células em proliferação (BrdU-positivas) no giro dentado do hipocampo de camundongos controle ou estressados tratados com veículo ou com a combinação de escitalopram (10mg/kg) e CBD (7,5mg/kg). Dados representados como Média ± Erro padrão da média (n=3).

4.2.4. *Estresse e combinação de tratamento alteram o padrão de expressão de NAPE-PLD no CPF*

Nós avaliamos o efeito da exposição a 10 ou 21 dias de estresse e o efeito da combinação de escitalopram e CBD sobre o padrão de expressão de uma das enzimas responsáveis pela síntese de mediadores do ECBoma, a NAPE-PLD, no CPF medial de camundongos (Figura 14A).

Animais expostos a 10 dias de CUS que receberam tratamento apenas com veículo apresentaram uma redução significativa na densidade de punctas de NAPE-PLD no CPF medial em comparação ao grupo controle (teste t de amostras independentes; $t_7=3,685$, $p=0,008$). Nos grupos de animais estressados submetidos às diferentes combinações de tratamento, ANOVA de duas vias indicou que não houve um efeito significativo do Tratamento 1 ($F_{1,14}=0,297$; $p=0,594$), mas houve um efeito significativo do Tratamento 2 ($F_{1,14}=5,761$; $p=0,031$) e uma significativa interação entre os tratamentos ($F_{1,14}=5,784$; $p=0,031$). Isso indica que a combinação de tratamentos teve um efeito distinto em comparação ao efeito do tratamento com escitalopram apenas. De fato, ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan indicou que animais estressados tratados com a combinação de escitalopram e CBD tiveram um aumento na densidade de punctas de NAPE-PLD no CPF medial em comparação aos animais tratados apenas com escitalopram (Figura 14B).

Já nos animais expostos a 21 dias de estresse, o teste t de amostras independentes não indicou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo de animais estressados tratados apenas com veículo ($t_4=2,166$, $p=0,096$). Com relação aos grupos estressados submetidos às diferentes combinações de tratamento, ANOVA

duas vias não indicou um efeito significativo do fator Tratamento 1 ($F_{1,7}=0,926$, $p=0,368$) ou do Tratamento 2 ($F_{1,7}=1,948$, $p=0,205$) e não houve interação entre os fatores ($F_{1,7}=0,090$, $P=0,773$) (Figura 14C).

No protocolo de animais expostos a 10 dias de estresse, nós avaliamos o perfil de marcação de NAPE-PLD em neurônios glutamatérgicos CaMKII α -positivos no CPF medial. Com relação ao número total de células CaMKII α -positivos, nós não observamos uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo estressado tratado apenas com veículo e o grupo controle (teste t de amostras independentes; $t_7=0,598$, $p=0,569$). Entre os grupos estressados, não foi observado um efeito significativo de nenhum dos tratamentos (Tratamento 1: $F_{1,14}=0,044$, $p=0,836$; Tratamento 2: $F_{1,14}=0,115$, $p=0,739$) e não houve interação entre os tratamentos ($F_{1,14}=0,680$, $p=0,423$) (Figura 14D).

Com relação ao padrão de expressão de NAPE-PLD, nós observamos que o fator estresse não alterou significativamente a porcentagem de células CaMKII α -positivas que expressavam NAPE-PLD (teste t de amostras independentes (Controle vs CUS Veí/Veí); $t_7=1,425$; $p=0,197$). Dentre os grupos de animais estressados, ANOVA de duas vias indicou que não houve um efeito significativo do Tratamento 1 ($F_{1,14}=0,939$, $p=0,349$) ou do Tratamento 2 ($F_{1,14}=0,085$, $p=0,775$) e não houve interação entre os fatores ($F_{1,14}=0,001$, $p=0,973$) (Figura 14E).

No protocolo de animais expostos a 21 dias de estresse, avaliamos o padrão de expressão de NAPE-PLD em interneurônios PV-positivos no CPF medial. Não houve diferença com relação ao número total de células PV-positivas no CPF de animais estressados tratados com veículo em comparação ao grupo de animais controle (teste t de amostras independentes; $t_4=1,011$, $p=0,369$). As diferentes combinações de

tratamento não alteraram significativamente o número de células PV-positivas no CPF (ANOVA de duas vias; Tratamento 1: $F_{1,7}=0,096$, $p=0,766$; Tratamento 2: $F_{1,7}=0,001$, $p=0,982$; Interação: $F_{1,7}=0,215$, $p=0,657$) (Figura 14F).

A exposição por 21 dias a CUS não alterou significativamente a porcentagem de células PV que foram positivas para a marcação da enzima NAPE-PLD no CPF medial (teste t de amostras independentes; $t_4=1,374$, $p=0,242$). Dentre os grupos de animais estressados que receberam as diferentes combinações de tratamento, ANOVA de duas vias indicou que houve um efeito significativo do tratamento 2 ($F_{1,7}=5,348$, $p=0,054$), mas não do tratamento 1 ($F_{1,7}=3,383$, $p=0,108$) e não houve interação entre os tratamentos ($F_{1,7}=0,055$, $p=0,821$). Animais estressados por 21 dias que receberam tratamento com a combinação de escitalopram e CBD por 7 dias apresentaram uma porcentagem significativamente maior de células PV que expressavam a enzima NAPE-PLD no CPF (ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan; $F_{3,7}=3,293$, $p=0,088$) (Figura 14G).

Os resultados indicam que o estresse reduz a expressão de NAPE-PLD no CPF e o tratamento com a combinação de escitalopram e CBD pode recrutar a atividade de NAPE-PLD e a sinalização de mediadores endocanabinóides e LTEs sintetizados por essa enzima especialmente em interneurônios PV no CPF.

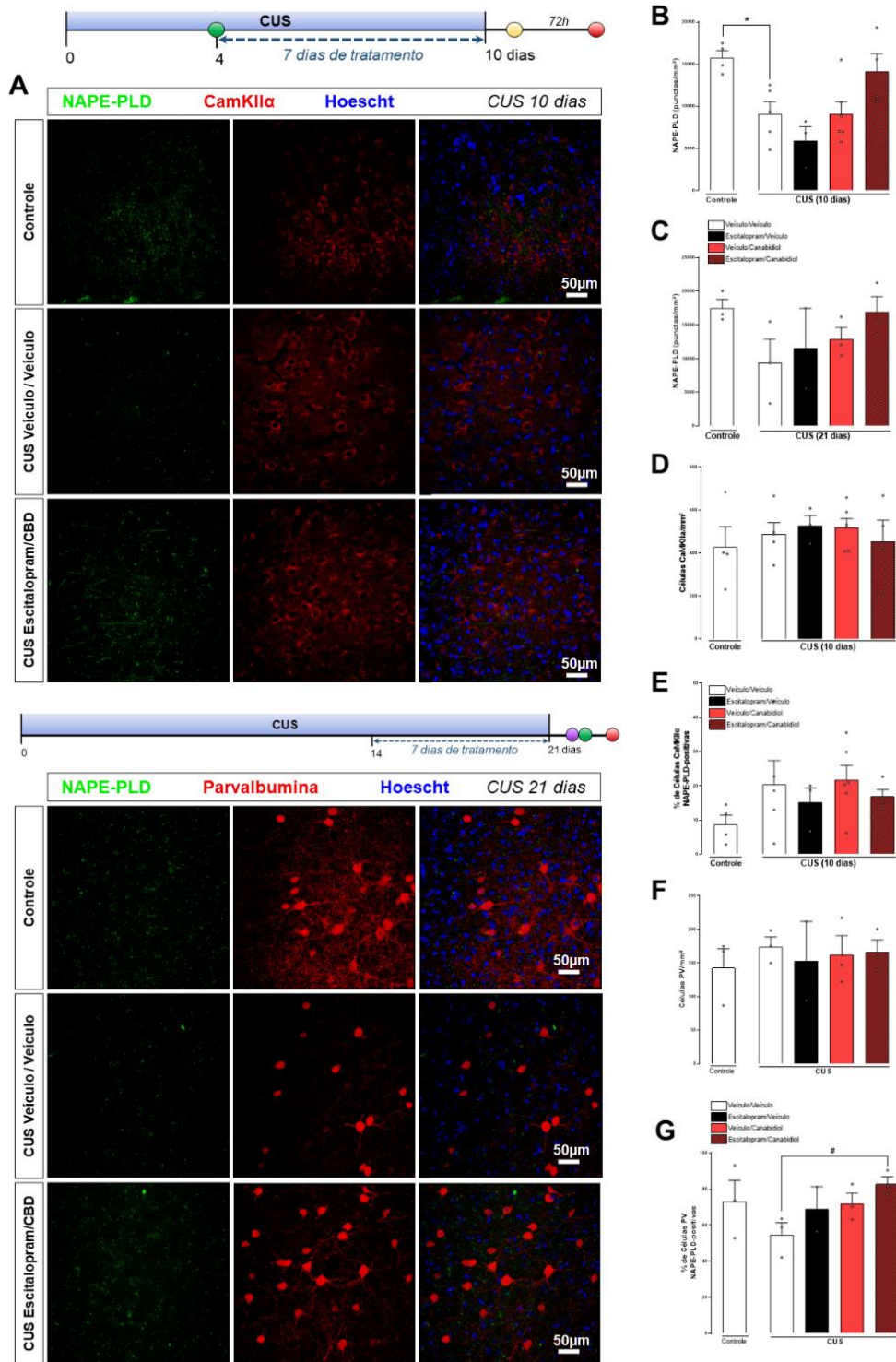


Figura 14. Estresse e tratamento alteram o padrão de expressão de NAPE-PLD no CPF medial. (A) Imagens representativas da marcação de NAPE-PLD no CPF medial e sua expressão em células CamKIIα (painéis superiores) e PV-positivas (painéis inferiores). Densidade de punctas de NAPE-PLD em camundongos expostos a 10 (B) ou 21 dias (C) de estresse; densidade de células CamKIIα (D) e porcentagem de células CamKIIα positivas para a marcação e NAPE-PLD. Densidade de células

parvalbumina(PV)-positivas (F) e porcentagem de células PV que expressam NAPE-PLD no CPF medial de camundongos controle ou estressados por 10 ou 21 dias tratados com a combinação de veículo ou escitalopram (10mg/kg) com veículo ou CBD (7,5mg/kg). Dados representados como Média \pm Erro padrão da média (n=3-6). (*) indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (teste t de amostras independentes); (#) indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo estressado tratado com veículo.

4.3.O ECBoma no CPF desempenha um papel importante no efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD?

4.3.1. A deleção da enzima NAPE-PLD no CPF impede o efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD

A NAPE-PLD é uma enzima crucial na via de síntese de AEA, NAEs e NAANs. Uma vez que observamos uma alteração no padrão de expressão da enzima frente a exposição a estresse e ao tratamento com a combinação de escitalopram e CBD, nós questionamos se essa enzima, especificamente no CPF, desempenharia um papel relevante nos efeitos comportamentais antiestresse da combinação de tratamento. Para isso, nós realizamos um *knock-down* (KD) da expressão de NAPE-PLD através da injeção intra-CPF de um vetor lentiviral que direciona a deleção da enzima através de um sistema CRISPR-Cas9 (Grupo NAPE-PLD KD). Animais do grupo controle *wild-type* (WT) receberam a injeção intra-CPF de um vetor viral controle. Quinze dias após a injeção estereotáxica, os camundongos foram submetidos a 10 dias de estresse e 7 dias de tratamento com veículo ou com a combinação de escitalopram e CBD. A resposta comportamental dos animais foi avaliada no NSF. ANOVA de duas vias evidenciou que houve uma interação entre os fatores genótipo (WT ou KD) e tratamento ($F_{1,21}=4,393$; $p=0,048$), indicando que o efeito do tratamento variou dependendo do genótipo. Não foi encontrado um efeito estatisticamente significativo do fator genótipo ($F_{1,21}=3,462$;

$p=0,077$) ou do fator tratamento ($F_{1,21}=2,412$; $p=0,135$). ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan revelou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo WT tratado com veículo e o grupo WT tratado com a combinação de escitalopram e CBD, indicando um efeito do tipo-ansiolítico do tratamento em animais WT. Nos animais com KD induzido da enzima NAPE-PLD no CPF, não houve diferença na latência para consumo de alimento em um contexto de neofobia entre os animais tratados com veículo e os animais que receberam tratamento com a combinação de escitalopram e CBD (Figura 15A). Quanto ao consumo de comida na *home-cage*, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos (ANOVA de duas vias; Genótipo: $F_{1,55}=0,239$, $p=0,627$; Tratamento: $F_{1,55}=0,305$, $p=0,583$; Interação: $F_{1,55}=0,380$, $p=0,540$) (Figura 15B). Os resultados mostram, portanto, que a deleção da enzima NAPE-PLD no CPF foi capaz de prevenir o efeito comportamental da combinação de escitalopram e CBD no NSF, indicando que a sinalização mediada pela AEA e por LTEs que compartilham uma via de síntese dependente de NAPE-PLD participam no efeito do tipo-ansiolítico induzido pela combinação de tratamentos.

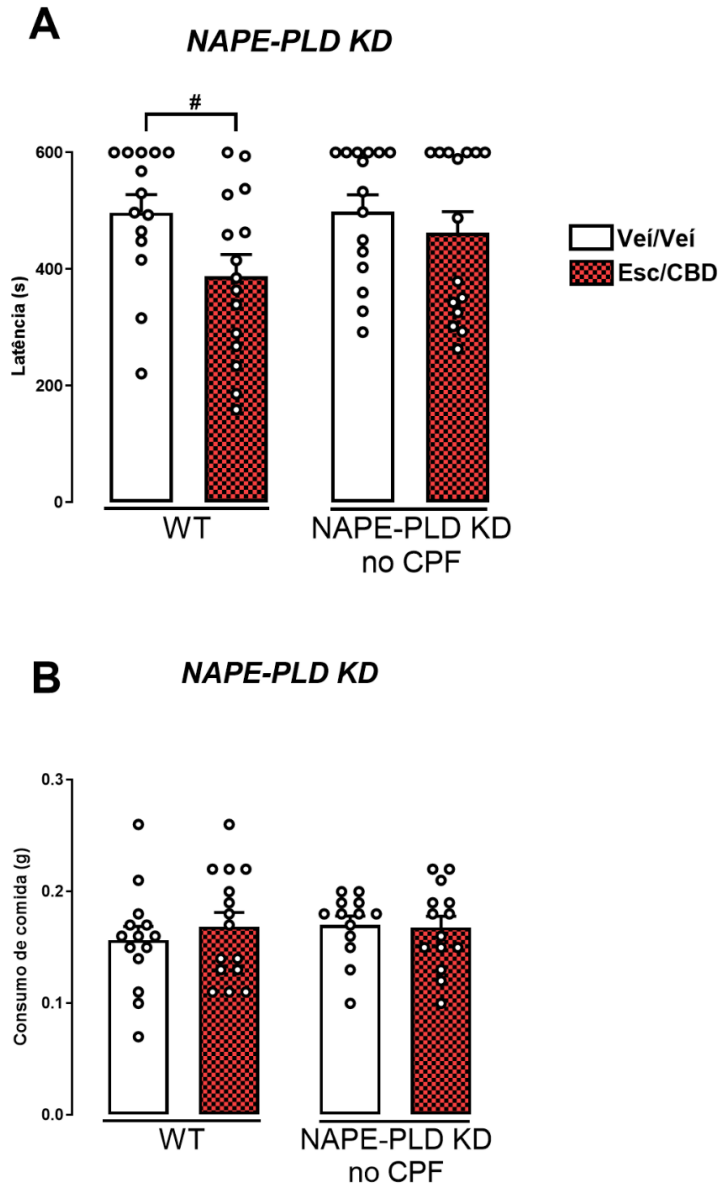
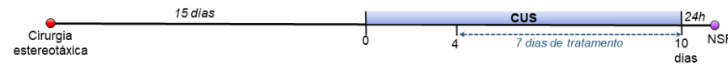


Figura 15. A deleção da enzima NAPE-PLD no córtex pré-frontal medial previne o efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD em animais estressados. Latência para início do consumo de alimento no teste de supressão da alimentação pela novidade (A) e consumo de alimento na caixa moradia (B) de camundongos controle (WT) ou em camundongos com *knock-down* (KD) da enzima NAPE-PLD induzido através da injeção estereotáxica de vetores lentivirais. Os animais foram expostos a 10 dias de estresse crônico imprevisível (CUS) e tratados por 7 dias com veículo ou com a combinação de escitalopram (10mg/kg) e CBD (7,5mg/kg). (#) indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo estressado do mesmo genótipo tratado apenas com veículo (ANOVA de duas vias; ANOVA de uma via seguido de teste de Duncan) ($n=14-15$).

Nós não observamos diferenças com relação aos níveis de AEA quando quantificamos os níveis no CPF total (ANOVA de duas vias; Genótipo: $F_{1,6}=0,026$, $p=0,876$; Tratamento: $F_{1,6}=1,975$, $p=0,210$; Interação: $F_{1,6}=0,128$, $p=0,733$) (Tabela 3).

Tabela 3. Níveis totais de AEA no CPF de camundongos WT ou NAPE-PLD KD

Grupo	AEA (ng/mg)
WT + Veículo	0,0241 ± 0,0049
WT + Escitalopram/CBD	0,0210 ± 0,0012
NAPE KD + Veículo	0,0252 ± 0,0030
NAPE KD + Escitalopram/CBD	0,0206 ± 0,0018

AEA, Anandamida; CPF, córtex pré-frontal; WT, *wild-type*; NAPE-PLD, N-acil fosfatidiletanolamina- fosfolipase D; KD, *knock-down*. Dados representados como Média ± EPM.

4.3.2. A combinação de escitalopram e CBD induz um efeito do tipo-ansiolítico em camundongos com deleção da enzima DAGLa no CPF

Outra via de síntese de ligantes do ECBoma é dependente da atividade da enzima DAGL α . Para avaliar o papel desses ligantes no CPF para os efeitos antiestresse da combinação de escitalopram e CBD, adotamos uma abordagem semelhante à descrita no tópico anterior. Os animais receberam uma injeção intra-CPF de um vetor viral controle (Grupo WT) ou de um vetor viral que direcionava a deleção via CRISPR-Cas9 da enzima DAGL α (Grupo DAGL α KD). Da mesma forma que no protocolo anterior, os animais WT ou DAGL α KD foram submetidos a 10 dias de CUS e a 7 dias de tratamento com veículo ou com a combinação de escitalopram e CBD. Quando avaliada a resposta dos animais no NSF, ANOVA de duas vias indicou que não houve interação entre os fatores ($F_{(1,34)}=0,964$, $p=0,333$) e não houve um efeito significativo do fator genótipo ($F_{(1,34)}=2,946$, $p=0,095$). Por outro lado, foi encontrado um efeito significativo do fator

tratamento ($F_{(1,34)}=8,075$, $p=0,008$), indicando que o tratamento com a combinação de escitalopram e CBD apresentou um efeito do tipo-ansiolítico de modo independente do genótipo. ANOVA de uma via seguido de pós-hoc de Duncan indicou que os animais com KD da enzima DAGL α no CPF tratados com escitalopram e CBD apresentaram uma latência para consumo de alimento em um contexto de neofobia significativamente menor do que os tratados apenas com veículo, indicando que o efeito do tipo-ansiolítico do tratamento foi preservado mesmo na ausência da enzima de síntese do 2-AG e de LTEs que compartilham dessa via de síntese (Figura 16A). Não foram observadas diferenças significativas quanto ao consumo de alimento na *home-cage* (Figura 16B). Esses resultados indicam, portanto, que a sinalização mediada por ligantes cuja via de síntese depende de NAPE-PLD, mas não dos cuja via de síntese depende de DAGL α , no CPF participa na ação do tipo-ansiolítica do tratamento combinado de escitalopram e CBD em camundongos estressados.

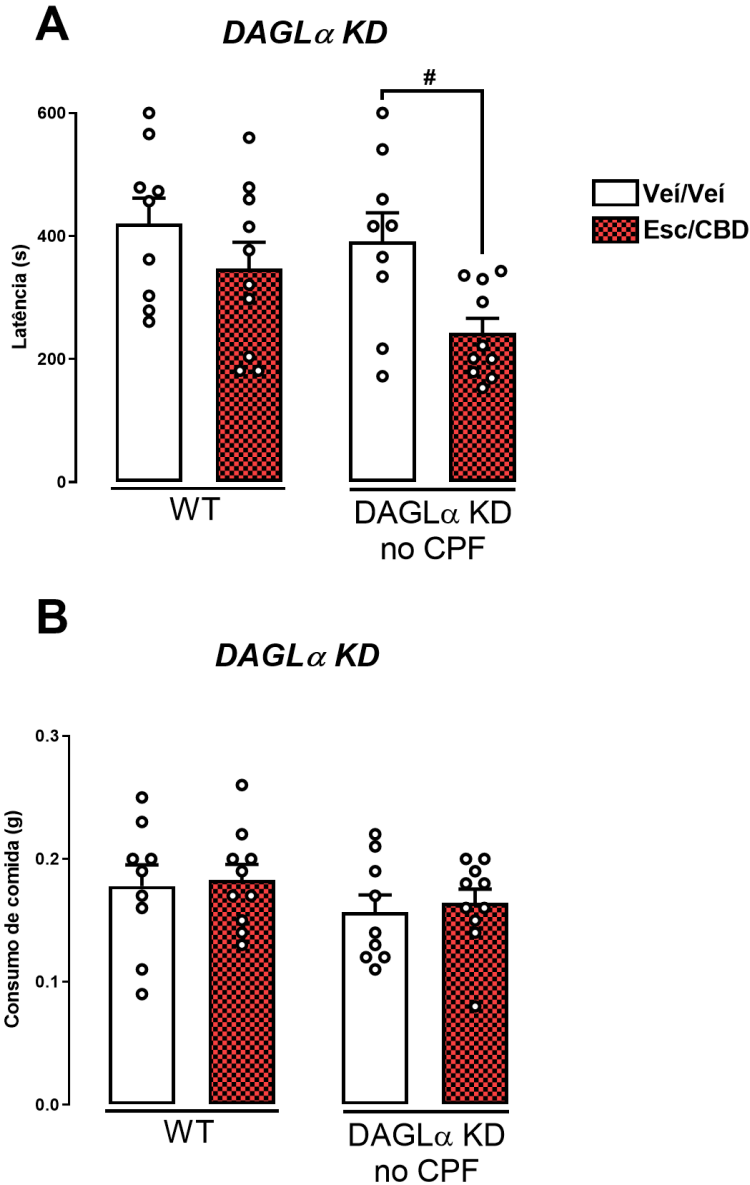
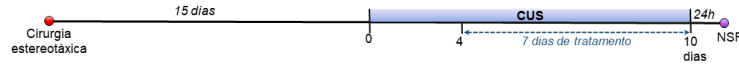


Figura 16. A combinação de escitalopram e CBD induz um efeito do tipo-ansiolítico em animais estressados *knock-down* (KD) para a enzima DAGL α no córtex pré-frontal medial. Latência para início do consumo de alimento no teste de supressão da alimentação pela novidade (A) e consumo de alimento na caixa moradia (B) de camundongos controle (WT) ou em camundongos com KD da enzima DAGL α induzido através da injeção estereotática de vetor lentiviral. Os animais foram expostos a 10 dias de estresse crônico imprevisível (CUS) e tratados por 7 dias com veículo ou com a combinação de escitalopram (10mg/kg) e CBD (7,5mg/kg). (#) indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo do mesmo genótipo tratado apenas com veículo (ANOVA de duas vias; ANOVA de uma via seguido de teste de Duncan) ($n=14-15$).

Não observamos diferenças significativas com relação aos níveis de 2-AG do CPF dos camundongos WT e DAGL α KD (ANOVA de duas vias; Genótipo: $F_{1,14}=4,288$, $p=0,057$; Tratamento: $F_{1,14}=0,371$, $p=0,552$; Interação: $F_{1,14}=0,044$, $p=0,837$) (Tabela 4).

Tabela 4. Níveis totais de 2-AG no CPF de camundongos WT ou DAGL α KD.

Grupo	2-AG (ng/mg)
WT + Veículo	0,4741 \pm 0,0502
WT + Escitalopram/CBD	0,5592 \pm 0,0666
DAGL α KD + Veículo	0,7111 \pm 0,1296
DAGL α KD + Escitalopram/CBD	0,7526 \pm 0,1326

2-AG, 2-araquidonoilglicerol; CPF, córtex pré-frontal; WT, *wild-type*; DAGL α , diacilglicerol lipase α ; KD, *knock-down*.

Dados representados como Média \pm EPM.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Em nosso estudo, demonstramos que a combinação de escitalopram com uma dose subefetiva de canabidiol produz um efeito do tipo-ansiolítico após apenas 7 dias de tratamento em animais expostos durante 10 ou 21 dias a um protocolo de estresse heterotípico. O efeito comportamental da combinação de tratamentos foi dependente da expressão da enzima NAPE-PLD, mas não da enzima DAGL α , no CPF medial.

5.1. CBD como terapia complementar para melhorar o efeito antiestresse do escitalopram

Evidenciamos que o CBD, em uma dose subefetiva, acelera os efeitos comportamentais antiestresse do escitalopram. Caracterizamos previamente que a dose de 20mg/kg do escitalopram produz um efeito comportamental do tipo-ansiolítico em camundongos estressados após 14 dias de tratamento em animais expostos a CUS (SCARANTE et al., 2021). Já com a dose de 10mg/kg, utilizada em nosso estudo, caracterizamos que o efeito comportamental do tratamento é significativo com 21 dias de tratamento em animais estressados (RIBEIRO et al., em revisão). Combinado com a dose de 7,5mg/kg de CBD, o efeito do tipo-ansiolítico do tratamento com escitalopram 10mg/kg, entretanto, aparece com apenas 7 dias de tratamento.

Acelerar o efeito do tratamento é particularmente importante quando consideramos a janela temporal necessária para a observação de efeito terapêutico característica de fármacos ISRS. Encontrar alternativas para que o efeito terapêutico seja atingido mais rapidamente pode significar uma melhora significativa na aderência ao tratamento e na qualidade de vida de pacientes com transtorno psiquiátrico associado a estresse.

Uma porcentagem significativa de pacientes com transtornos psiquiátricos associados a estresse não responde de forma satisfatória a monoterapia. Uma das recomendações, nesses casos, é a combinação com fármacos que atuam como terapia aditiva. Dentre os fármacos comumente utilizados, destacam-se antipsicóticos e lítio. Entretanto, esses psicofármacos causam severos efeitos colaterais, o que afeta a aderência dos pacientes ao tratamento (BAROWSKY; SCHWARTZ, 2006). Por outro lado, CBD é um fármaco bem tolerado, que não causa efeitos colaterais severos (CRIPPA et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2020; HOSSEINI; MCLACHLAN; LICKLITER, 2020). Portanto, propomos que a combinação com CBD pode ser uma estratégia interessante para otimizar a ação do escitalopram. Novos estudos são necessários, entretanto, para caracterizar se o CBD beneficiaria os efeitos de outros ISRSs ou outras classes de antidepressivos. Além de potencialmente acelerar o efeito terapêutico do escitalopram, nós hipotetizamos que o CBD pode ser uma alternativa para pacientes não responsivos à monoterapia. Em 3 relatos de caso descritos em Scarante et al. (2021-*preprint*), encontramos que pacientes com depressão resistente a tratamento que estavam há mais de 2 anos em um episódio depressivo e sem responder de forma satisfatória a nenhum dos tratamentos (seja em monoterapia, seja a combinação com antipsicóticos ou com antidepressivos de outras classes), receberam por 12 semanas a terapia com CBD (300mg) de forma complementar ao tratamento com antidepressivos convencionais. 2 dos 3 pacientes tiveram remissão completa e 1 dos pacientes respondeu com uma melhora superior a 50% dos sintomas de depressão e ansiedade. Em conjunto com os nossos dados em modelo pré-clínico, essas evidências clínicas iniciais destacam o potencial do CBD como uma alternativa para potencializar a resposta a antidepressivos.

Um potencial benefício de combinar o ISRS com o CBD é a possibilidade de redução dos efeitos colaterais associados à terapia com o antidepressivo. Por exemplo, dois dos efeitos colaterais comumente relatados por pacientes que fazem uso de escitalopram são náusea e um efeito ansiogênico nos primeiros dias de tratamento. Rock e colaboradores (2020) demonstraram que tanto o tratamento agudo quanto o tratamento repetido com CBD (5 mg/kg) induziu um efeito anti-náusea em um modelo de vômito induzido por fármaco em *Suncus murinus* (ROCK et al., 2020). Além disso, o efeito do tipo-ansiolítico do CBD foi reportado em diferentes modelos murinos (CAMPOS et al., 2013; GUIMARÃES et al., 1990). Zuardi e colegas (1982) demonstraram em voluntários saudáveis que o tratamento com CBD reduz o estímulo ansiogênico promovido por outro fármaco, o 9-tetrahydrocannabinol (ZUARDI et al., 1982). Futuros estudos deverão ser conduzidos para caracterizar o potencial do CBD em reduzir os efeitos colaterais associados ao tratamento com escitalopram.

5.2. Estresse e tratamento não alteraram comportamento do tipo-depressivo no splash-test

O comportamento de auto-limpeza (*grooming*) é considerado como um indicativo do estado emocional de roedores. Nós avaliamos esse parâmetro através do *splash-test*. Entretanto, não encontramos um efeito significativo do estresse sobre o padrão de auto-limpeza dos animais. Em concordância com esse achado, Ducottet e Belzung (2004) encontraram que, enquanto camundongos BALB/c apresentaram uma significativa redução do comportamento de auto-limpeza quando expostos a 2 semanas de estresse crônico imprevisível, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos estressados e não-estressados da linhagem C57BL6 (DUCOTTET; BELZUNG,

2004). Isso pode inclusive refletir em outros efeitos do estresse. A linhagem C57Bl6, utilizada em nosso estudo, também não apresentou alterações significativas no estado da sua pelagem (analisada com base na detecção de dano, sujeira ou piloereção) frente a exposição a 2 semanas de estresse, ao contrário do observado para as linhagens BALB/c, DBA/2, C3H/He, FVB/NA e 129/Sv (DUCOTTET; BELZUNG, 2005).

O tratamento com a combinação de escitalopram e CBD também não alterou significativamente a resposta dos animais no splash-test. É possível que 7 dias de tratamento não sejam suficientes para a indução de um efeito do tipo-antidepressivo ou que outras combinações de dose sejam mais eficientes para gerar esse efeito. Nosso grupo demonstrou que o tratamento com CBD (30mg/kg) pode induzir um efeito do tipo-ansiolítico em animais estressados após 1 semana de tratamento. Entretanto, Hou e colegas (2022) que o efeito do tipo-antidepressivo do CBD em camundongos expostos a estresse crônico de restrição foi observado após 3 semanas de tratamento. De modo semelhante, em ratos expostos a um protocolo de estresse heterotípico, o efeito do tratamento com CBD sobre a resposta de preferência por sacarose de animais estressados só foi observado a partir do 21º dia de tratamento (GÁLL et al., 2020).

O efeito do tratamento também pode estar associado a linhagem de camundongos utilizada. Silote e colaboradores (2021) reportaram que o efeito do tipo-antidepressivo do tratamento agudo com CBD é dependente da linhagem e do sexo. Enquanto em camundongos Swiss machos, mas não em fêmeas, o tratamento com CBD induziu uma significativa redução no tempo de imobilidade dos animais no teste de suspensão pela cauda, em camundongos C57Bl6 (tanto machos quanto fêmeas) a administração única

de CBD não induziu um efeito do tipo-antidepressivo no mesmo teste comportamental (SILOTE et al., 2021).

Além disso, existem evidências de que o efeito comportamental do tipo-antidepressivo pode ser dependente de um fenótipo do tipo-depressivo nos animais. CBD (30mg/kg) reduziu o tempo de imobilidade e aumentou a preferência por sacarose em camundongos nos quais o tratamento com lipopolissacarídeo induziu um fenótipo do tipo-depressivo. Em camundongos naive, entretanto, o CBD não alterou significativamente a resposta nos mesmos testes comportamentais (FLORENSA-ZANUY et al., 2021). De modo semelhante, em ratos, um modelo de dor crônica induzido pela constrição crônica do nervo ciático leva a um estado do tipo-depressivo. Nesses animais, o tratamento com CBD (60mg/kg) induz um efeito do tipo-antidepressivo no teste de nado forçado, mas o efeito do CBD não é observado em ratos Sham (MALVESTIO et al., 2021). Um padrão semelhante é reportado para os efeitos do escitalopram. Gołyszny e colaboradores (2022) reportaram que a exposição a separação materna induziu um fenótipo do tipo-depressivo em ratos e o tratamento com escitalopram por 3 semanas induziu um efeito do tipo-depressivo no teste do nado forçado, apesar do mesmo regime de tratamento não alterar a resposta comportamental de animais não-estressados (GOŁYSZNY et al., 2022). Dessa forma, a combinação de escitalopram e CBD pode não ter promovido um efeito do tipo-antidepressivo devido ao fato de não observarmos um fenótipo do tipo-depressivo no *splash-test* em camundongos expostos a 10 dias de estresse. Novos experimentos adequando a duração do estresse são necessários para promover um estado do tipo-depressivo em nosso modelo animal, o que permitirá a melhor

caracterização da potencial ação do tipo-antidepressiva da combinação de escitalopram com CBD.

5.3.A combinação de escitalopram e CBD: 1 semana é suficiente contra 3 semanas de estresse

Nossos achados reportando um efeito antiestresse da combinação de escitalopram e CBD após 7 dias de tratamento em camundongos expostos a 10 dias de estresse levantaram a questão se o mesmo efeito seria observado frente a um protocolo prolongado de estresse. Nossos achados indicaram que mesmo em camundongos expostos a 21 dias de estresse, um efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD foi evidente com os mesmos 7 dias de tratamento. Essas evidências reforçam que a combinação proposta em nosso estudo induz um consistente efeito comportamental antiestresse.

Uma potencialização na ação de antidepressivos por fármacos canabinóides foi reportada frente ao tratamento agudo. Adamczyk e colegas (2008) reportaram que a combinação de doses subefetivas de imipramina e AM404 (inibidor da recaptção de endocanabinóides), URB597 ou CP55,940 (agonista CB1) induziu um efeito do tipo-antidepressivo no nado forçado. De modo semelhante, a combinação de doses subefetivas de citalopram e AM404 induziu uma redução na imobilidade de ratos no mesmo teste comportamental (ADAMCZYK et al., 2008). A terapia complementar aguda com ACEA (agonista CB1) potencializou o efeito do tipo-antidepressivo da administração única de uma dose efetiva de fluoxetina em camundongos (RUTKOWSKA; JACHIMCZUK, 2004). Ademais, Sales e colaboradores (2018) reportaram que canabidiol potencializou o efeito do tipo-antidepressivo da fluoxetina, mas não da desipramina, no

teste do nado forçado (SALES et al., 2018). Entretanto, é importante considerar as limitações do teste de nado forçado como um modelo de comportamento do tipo-depressivo. Alterações no comportamento de imobilidade durante o teste refletem uma resposta adaptativa caracterizada por uma estratégia passiva de enfrentamento frente a exposição a um estressor agudo (MOLENDIJK; DE KLOET, 2015). Hawkins e colaboradores (1978) questionaram a interpretação do modelo proposto por Porsolt como um indicativo de uma resposta emocional e propuseram que, na verdade, os animais aprendem a ficar imóveis como uma estratégia para conservar a energia que seria despendida pela estratégia ativa de enfrentamento (natação) (HAWKINS et al., 1978).

Em protocolo de tratamento repetido, em um modelo de transtorno de estresse pós-traumático o CBD (20mg/kg) induziu um efeito do tipo-ansiolítico que foi potencializado pelo ISRS sertralina (10mg/kg) após o tratamento por 3 semanas (GASPARYAN; NAVARRETE; MANZANARES, 2021). Nosso trabalho é o primeiro a demonstrar, entretanto, que o efeito do tipo-ansiolítico de um ISRS quando combinado a uma dose subefetiva de CBD é acelerado em camundongos expostos a 21 dias de estresse repetido.

Uma importante limitação do teste do nado forçado e de testes como o labirinto em cruz elevado é que eles não mimetizam o que é observado na clínica com relação a latência para indução do efeito terapêutico. Antidepressivos clássicos, quando administrados agudamente, geram respostas preditivas de um efeito do tipo-antidepressivo nesses testes. O NSF, utilizado em nosso protocolo, apresenta como vantagem o fato de não ser sensível ao efeito agudo ou subcrônico com antidepressivos clássicos. Bodnoff e colaboradores (1988) observaram em ratos que uma única

administração sistêmica de desipramina ou de amitriptilina não alterou significativamente a latência para que os animais se alimentassem em um contexto de neofobia (BODNOFF et al., 1988). Ademais, eles demonstraram que a administração subcrônica de desipramina (7 dias) também não alterou significativamente a latência para se alimentar no novo ambiente e o efeito do tipo-ansiolítico do antidepressivo só foi observado nesse teste comportamental após 14 ou 21 dias de tratamento (BODNOFF et al., 1988). De modo semelhante, em camundongos 5 dias de tratamento com fluoxetina ou imipramina não foram suficientes para alterar a resposta no NSF e o efeito do tipo-ansiolítico dos antidepressivos foi evidenciado nesse teste após 28 dias de tratamento (SANTARELLI et al., 2003). Essa característica do NSF, aliada a dados prévios em que observamos que o tratamento com escitalopram reduz a latência para animais estressados se alimentarem em um contexto de neofobia após 14 (na dose de 20mg/kg) ou 21 dias (10mg/kg) de tratamento (SCARANTE et al., 2021; RIBEIRO et al., em revisão), nos permite concluir que a terapia complementar com uma dose subefetiva de CBD acelerou o efeito do tipo-ansiolítico do escitalopram.

Uma das limitações do nosso estudo é que não encontramos uma diferença estatisticamente significativa nas respostas comportamentais do grupo controle e do grupo submetido a 21 dias de CUS e tratado apenas com veículo. Uma das possíveis explicações é a variabilidade de resposta que encontramos no grupo controle. A dispersão dos dados do nosso grupo controle, entretanto, é semelhante a descrita em outros estudos (TURCOTTE-CARDIN et al., 2019). Além disso, antes dos 180 segundos de teste, enquanto 63,6% dos animais do grupo controle ainda não se alimentaram, no grupo CUS tratado apenas com veículo, 100% dos animais não haviam se alimentado,

indicando que há uma diferença no perfil comportamental dos grupos. Além disso, os animais do grupo controle são submetidos a 2 injeções diárias de veículo durante os 7 dias de tratamento. Em animais susceptíveis, as injeções podem ser um fator estressante significativo e gerar um efeito do tipo-ansiogênico (DU PREEZ et al., 2020).

Ademais, é possível que alguns animais submetidos a CUS apresentem um perfil comportamental de resiliência a estresse. Entretanto, a definição de critérios para caracterizar resiliência em modelos animais é complexa. É necessário definir critérios claros para definir limiares para diferenciar resiliência de uma variabilidade de resposta biológica normal e, além disso, empregar um teste comportamental que tenha sensibilidade o suficiente para caracterizar essas nuances. Alguns grupos tem despendido esforços na caracterização de biomarcadores de resiliência em modelos murinos (HENNINGSEN et al., 2012; LANGGARTNER et al., 2018; SOLICH et al., 2020; TORRES-BERRÍO et al., 2019; VAN DER ZEE et al., 2022). É possível que, no futuro, tais biomarcadores possam ser utilizados como uma estratégia mais objetiva de caracterização de resiliência ou susceptibilidade a estresse. Apesar de não termos encontrado um efeito significativo do estresse no NSF, isso não invalida o efeito do tratamento com escitalopram e CBD em camundongos estressados, especialmente considerando que esse foi o único grupo experimental em que todos os animais tiveram uma latência inferior a 350 segundos para se alimentar em um contexto de neofobia, indicando um robusto efeito do tipo-ansiolítico.

Apesar de considerarmos que o efeito da combinação de escitalopram e CBD envolve primariamente uma interação farmacodinâmica entre os fármacos, não podemos descartar potenciais interações farmacocinéticas. Anderson e colaboradores (2021)

investigaram *in vitro* o impacto de CBD sobre a metabolização de diferentes ISRS por diferentes isoformas de CYP450. Eles reportaram que CBD foi um inibidor do metabolismo de fluoxetina e sertralina mediado pelas isoformas CYP2D6, CYP2C9 e CYP2C19, com valores de K_i que variaram entre 1,1 μ M até acima de 10 μ M. O CBD inibiu o metabolismo de escitalopram e citalopram mediado por CYP3A4 com um K_i de 0,68 μ M e 1,6 μ M, respectivamente, e o mediado por CYP2C19 com um K_i de 1,4 μ M e 1,1 μ M, respectivamente (ANDERSON et al., 2021).

5.4. Estresse e o tratamento com escitalopram e CBD alteram o padrão de expressão de NAPE-PLD no CPF

Nós observamos que a exposição a estresse reduziu significativamente a expressão de NAPE-PLD na porção pré-límbica do CPF medial. Embora no protocolo de 21 dias de estresse o valor de p não tenha indicado um efeito significativo do fator estresse, graficamente observamos uma tendência e a diferença estatística possivelmente não foi observada devido ao baixo n . De qualquer forma, uma redução na expressão de NAPE-PLD está de acordo com evidências prévias descrevendo uma significativa redução de NAEs frente à exposição a estresse repetido (HILL et al., 2010). Ademais, McLaughlin e colaboradores (2012) demonstraram que exposição a um estressor agudo reduziu os níveis de NAEs e o aumento dos níveis desses mediadores através da injeção intra-CPF de URB597 promoveu um efeito do tipo-antidepressivo acompanhado por um aumento no disparo de neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe (MCLAUGHLIN et al., 2012). De modo interessante, a exposição de ratos machos a uma dieta hipercalórica durante a gestação ou no período pós-natal gerou um efeito do

tipo-ansiógênico que foi acompanhada por uma significativa redução nos níveis de mRNA de NAPE-PLD no CPF (RIVERA et al., 2020).

O ECBoma regula a plasticidade sináptica de uma variedade de tipos celulares no sistema nervoso central. Pickel e colaboradores (2012) descreveram a expressão de NAPE-PLD em terminais associados a sinapses simétricas (do tipo inibitórias) e assimétricas (do tipo excitatórias) no globo pálido ventral de camundongos (PICKEL et al., 2012). Kucera e colegas (2018) descreveram que NAPE-PLD foi expressa tanto em neurônios espinhosos médios quanto em interneurônios PV-positivos no núcleo accumbens de macaco-vervet (KUCERA et al., 2018). Ademais, NAPE-PLD foi detectada em 16,9-21,1% de células PV-positivas no giro denteado, em 11,6-20,3% das células PV-positivas da região CA3 e em 11,3-15,4% das células PV-positivas da região CA1 do hipocampo (RIVERA et al., 2014).

PV é uma proteína ligante de cálcio cuja expressão é detectada em populações específicas de interneurônios de disparo rápido. No CPF, nós observamos que mais de 70% das células do grupo controle eram positivas para a marcação de NAPE-PLD. Dentre os animais submetidos a estresse que não receberam tratamento com princípios ativos, 54% das células PV foram NAPE-PLD-positivas. De modo interessante, entretanto, nos animais submetidos a CUS e tratados por 7 dias com a combinação de escitalopram e CBD, a porcentagem de células PV-positivas expressando NAPE-PLD foi significativamente aumentada, chegando a ser superior a 80%. Essa alteração no padrão de expressão de NAPE-PLD nessa população de interneurônios pode implicar em alterações funcionais relevantes.

Manz et al. (2020) descreveram que, no núcleo *accumbens* de camundongos, o influxo de cálcio através de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA promove a síntese de endocanabinóides, que, atuando via CB1, promovem uma inibição da liberação de glutamato, com uma redução persistente de correntes pós-sinápticas excitatórias, caracterizando um fenômeno de depressão de longo prazo. Tratamento com URB597, mas não com um inibidor da degradação de 2-AG, impactou significativamente essa resposta, indicando que o fluxo de cálcio através de receptores AMPA em interneurônios AMPA induz uma LTD dependentes de CB1 em terminais glutamatérgicos através da síntese, primariamente, de AEA (MANZ et al., 2020).

Além de recrutar a sinalização endocanabinóide para regular terminais glutamatérgicos, estudos demonstram que populações de interneurônios corticais podem ativar uma sinalização endocanabinóide autócrina. Bacci e colegas (2004) descreveram que no córtex somatossensorial de ratos um fenômeno de auto-inibição lenta significativamente inibido na presença de agonista inverso CB1 (BACCI; HUGUENARD; PRINCE, 2004). Resultados semelhantes foram descritos por Marinelli et al. (2008).

A expressão de NAPE-PLD também foi detectada em astrócitos GFAP-positivos, micróglia CD68 e HLA-DR-positivas, células endoteliais CD34-positivas e periquitos SMA-positivos no cérebro humano (ZHANG et al., 2011). Além disso, outras populações neuronais podem expressar NAPE-PLD (RIVERA et al., 2014). Dessa forma, não podemos descartar que a expressão da enzima em outras populações celulares possa ser significativamente impactada pela exposição a estresse e pelo tratamento com a combinação de escitalopram e CBD. Além disso, será necessário aumentar o nosso n experimental em nosso protocolo de imunomarcação para melhor caracterizar o efeito do

estresse e do tratamento sobre o perfil de expressão de NAPE-PLD. A limitação do n pode explicar o porquê de não detectarmos um efeito estatisticamente significativo do tratamento com relação aos níveis de NAPE-PLD no CPF, mas no protocolo de 21 dias de estresse e 7 dias de tratamento, observamos no gráfico uma clara tendência de aumento. Já no protocolo de 10 dias de estresse e 7 dias de tratamento, os tecidos foram coletados 3 dias após o teste comportamental, ou seja, os animais já estavam a 4 dias sem receber tratamento. Essa limitação pode ter impactado na caracterização do efeito tanto do estresse quanto do tratamento sobre a expressão de NAPE-PLD no CPF.

5.5. Papel do ECBoma no efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD em camundongos estressados

O aumento nos níveis de AEA e de LTEs que compartilham a mesma via de síntese desse endocanabinóide é um efeito robustamente associado ao tratamento com CBD em modelos in vivo e in vitro (BISOGNO et al., 2001; CAMPOS et al., 2013; ELMES et al., 2015; WATANABE et al., 1996)(BISOGNO et al., 2001; CAMPOS et al., 2013; ELMES et al., 2015; WATANABE et al., 1996). O tratamento repetido com escitalopram também gera um aumento nos níveis de AEA e outras NAEs em regiões do sistema límbico do cérebro de ratos (SMAGA et al., 2014). Nosso estudo é o pioneiro, entretanto, em demonstrar que a expressão de uma enzima responsável pela síntese desses ligantes do ECBoma em uma região específica do encéfalo (CPF) é importante para o efeito comportamental de escitalopram e CBD.

Em dados prévios, nós comparamos o efeito da combinação de escitalopram e CBD com o efeito da combinação do mesmo antidepressivo com uma dose subefetiva do inibidor da enzima FAAH URB597. Entretanto, a combinação de escitalopram + URB597

não produziu um efeito do tipo-ansiolítico em camundongos estressados. Embora AEA e algumas NAEs sejam alvo de degradação via FAAH, nem todos os mediadores da via de síntese dependente da atividade de NAPE-PLD são metabolizados por essa enzima. Isso sugere que outros mediadores que não só a AEA podem ser recrutados frente ao tratamento com a combinação de escitalopram e CBD. Em concordância com a hipótese que o tratamento com CBD pode desencadear um aumento nos níveis de NAEs e NAANs através de um mecanismo distinto em comparação ao URB597, Leishman e colaboradores (2018) demonstraram que células BV2 (micróglia) tratadas com CBD apresentam um perfil lipídômico distinto em comparação ao perfil lipídômico observado nessas células após o tratamento com URB597. Além disso, em animais WT, CBD gerou um aumento significativo de NAEs no córtex, hipocampo, cerebelo, tálamo, mesencéfalo e tronco encefálico. No entanto, em animais com deleção genética (*knock-out*, KO) da enzima NAPE-PLD, o tratamento com CBD não alterou os níveis de NAEs em nenhuma das regiões listadas (LEISHMAN et al., 2018).

A deleção da expressão da enzima NAPE-PLD altera de forma significativa os níveis de diferentes NAEs e NAANs no encéfalo. Leishman e colaboradores (2016) caracterizaram o perfil de lipídoma do encéfalo de camundongos NAPE-PLD KO. No córtex, camundongos NAPE-PLD KO apresentaram uma redução significativa nos níveis de AEA, OEA, PEA, N-linoleoil-etanolamina, N-estearoil-etanolamina e N-docosahexaenoil-etanolamina. Entretanto, a deleção de NAPE-PLD também levou a um aumento nos níveis de N-acil-glicinas, prostaglandina E2 e prostaglandina F2 α . Não podemos desconsiderar, portanto, que o aumento desses mediadores possa interferir com a resposta comportamental ao tratamento com escitalopram e CBD. No entanto, a

abordagem de KD de expressão das enzimas mediado por um vetor viral carreando um sistema CRISPR-Cas9, utilizada em nosso estudo, apresenta a vantagem de promover a deleção com alta seletividade dos alvos (NAPE-PLD ou DAGL) direcionada para uma região encefálica específica e restrita apenas às células que foram transfectadas pelo vírus. Essa abordagem de deleção restrita e direcionada tem a vantagem em relação a estratégias de KO global de não permitir alterações adaptativas de longo-prazo que possam acontecer em resposta à ausência da enzima, especialmente durante o neurodesenvolvimento. Atribuímos ao fenômeno da deleção da enzima NAPE-PLD ser direcionada a uma população restrita de células no CPF em nosso protocolo, o fato de que não encontramos uma diferença significativa nos níveis de AEA nos animais que receberam a injeção intra-CPF do vetor lentiviral que direcionava a deleção da enzima. A análise foi realizada no CPF total e não apenas no sítio de injeção ou nas células transfectadas. Estratégias mais refinadas serão utilizadas no futuro para a melhor caracterização dos níveis de ligantes do ECBoma frente a deleção da enzima NAPE-PLD no CPF. Isso vale também para o protocolo de deleção da enzima DAGL α .

Além do ligante clássico do ECBoma AEA, NAEs e NAANs podem interagir diretamente com diferentes alvos do ECBoma, incluindo receptores canabinóides. Estudos prévios caracterizaram o papel dos receptores CB1 e CB2 nos efeitos comportamentais e neuroplásticos antiestresse tanto do escitalopram quanto do CBD. O efeito do tipo-ansiolítico, o efeito pró-neurogênico e pró-sinaptogênico do tratamento por 14 dias com CBD na dose de 30mg/kg em camundongo foi bloqueado pelo tratamento prévio quanto com com AM251 (agonista inverso CB1) quanto AM630 (agonista inverso CB2), indicando que a atividade de ambos os receptores canabinóides é necessária para

os efeitos antiestresse do CBD (CAMPOS et al., 2013; FOGAÇA et al., 2018). Ribeiro e colaboradores (2022), por sua vez, demonstraram que o tratamento com escitalopram (10mg/kg) por 21 dias induz um aumento no número de células DCX-positivas no giro denteado do hipocampo. Esses estudos investigaram o efeito de monoterapia com CBD ou escitalopram. Em nosso estudo, não realizamos a caracterização do papel de receptores canabinóides através de inibição farmacológica, mas considerando essas evidências prévias descrevendo o papel de receptores canabinóides nos efeitos antiestresse de CBD e escitalopram, é possível que, quando combinados, a atividade de NAPE-PLD seja recrutada, levando a síntese de AEA e NAEs que podem atuar como agonistas de receptores canabinóides CB1 e CB2.

As NAANs são outros ligantes do ECBoma cuja síntese pode envolver a atividade de NAPE-PLD. As NAANs incluem: N-acil-triptofano, N-araquidonoil-GABA, N-acil-dopamina e n-acil-serotoninas como a n-araquidonoil-serotonina (AA-5-HT). N-acil-serotoninas são particularmente interessantes para o contexto do nosso estudo, já que o aumento nos níveis desses mediadores pode potencialmente acontecer através de 2 mecanismos sinérgicos: (1) Escitalopram, como um ISRS, aumenta o conteúdo de serotonina na fenda sináptica, e (2) CBD aumenta a atividade de NAPE-PLD, aumentando o conteúdo de NAEs e facilitando a conjugação de serotonina com ácido araquidônico.

De modo interessante, Navarra e colegas (2014) demonstraram que o tratamento com AA-5-HT reduz os níveis plasmáticos de corticosterona e promove um efeito do tipo-antidepressivo em ratos expostos a estresse agudo de restrição por 4h (NAVARRIA et al., 2014). Ademais, AA-5-HT tem um mecanismo de ação dual, atuando como um

inibidor de FAAH e um antagonista de receptor TRPV1. Ao inibir FAAH AA-5-HT pode aumentar o tempo de meia-vida e a disponibilidade de NAEs. Ao mesmo tempo, por antagonizar TRPV1, um receptor associado ao efeito do tipo-ansiolítico de doses elevadas de fármacos canabinóides (CAMPOS; GUIMARÃES, 2009), AA-5-HT pode facilitar a atuação dos ligantes do ECBoma em receptores canabinóides, os quais são associados a efeitos comportamentais e neuroplásticos antiestresse (CAMPOS et al., 2013; FOGAÇA et al., 2018).

Demonstramos que o efeito do tipo-ansiolítico da combinação de escitalopram e CBD foi independente da expressão da enzima DAGL α no CPF. Mediadores do ECBoma sintetizados por essa enzima têm propriedades farmacológicas distintas em comparação aos efeitos dos mesmos estímulos sobre mediadores cuja via de síntese depende da atividade de NAPE-PLD. Sugiura e colaboradores (1995) demonstraram em sinaptosomas de rato que 2-AG tem uma menor afinidade que AEA pela ligação a receptores CB1 (SUGIURA et al., 1995). Em uma cultura híbrida de células de neuroblastoma e glioma, foi demonstrado que 2-AG atua como um agonista pleno de receptores CB1, enquanto AEA atua como um agonista parcial (SUGIURA et al., 1999). De modo semelhante, enquanto 2-AG foi caracterizado como um agonista pleno de receptores CB2, AEA atuou como um agonista parcial desse receptor e PEA não demonstrou afinidade pela ligação ao receptor (GONSIORREK et al., 2000; SUGIURA et al., 2000).

Produtos de DAGL e da NAPE-PLD são diferencialmente afetados por estresse. Hill e colaboradores (2009) demonstraram que os níveis séricos de 2-AG são elevados e os de NAEs como PEA e OEA são significativamente reduzidos quando indivíduos com

depressão são expostos a um estímulo estressor (HILL et al., 2009). Os níveis de AEA foram significativamente reduzidos no córtex frontal, hipocampo, hipotálamo e amígdala de ratos expostos a estresse de restrição. Por outro lado, os níveis de 2-AG foram elevados na amígdala de ratos expostos ao mesmo estresse (HILL et al., 2010). De modo similar, Zhai e colegas (2023) demonstraram que a exposição a estresse de restrição elevou os níveis de 2-AG e reduziu os níveis de seus precursores no córtex cingulado anterior, caudado putamen, núcleo *accumbens* e córtex piriforme (ZHAI et al., 2023).

O tratamento por 14 dias com escitalopram, aumentou significativamente os níveis de AEA e aumentou a expressão de NAPE-PLD no hipocampo e estriado dorsal de ratos, bem como reduziu a expressão de FAAH no estriado dorsal (SMAGA et al., 2014, 2019)

Por outro lado, com o mesmo regime de tratamento os níveis de 2-AG foram significativamente reduzidos e os níveis da enzima de degradação de 2-AG MAGL foram significativamente aumentados no CPF de ratos (SMAGA et al., 2014, 2019). De forma semelhante, o tratamento repetido com CBD (30mg/kg), embora promova um aumento significativo nos níveis hipocampais de AEA, não altera significativamente os níveis de 2-AG (CAMPOS et al., 2013). Nossos dados fornecem uma nova evidência de que diferentes ligantes do ECBoma podem atuar de forma distinta no contexto de estresse e em mecanismos farmacológicos associados a ação antiestresse.

5.6. Estresse induz uma hipofunção cortical

O CPF exerce um controle sobre funções cognitivas, comportamentos motivados, respostas defensivas e comportamentos afetivos (ARNSTEN et al., 2015). Essa região é altamente susceptível aos efeitos do estresse. Aqui, encontramos uma redução no número de espinhos dendríticos em neurônios piramidais do CPF medial, o que está de

acordo com uma hipofunção cortical induzida por estresse repetido reportada previamente (ANDERSON et al., 2019; SHEPARD; COUTELLIER, 2018).

Shepard e Coutellier (2018) descreveram que a hipofunção do CPF após 2 semanas de CUS foi resultado de um aumento na atividade glutamatérgica especificamente em interneurônio PV-positivos, gerando um maior controle inibitório local (SHEPARD; COUTELLIER, 2018). É possível que a redução no número de espinhos dendríticos observada em nosso estudo esteja relacionada a um mecanismo semelhante. Nesse contexto, o aumento na porcentagem de células PV que expressam NAPE-PLD promovido pela combinação de escitalopram e CBD poderia levar a produção de mediadores do ECBoma por essas células que podem promover uma desinibição do CPF através: (1) da ativação de receptores CB1 nos terminais glutamatérgicos que estão estimulando os interneurônios PV; ou (2) uma sinalização autócrina nos interneurônios PV, levando a uma auto-inibição, conforme discutido anteriormente.

Alterações no ECBoma podem impactar diretamente a plasticidade sináptica de neurônios piramidais no CPF. Hill e colaboradores (2011) demonstraram que camundongos KO para o receptor CB1 apresentam um fenótipo comportamental que mimetiza o de camundongos expostos a estresse repetido, com um perfil do tipo-ansiolítico no teste de labirinto em cruz-elevado. Tanto animais estressados quanto animais CB1 KO apresentaram uma redução significativa na arborização dendrítica de neurônios piramidais das camadas II/III do CPF medial (HILL; HILLARD; MCEWEN, 2011). Dessa forma, a redução na expressão de NAPE-PLD detectada em camundongos expostos a estresse pode implicar em uma significativa redução na produção de agonistas endógenos de receptores CB1, o que, por sua vez, pode impactar a

plasticidade sináptica de neurônios piramidais no CPF, gerando a redução no número de espinhos dendríticos descrita em nosso estudo.

5.7. Impacto do estresse sobre a plasticidade de CPOs

Nós observamos que a exposição a 10 dias de estresse heterotípico aumentou significativamente a sobrevivência de células NG2-positivas em atividade proliferativa. Esse resultado está de acordo com evidências apontando para o impacto do estresse na plasticidade de células de linhagem oligodendrocítica e no processo de mielinização no CPF. Bonnefil e colaboradores (2019) demonstraram que camundongos susceptíveis a estresse de derrota social apresentaram uma redução na espessura de mielina em axônios de neurônios do CPF medial. Essa alteração foi acompanhada por um aumento no número de células NG2-positivas, uma redução em um marcador associado a regulação epigenética de diferenciação de CPOs e uma redução no número de oligodendrócitos maduros CC1-positivos (BONNEFIL et al., 2019). Um aumento na sobrevivência de células CPOs com atividade proliferativa pode ser uma resposta compensatória ao efeito deletério do estresse sobre o processo de mielinização. Futuros estudos serão necessários para melhor caracterizar o perfil de mielinização e diferenciação de CPOs no CPF em nosso protocolo.

Nós observamos que os animais estressados tratados com a combinação de escitalopram e CBD não apresentaram o mesmo perfil de aumento na sobrevivência de CPOs em atividade proliferativa. Isso pode refletir um efeito antiestresse do tratamento modulando a plasticidade dessas células gliais.

De modo interessante, o ECBoma está envolvido com a regulação da plasticidade de CPOs e com o processo de mielinização. Molina-Holgado e colegas (2002)

demonstraram que células de linhagem oligodendrocítica do cérebro de ratos expressam receptor CB1. Eles demonstraram *in vitro* que agonistas canabinóides exerceram um efeito anti-apoptótico em CPOs através da ativação da via PI3K/Akt (MOLINA-HOLGADO et al., 2002). Sun e colaboradores (2013), por sua vez, demonstraram em ratos com desmielinização induzida por um modelo de derrame cerebral que o tratamento com o agonista canabinóide WIN55,212-2 aumentou a sobrevivência e diferenciação de CPOs e promoveu um aumento da mielinização de modo dependente, em parte, da ativação de receptor CB1 (SUN et al., 2013). Mais recentemente, Sánchez-de la Torre (2022) demonstraram que o KO condicionado de CB1 em CPOs causa um prejuízo na diferenciação em oligodendrócitos e promove um déficit de mielinização no corpo caloso, CPF, hipocampo e cerebelo. De forma interessante, essas alterações foram acompanhadas por um fenótipo comportamental do tipo-ansiosígeno no labirinto em cruz elevado (SÁNCHEZ-DE LA TORRE et al., 2022). Em um modelo animal de demielinização-induzida por cuprizona, houve uma redução significativa no nível de NAEs no corpo caloso (MANTEROLA et al., 2018).

5.8. Efeito do estresse e tratamento sobre a proliferação de células precursoras neurais

A exposição a estresse não alterou significativamente a proliferação de células no giro denteado e não houve uma diferença na proporção de células em proliferação do tipo 1 e do tipo 2. O tratamento com a combinação de escitalopram e CBD não alterou significativamente esses parâmetros. Entretanto, o n baixo utilizado nessa análise é uma limitação relevante para a interpretação desse resultado.

De modo interessante, nós observamos no grupo de animais estressados tratados com veículo uma tendência gráfica de redução na porcentagem de células em proliferação que expressavam ambos os marcadores, GFAP e Sox2, um fenótipo molecular característico de células tronco neurais do tipo glia-radial (ou células do tipo 1). Isso pode indicar um efeito do estresse em reduzir a proliferação de células tronco neurais. Uma redução da proliferação de células GFAP/Sox2-positivas frente a exposição a estresse de restrição repetido (JUNG et al., 2020). Hillerer e colaboradores (2013) demonstraram que ratos expostos a 12 dias de estresse de restrição apresentaram uma redução significativa no número de células precursoras Sox2-positivas em proliferação, com um aumento concomitante do número de células precursoras Sox2-positivas e PCNA-negativas, uma identidade molecular de células em estado de quiescência (HILLERER et al., 2013). Um efeito do estresse em prolongar o estado de quiescência foi descrito em outras populações de células tronco (CHOI et al., 2021).

Nos animais estressados tratados com a combinação de escitalopram e CBD, por outro lado, observamos uma maior porcentagem de células em proliferação com fenótipo molecular característico de células do tipo 1. Dessa forma, é possível que o tratamento contrabalanceie o efeito do estresse em reduzir a proliferação e possivelmente prolongar o estado de quiescência de células tronco neurais. Li e colaboradores (2021) demonstraram que células tronco neurais adultas tratadas com corticosterona apresentam uma redução na proliferação *in vitro*. O tratamento com o ISRS fluoxetina, por sua vez, aumentou significativamente a proliferação de células tronco neurais expostas a corticosterona (LI et al., 2021). De modo semelhante, Hitoshi e colaboradores (2007) estimularam a população de células tronco neurais na zona subventricular de

camundongos através da contagem de neurosféricas primárias geradas após a dissecação da zona sub-ventricular. Eles reportaram que camundongos expostos a 3 semanas de nado forçado apresentaram uma redução significativa de células tronco neurais e o tratamento com fluoxetina ou imipramina foi capaz de restaurar a população de células tronco neurais na zona sub-ventricular de animais estressados (HITOSHI et al., 2007).

O ECBoma apresenta um papel importante na regulação da proliferação e diferenciação de células precursoras neurais. Jiang e colaboradores (2005) demonstraram que o canabinóide sintético HU210 promove proliferação de células precursoras neurais *in vitro* e *in vivo* (JIANG et al., 2005). O tratamento com CBD promove a proliferação de células precursoras neurais *in vitro*, um efeito prevenido pelo antagonismo de receptores canabinoides CB1 e CB2 e pela superexpressão da enzima FAAH, sugerindo que o efeito pró-proliferativo do CBD é dependente do recrutamento da sinalização do ECBoma (CAMPOS et al., 2013). Ademais, o KO condicionado de receptor CB1 em células precursoras neurais Nestina-positivas reduz significativamente a proliferação de células precursoras e induz uma redução da formação de novos neurônios, além de gerar um déficit na resposta de potenciação de longo prazo e na arborização dendrítica dos novos neurônios formados no giro denteado (ZIMMERMANN et al., 2018).

O processo de neurogênese hipocampal adulta é complexo, envolve etapas sucessivas que dependem da proliferação, quiescência, diferenciação, migração, sobrevivência e integração sináptica das diferentes populações celulares que são geradas ao longo do processo até a gênese de um neurônio granular maduro. As diferentes etapas são finamente reguladas por diferentes mediadores,

neurotransmissores e fatores de transcrição. No anexo A dessa tese, apresentamos resultados de estágio desenvolvido no *Centre for Developmental Neurobiology* da *King's College London*, no qual exploramos o papel de um dos fatores de transcrição implicado no processo de neurogênese (*Ascl1*) na gênese de neurônios a partir da reprogramação de células da glia.

No presente nosso estudo, realizamos uma análise preliminar da proliferação de células Sox2-positivas e GFAP/Sox2-positivas. Além de aumentar o n dessa análise, outros marcadores devem ser utilizados para a melhor caracterização do efeito do estresse e do tratamento sobre a proliferação, sobrevivência e diferenciação de células precursoras neurais no giro denteado.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo nos permitem concluir que, quando combinado com uma dose subefetiva de CBD, o tratamento com o ISRS escitalopram produz um efeito antiestresse de maneira dependente da expressão da enzima NAPE-PLD no CPF ventromedial, indicando uma ligação direta entre o ECBoma e os efeitos comportamentais de escitalopram e CBD.

Os efeitos comportamentais foram acompanhados por alterações plásticas no CPF medial: estresse reduziu o número de espinhos dendríticos de neurônios piramidais e aumentou a densidade de CPOs e a sobrevivência de CPOs em atividade proliferativa. A exposição a estresse repetido também reduziu a expressão de NAPE-PLD, um efeito revertido pelo tratamento com escitalopram em combinação a CBD. A expressão da enzima foi particularmente impactada pelo tratamento em interneurônios PV. O tratamento com a combinação de escitalopram e CBD aumentou a porcentagem desses interneurônios que expressavam a enzima.

Munidos desses resultados, a hipótese de trabalho do nosso estudo é que a exposição a estresse reduz a expressão de NAPE-PLD e gera uma hipofunção cortical. O tratamento com a combinação de escitalopram e CBD promove um efeito antiestresse por restaurar os níveis de NAPE-PLD e favorecer a síntese de ligantes do ECBoma especialmente em interneurônios PV. A sinalização mediada por esses ligantes culmina com a inibição de aferentes que estimulam esses interneurônios, levando a uma desinibição do CPF (Figura 17).

Desse modo, nossos dados evidenciam que o CBD pode ser uma alternativa como terapia complementar para acelerar o efeito do ISRS escitalopram e otimizar sua ação

antiestresse. Permanece por ser testada, entretanto, a generalidade dessa resposta com outros ISRSs ou com antidepressivos de outras classes.

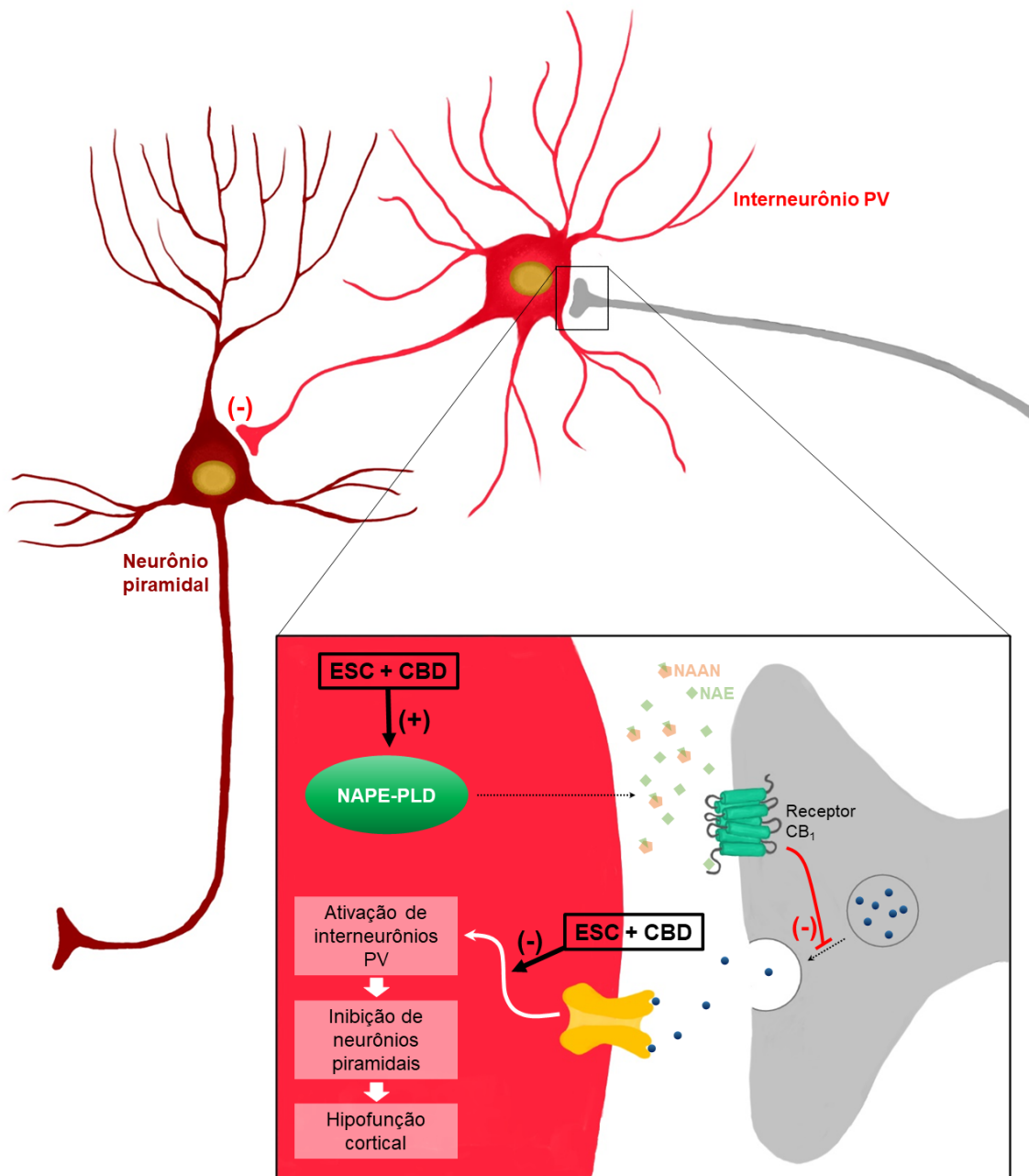


Figura 17. Representação esquemática do mecanismo proposto para o efeito antiestresse de escitalopram e CBD. Na ausência de terapia complementar com CBD, animais expostos a estresse apresentam uma redução da enzima NAPE-PLD. Frente a ativação de interneurônios parvalbumina (PV), ocorre a inibição de neurônios piramidais, contribuindo para um quadro de hipofunção cortical desencadeada por estresse. O tratamento com escitalopram e CBD aumenta a expressão de NAPE-PLD especialmente em interneurônios PV, ativando a síntese de n-acil etanolaminas (NAEs) e N-acil aminoácidos e neurotransmissores (NAANs), os quais atuam através de diferentes alvos farmacológicos, dentre os quais os receptores CB1. A ativação de receptores CB1 em terminais pré-sinápticos que inervam interneurônios PV leva a inibição da ativação dessa população de interneurônios, facilitando a desinibição de neurônios piramidais no córtex pré-frontal medial.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, P.; GOŁDA, A.; MCCREARY, A. C.; FILIP, M.; PRZEGALIŃSKI, E. Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 59, n. 2, p. 217–228, 2008. Disponível em: www.jpp.krakow.pl. Acesso em: 25 fev. 2018.
- AGUADO, Tania et al. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 19, n. 12, p. 1704–1706, 2005. DOI: 10.1096/fj.05-3995fje. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16037095/>. Acesso em: 28 jun. 2021.
- ANDERSON, E. M.; GOMEZ, D.; CACCAMISE, A.; MCPHAIL, D.; HEARING, M. Chronic unpredictable stress promotes cell-specific plasticity in prefrontal cortex D1 and D2 pyramidal neurons. **Neurobiology of Stress**, [S. l.], v. 10, 2019. DOI: 10.1016/j.ynstr.2019.100152. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100152>. Acesso em: 28 nov. 2020.
- ANDERSON, Lyndsey L.; DOOHAN, Peter T.; OLDFIELD, Lachlan; KEVIN, Richard C.; ARNOLD, Jonathon C.; BERGER, Maximus; AMMINGER, G. Paul; MCGREGOR, Iain S. Citalopram and Cannabidiol: In Vitro and In Vivo Evidence of Pharmacokinetic Interactions Relevant to the Treatment of Anxiety Disorders in Young People. **Journal of clinical psychopharmacology**, [S. l.], v. 41, n. 5, p. 525–533, 2021. DOI: 10.1097/JCP.0000000000001427. Disponível em: https://journals.lww.com/psychopharmacology/Fulltext/2021/09000/Citalopram_and_Cannabidiol__In_Vitro_and_In_Vivo.4.aspx. Acesso em: 14 mar. 2023.
- ANSARA, Elayne D. Management of treatment-resistant generalized anxiety disorder. **The Mental Health Clinician**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 326, 2020. DOI: 10.9740/MHC.2020.11.326. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7653736/](https://pmc/articles/PMC7653736/). Acesso em: 4 fev. 2023.
- ARNSTEN, Amy F. T.; RASKIND, Murray A.; TAYLOR, Fletcher B.; CONNOR, Daniel F. **The effects of stress exposure on prefrontal cortex: Translating basic research into successful treatments for post-traumatic stress disorder**. **Neurobiology of Stress** Elsevier Inc, , 2015. DOI: 10.1016/j.ynstr.2014.10.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.10.002>. Acesso em: 28 nov. 2020.
- AXELROD, J.; WHITBY, L. G.; HERTTING, G. Effect of Psychotropic Drugs on the Uptake of H₃-Norepinephrine by Tissues. **Science**, [S. l.], v. 133, n. 3450, p. 383–384, 1961. DOI: 10.1126/science.133.3450.383. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.133.3450.383>. Acesso em: 9 mar. 2018.
- AXELROD, Julius. The Uptake and Release of Catecholamines and the Effect of Drugs. **Progress in Brain Research**, [S. l.], v. 8, p. 81–89, 1964. DOI: 10.1016/S0079-6123(08)60119-3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612308601193>. Acesso em: 9 mar. 2018.
- AXELROD, Julius; HERTTING, Georg; POTTER, Lincoln. Effect of Drugs on the Uptake and Release of 3H-Norepinephrine in the Rat Heart. **Nature**, [S. l.], v. 194, n. 4825, p. 297–297, 1962. DOI: 10.1038/194297a0. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/194297a0>. Acesso em: 9 mar. 2018.

BACCI, Alberto; HUGUENARD, John R.; PRINCE, David A. Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids. **Nature** 2004 **431:7006**, [S. l.], v. 431, n. 7006, p. 312–316, 2004. DOI: 10.1038/nature02913. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature02913>. Acesso em: 12 mar. 2023.

BAMBICO, Francis Rodriguez; BELZUNG, Catherine. Novel Insights into Depression and Antidepressants: A Synergy Between Synaptogenesis and Neurogenesis? *Em: Neurogenesis and Neural Plasticity*. [s.l.] : Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 243–291. DOI: 10.1007/7854_2012_234. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/7854_2012_234. Acesso em: 8 mar. 2018.

BAROWSKY, Jeremy; SCHWARTZ, Thomas L. An Evidence-Based Approach to Augmentation and Combination Strategies for: Treatment-Resistant Depression. **Psychiatry (Edmont (Pa. : Township))**, [S. l.], v. 3, n. 7, p. 42–61, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20975817>. Acesso em: 6 mar. 2018.

BERGER, Maximus et al. Cannabidiol for Treatment-Resistant Anxiety Disorders in Young People: An Open-Label Trial. **The Journal of Clinical Psychiatry**, [S. l.], v. 83, n. 5, p. 42111, 2022. DOI: 10.4088/JCP.21M14130. Disponível em: <https://www.psychiatrist.com/jcp/anxiety/cannabidiol-treatment-resistant-anxiety-disorders-young-people-open-label-trial>. Acesso em: 17 jan. 2023.

BERGLES, D. E.; ROBERTS, J. D.; SOMOGYI, P.; JAHR, C. E. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. **Nature**, [S. l.], v. 405, n. 6783, p. 187–91, 2000. DOI: 10.1038/35012083. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10821275>. Acesso em: 23 ago. 2019.

BESSA, J. M.; FERREIRA, D.; MELO, I.; MARQUES, F.; CERQUEIRA, J. J.; PALHA, J. A.; ALMEIDA, O. F. X.; SOUSA, N. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 764–773, 2009. DOI: 10.1038/mp.2008.119. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18982002/>. Acesso em: 28 jun. 2021.

BIREY, Fikri et al. Genetic and Stress-Induced Loss of NG2 Glia Triggers Emergence of Depressive-like Behaviors through Reduced Secretion of FGF2. **Neuron**, [S. l.], v. 88, n. 5, p. 941–956, 2015. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.10.046. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26606998>. Acesso em: 23 ago. 2019.

BISOGNO, Tiziana et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 134, n. 4, p. 845–852, 2001. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704327. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.bjp.0704327>. Acesso em: 30 jul. 2018.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, [S. l.], v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959. DOI: 10.1139/o59-099. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13671378/>. Acesso em: 26 jan. 2021.

BODNOFF, Shari R.; SURANYI-CADOTTE, Barbara; AITKEN, David H.; QUIRION, Remi; MEANEY, Michael J. The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of

anxiety. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 95, n. 3, p. 298–302, 1988. DOI: 10.1007/BF00181937/METRICS. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00181937>. Acesso em: 14 mar. 2023.

BONNEFIL, Valentina et al. Region-specific myelin differences define behavioral consequences of chronic social defeat stress in mice. **eLife**, [S. l.], v. 8, 2019. DOI: 10.7554/ELIFE.40855. Acesso em: 14 mar. 2023.

BRASLOW, Joel T.; MARDER, Stephen R. History of Psychopharmacology. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-050718-095514>, [S. l.], v. 15, p. 25–50, 2019. DOI: 10.1146/ANNUREV-CLINPSY-050718-095514. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-clinpsy-050718-095514>. Acesso em: 10 jan. 2023.

BRESLAU, Naomi; DAVIS, Glenn C. Chronic Stress and Major Depression. **Archives of General Psychiatry**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 309–314, 1986. DOI: 10.1001/ARCHPSYC.1986.01800040015003. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamapsychiatry/fullarticle/493777>. Acesso em: 9 jan. 2023.

BROWN, Sarah M.; HENNING, Shannon; WELLMAN, Cara L. Mild, Short-term Stress Alters Dendritic Morphology in Rat Medial Prefrontal Cortex. **Cerebral Cortex**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 1714–1722, 2005. DOI: 10.1093/CERCOR/BHI048. Disponível em: <https://academic.oup.com/cercor/article/15/11/1714/296932>. Acesso em: 22 jan. 2023.

Bulário Eletrônico — Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. [s.d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/sistemas/bulario-eletronico>. Acesso em: 3 abr. 2023.

CAMPOS, Alline C. et al. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 16, n. 06, p. 1407–1419, 2013. DOI: 10.1017/S1461145712001502. Disponível em: <https://academic.oup.com/ijnp/article-lookup/doi/10.1017/S1461145712001502>. Acesso em: 5 mar. 2018.

CAMPOS, Alline Cristina; GUIMARÃES, Francisco Silveira. Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 33, n. 8, p. 1517–1521, 2009. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2009.08.017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278584609002826>.

CARLSSON, Arvid; FUXE, Kjell; UNGERSTEDT, Urban. The effect of imipramine of central 5-hydroxytryptamine neurons. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 150–151, 2011. DOI: 10.1111/J.2042-7158.1968.TB09706.X. Disponível em: <https://academic.oup.com/jpp/article/20/2/150/6202149>. Acesso em: 10 jan. 2023.

CARVALHO, André F.; SHARMA, Manu S.; BRUNONI, André R.; VIETA, Eduard; FAVA, Giovanni A. The Safety, Tolerability and Risks Associated with the Use of Newer Generation Antidepressant Drugs: A Critical Review of the Literature. **Psychotherapy and Psychosomatics**, [S. l.], v. 85, n. 5, p. 270–288, 2016. DOI: 10.1159/000447034. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/447034>. Acesso em: 4 fev. 2023.

CASAROTTO, Plinio C.; GOMES, Felipe V.; RESSTEL, Leonardo B. M.; GUIMARÃES, Francisco S. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: Involvement of CB1 receptors. **Behavioural Pharmacology**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 353–358, 2010. DOI: 10.1097/FBP.0b013e32833b33c5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20695034/>. Acesso em: 9 out. 2020.

CHAO, Feng Lei et al. Fluoxetine Promotes Hippocampal Oligodendrocyte Maturation and Delays Learning and Memory Decline in APP/PS1 Mice. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [S. l.], v. 12, p. 494, 2021. DOI: 10.3389/FNAGI.2020.627362/BIBTEX. Acesso em: 28 jan. 2023.

CHEN, Huan; KANG, Zhewei; LIU, Xueqing; ZHAO, Yinglin; FANG, Zeman; ZHANG, Jinling; ZHANG, Handi. Chronic social defeat stress caused region-specific oligodendrogenesis impairment in adolescent mice. **Frontiers in Neuroscience**, [S. l.], v. 16, 2023. DOI: 10.3389/FNINS.2022.1074631/FULL. Disponível em: <https://www.readcube.com/articles/10.3389%2Ffnins.2022.1074631>. Acesso em: 26 jan. 2023.

CHIAPPELLI, Joshua; KOCHUNOV, Peter; SAVRANSKY, Anya; FISSEHA, Feven; WISNER, Krista; DU, Xiaoming; ROWLAND, Laura M.; HONG, L. Elliot. Allostatic load and reduced cortical thickness in schizophrenia. **Psychoneuroendocrinology**, [S. l.], v. 77, p. 105–111, 2017. DOI: 10.1016/J.PSYNEUEN.2016.11.021. Acesso em: 21 jan. 2023.

CHOI, Sekyu et al. Corticosterone inhibits GAS6 to govern hair follicle stem-cell quiescence. **Nature** 2021 592:7854, [S. l.], v. 592, n. 7854, p. 428–432, 2021. DOI: 10.1038/s41586-021-03417-2. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03417-2>. Acesso em: 29 mar. 2023.

CIPRIANI, Andrea et al. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. **The Lancet**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32802-7. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673617328027>. Acesso em: 26 fev. 2018.

COOK, Susan C.; WELLMAN, Cara L. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. **Journal of Neurobiology**, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 236–248, 2004. DOI: 10.1002/NEU.20025. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/neu.20025>. Acesso em: 22 jan. 2023.

COPPEN, A. The Biochemistry of Affective Disorders. **The British Journal of Psychiatry**, [S. l.], v. 113, n. 504, p. 1237–1264, 1967. DOI: 10.1192/bjp.113.504.1237. Disponível em: <http://bjp.rcpsych.org/cgi/doi/10.1192/bjp.113.504.1237>. Acesso em: 9 mar. 2018.

COSTA-FERREIRA, Willian; VIEIRA, Jonas O.; ALMEIDA, Jeferson; GOMES-DE-SOUZA, Lucas; CRESTANI, Carlos C. Involvement of Type 1 Angiotensin II Receptor (AT1) in Cardiovascular Changes Induced by Chronic Emotional Stress: Comparison between Homotypic and Heterotypic Stressors. **Frontiers in pharmacology**, [S. l.], v. 7, n. AUG, 2016. DOI: 10.3389/FPHAR.2016.00262. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27588004/>. Acesso em: 4 fev. 2023.

CRIPPA, J. A. S.; HALLAK, J. E. C.; MACHADO-DE-SOUSA, J. P.; QUEIROZ, R. H. C.; BERGAMASCHI, M.; CHAGAS, M. H. N.; ZUARDI, A. W. Cannabidiol for the treatment of cannabis withdrawal syndrome: a case report. **Journal of Clinical Pharmacy and**

Therapeutics, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 162–164, 2013. DOI: 10.1111/JCPT.12018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jcpt.12018>. Acesso em: 16 jan. 2023.

CRIPPA, José A.; GUIMARÃES, Francisco S.; CAMPOS, Alline C.; ZUARDI, Antonio W. **Translational investigation of the therapeutic potential of cannabidiol (CBD): Toward a new age**. *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30298064/>. Acesso em: 25 jan. 2021.

CRIPPA, José Alexandre S. et al. Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: A preliminary report. *Journal of Psychopharmacology*, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 121–130, 2011. DOI: 10.1177/0269881110379283/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0269881110379283-FIG2.JPEG. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0269881110379283?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed. Acesso em: 16 jan. 2023.

CRIPPA, José Alexandre S. et al. Efficacy and Safety of Cannabidiol Plus Standard Care vs Standard Care Alone for the Treatment of Emotional Exhaustion and Burnout Among Frontline Health Care Workers During the COVID-19 Pandemic: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Network Open*, [S. l.], v. 4, n. 8, p. e2120603–e2120603, 2021. DOI: 10.1001/JAMANETWORKOPEN.2021.20603. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2782994>. Acesso em: 29 mar. 2022.

CRISTINO, Luigia; BISOGNO, Tiziana; DI MARZO, Vincenzo. **Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders**. *Nature Reviews Neurology*, 2020. DOI: 10.1038/s41582-019-0284-z.

CZÉH, Boldizsár; MÜLLER-KEUKER, Jeanine I. H.; RYGULA, Rafal; ABUMARIA, Nashat; HIEMKE, Christoph; DOMENICI, Enrico; FUCHS, Eberhard. Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, [S. l.], v. 32, n. 7, p. 1490–503, 2007. DOI: 10.1038/sj.npp.1301275. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17164819>. Acesso em: 23 ago. 2019.

CZÉH, Boldizsár; WELT, Tobias; FISCHER, Anja K.; ERHARDT, Angelika; SCHMITT, Wolfram; MÜLLER, Marianne B.; TOSCHI, Nicola; FUCHS, Eberhard; KECK, Martin E. Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biological psychiatry*, [S. l.], v. 52, n. 11, p. 1057–65, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460689>. Acesso em: 9 mar. 2018.

DAYER, AG; CLEAVER, KM; ABOUANTOUN, T.; CAMERON, HA. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *The Journal of cell biology*, [S. l.], v. 168, n. 3, p. 415–427, 2005. DOI: 10.1083/JCB.200407053. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15684031/>. Acesso em: 23 out. 2021.

DE ANDRADE, J. S. et al. Chronic unpredictable mild stress alters an anxiety-related defensive response, Fos immunoreactivity and hippocampal adult neurogenesis. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 250, p. 81–90, 2013. DOI: 10.1016/J.BBR.2013.04.031. Acesso em: 25 jan. 2023.

DE OLIVEIRA, Herick Ulisses et al. Investigation of the Involvement of the Endocannabinoid System in TENS-Induced Antinociception. **Journal of Pain**, [S. l.], v. 21, n. 7–8, p. 820–835, 2020. DOI: 10.1016/j.jpain.2019.11.009. Disponível em: <http://www.jpain.org/article/S1526590019308685/fulltext>. Acesso em: 26 jan. 2021.

DEVANE, William A.; DYSARZ, Francis A.; JOHNSON, Ross M.; MELVIN, S.; HOWLETT, C. Determination Rat Brain and Characterization of a Cannabinoid Receptor in. **Molecular Pharmacology**, [S. l.], v. 34, n. 5, p. 605–613, 1988.

DI MARZO, Vincenzo. The endocannabinoidome as a substrate for noneuphoric phytocannabinoid action and gut microbiome dysfunction in neuropsychiatric disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, [S. l.], v. 22, n. 3, 2020. DOI: 10.31887/DCNS.2020.22.3/VDIMARZO.

DOS SANTOS, Rafael G.; GUIMARÃES, Francisco S.; CRIPPA, José Alexandre S.; HALLAK, Jaime E. C.; ROSSI, Giordano Novak; ROCHA, Juliana Mendes; ZUARDI, Antônio W. **Serious adverse effects of cannabidiol (CBD): a review of randomized controlled trials. Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology** Taylor and Francis Ltd, , 2020. DOI: 10.1080/17425255.2020.1754793. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32271618/>. Acesso em: 25 jan. 2021.

DU PREEZ, Andrea et al. The type of stress matters: repeated injection and permanent social isolation stress in male mice have a differential effect on anxiety- and depressive-like behaviours, and associated biological alterations. **Translational Psychiatry 2020 10:1**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–17, 2020. DOI: 10.1038/s41398-020-01000-3. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41398-020-01000-3>. Acesso em: 14 mar. 2023.

DUCOTTET, C.; BELZUNG, C. Correlations between behaviours in the elevated plus-maze and sensitivity to unpredictable subchronic mild stress: evidence from inbred strains of mice. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 156, n. 1, p. 153–162, 2005. DOI: 10.1016/J.BBR.2004.05.018. Acesso em: 13 mar. 2023.

DULAWA, Stephanie C.; HEN, Rene. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: The novelty-induced hypophagia test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 29, n. 4–5, p. 771–783, 2005. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.017.

DULAWA, Stephanie C.; HOLICK, Kerri A.; GUNDERSEN, Brigitta; HEN, Rene. Effects of Chronic Fluoxetine in Animal Models of Anxiety and Depression. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 1321–1330, 2004. DOI: 10.1038/sj.npp.1300433. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/1300433>. Acesso em: 10 mar. 2018.

ELMES, Matthew W. et al. Fatty acid-binding proteins (FABPs) are intracellular carriers for Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 290, n. 14, p. 8711–21, 2015. DOI: 10.1074/jbc.M114.618447. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25666611>. Acesso em: 5 mar. 2018.

ELSAYED, Maha; BANASR, Mounira; DURIC, Vanja; FOURNIER, Neil M.; LICZNEFSKI, Pawel; DUMAN, Ronald S. Antidepressant effects of fibroblast growth factor-2 in behavioral and cellular models of depression. **Biological psychiatry**, [S. l.], v. 72, n. 4, p. 258–265, 2012. DOI: 10.1016/J.BIOPSYCH.2012.03.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22513055/>. Acesso em: 28 jan. 2023.

ESCALANTE SAAVEDRA, Pamela Alejandra; GALATO, Dayani; DE SOUZA SILVA, Calliandra Maria; RODRIGUES DA SILVA, Izabel Cristina; DA SILVA, Emília Vitoria. Dispensing of psychotropic drugs in the Brazilian capital city before and during the COVID-19 pandemic (2018–2020). **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 13, p. 5378, 2022. DOI: 10.3389/FPHAR.2022.1028233/BIBTEX. Acesso em: 14 jan. 2023.

FELITTI, Vincent J.; ANDA, Robert F.; NORDENBERG, Dale; WILLIAMSON, David F.; SPITZ, Alison M.; EDWARDS, Valerie; KOSS, Mary P.; MARKS, James S. Relationship of childhood abuse and household dysfunction to many of the leading causes of death in adults: The adverse childhood experiences (ACE) study. **American Journal of Preventive Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 245–258, 1998. DOI: 10.1016/S0749-3797(98)00017-8. Disponível em: <http://www.ajpmonline.org/article/S0749379798000178/fulltext>. Acesso em: 9 jan. 2023.

FLORENSA-ZANUY, Eva; GARRO-MARTÍNEZ, Emilio; ADELL, Albert; CASTRO, Elena; DÍAZ, Álvaro; PAZOS, Ángel; MAC-DOWELL, Karina S.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, David; PILAR-CUÉLLAR, Fuencisla. Cannabidiol antidepressant-like effect in the lipopolysaccharide model in mice: Modulation of inflammatory pathways. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 185, p. 114433, 2021. DOI: 10.1016/J.BCP.2021.114433. Acesso em: 13 mar. 2023.

FOGAÇA, Manoela V.; CAMPOS, Alline C.; COELHO, Ludmila D.; DUMAN, Ronald S.; GUIMARÃES, Francisco S. The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: Role of neurogenesis and dendritic remodeling. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 135, p. 22–33, 2018. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.03.001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29510186>. Acesso em: 10 mar. 2018.

GÁLL, Zsolt; FARKAS, Szidónia; ALBERT, Ákos; FERENCZ, Elek; VANCEA, Szende; URKON, Melinda; KOLCSÁR, Melinda. Effects of Chronic Cannabidiol Treatment in the Rat Chronic Unpredictable Mild Stress Model of Depression. **Biomolecules** 2020, Vol. 10, Page 801, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 801, 2020. DOI: 10.3390/BIOM10050801. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/5/801/htm>. Acesso em: 17 jan. 2023.

GASPARYAN, Ani; NAVARRETE, Francisco; MANZANARES, Jorge. Cannabidiol and Sertraline Regulate Behavioral and Brain Gene Expression Alterations in an Animal Model of PTSD. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 12, p. 1493, 2021. DOI: 10.3389/FPHAR.2021.694510/BIBTEX. Acesso em: 14 mar. 2023.

GHAREGHANI, Majid; ZIBARA, Kazem; SADEGHI, Heibatollah; DOKOOHAKI, Shima; SADEGHI, Hossein; ARYANPOUR, Roya; GHANBARI, Amir. Fluvoxamine stimulates oligodendrogenesis of cultured neural stem cells and attenuates inflammation and demyelination in an animal model of multiple sclerosis. **Scientific Reports** 2017 7:1, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–17, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-04968-z. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-04968-z>. Acesso em: 28 jan. 2023.

GHOSAL, Sriparna et al. Ketamine rapidly reverses stress-induced impairments in GABAergic transmission in the prefrontal cortex in male rodents. **Neurobiology of Disease**, [S. l.], v. 134, 2020. DOI: 10.1016/J.NBD.2019.104669. Acesso em: 23 jan. 2023.

GLOVER, Dorie A.; ELENA, F. Garcia Aracena; MOHLMAN, Jan. Peripheral biomarker composite associated with smaller hippocampal volume. **NeuroReport**, [S. l.], v. 19, n. 13, p. 1313–1316, 2008. DOI: 10.1097/WNR.0B013E32830B364D. Disponível em: https://journals.lww.com/neuroreport/Fulltext/2008/08270/Peripheral_biomarker_composite_associated_with.13.aspx. Acesso em: 21 jan. 2023.

GLOWINSKI, Jacques; AXELROD, Julius. Inhibition of Uptake of Tritiated-noradrenaline in the Intact Rat Brain by Imipramine and Structurally Related Compounds. **Nature**, [S. l.], v. 204, n. 4965, p. 1318–1319, 1964. DOI: 10.1038/2041318a0. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/2041318a0>. Acesso em: 9 mar. 2018.

GOŁYSZNY, Miłosz et al. Chronic treatment with escitalopram and venlafaxine affects the neuropeptide S pathway differently in adult Wistar rats exposed to maternal separation. **AIMS Neuroscience** 2022 3:395, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 395–422, 2022. DOI: 10.3934/NEUROSCIENCE.2022022. Disponível em: <http://www.aimspress.com/article/doi/10.3934/Neuroscience.2022022>. Acesso em: 14 mar. 2023.

GOMES, Flávia Carvalho Alcantara; TORTELLI, Vanessa Pereira; DINIZ, Luan. Glia: Dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avancados**, [S. l.], v. 27, n. 77, p. 61–84, 2013. DOI: 10.1590/S0103-40142013000100006. Acesso em: 23 ago. 2019.

GONSIORREK, Waldemar; LUNN, Charles; FAN, Xuedong; NARULA, Satwant; LUNDELL, Daniel; HIPKIN, R. William. Endocannabinoid 2-Arachidonyl Glycerol Is a Full Agonist through Human Type 2 Cannabinoid Receptor: Antagonism by Anandamide. **Molecular Pharmacology**, [S. l.], v. 57, n. 5, 2000. . Acesso em: 14 mar. 2023.

GOULD, E.; MCEWEN, B. S.; TANAPAT, P.; GALEA, L. A.; FUCHS, E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **The Journal of neuroscience**, [S. l.], v. 17, n. 7, p. 2492–8, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9065509>. Acesso em: 9 mar. 2018.

GUIMARÃES, F. S.; CHIARETTI, T. M.; GRAEFF, F. G.; ZUARDI, A. W. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 100, n. 4, p. 558–9, 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1969666>. Acesso em: 10 mar. 2018.

GUO, Fuzheng; MAEDA, Yoshiko; MA, Joyce; XU, Jie; HORIUCHI, Makoto; MIERS, Laird; VACCARINO, Flora; PLEASURE, David. Pyramidal neurons are generated from oligodendroglial progenitor cells in adult piriform cortex. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 30, n. 36, p. 12036–12049, 2010. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1360-10.2010. Acesso em: 23 ago. 2019.

HARE, Stephanie M. et al. The Role of Hippocampal Functional Connectivity on Multisystem Subclinical Abnormalities in Schizophrenia. **Psychosomatic Medicine**, [S. l.], v. 82, n. 6, p. 623–630, 2020. DOI: 10.1097/PSY.0000000000000813. Disponível em: https://journals.lww.com/psychosomaticmedicine/Fulltext/2020/07000/The_Role_of_Hippocampal_Functional_Connectivity_on.11.aspx. Acesso em: 21 jan. 2023.

HAWKINS, JAMES; HICKS, ROBERT A.; PHILLIPS, NATHAN; MOORE, JOHN D. Swimming rats and human depression. **Nature** **1978** **274**:5670, [S. l.], v. 274, n. 5670, p. 512–512, 1978. DOI: 10.1038/274512a0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/274512a0>. Acesso em: 14 mar. 2023.

HENNINGSEN, Kim; PALMFELDT, Johan; CHRISTIANSEN, Sofie; BAIGES, Isabel; BAK, Steffen; JENSEN, Ole Nørregaard; GREGERSEN, Niels; WIBORG, Ove. Candidate Hippocampal Biomarkers of Susceptibility and Resilience to Stress in a Rat Model of Depression. **Molecular & Cellular Proteomics : MCP**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 1–12, 2012. DOI: 10.1074/MCP.M111.016428. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3394954/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22814444/). Acesso em: 14 mar. 2023.

HERTTING, G.; AXELROD, J. Fate of Tritiated Noradrenaline at the Sympathetic Nerve-Endings. **Nature**, [S. l.], v. 192, n. 4798, p. 172–173, 1961. DOI: 10.1038/192172a0. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/192172a0>. Acesso em: 9 mar. 2018.

HILL, Matthew N.; HILLARD, Cecilia J.; MCEWEN, Bruce S. Alterations in Corticolimbic Dendritic Morphology and Emotional Behavior in Cannabinoid CB1 Receptor–Deficient Mice Parallel the Effects of Chronic Stress. **Cerebral Cortex**, [S. l.], v. 21, n. 9, p. 2056–2064, 2011. DOI: 10.1093/CERCOR/BHQ280. Disponível em: <https://academic.oup.com/cercor/article/21/9/2056/378742>. Acesso em: 12 mar. 2023.

HILL, Matthew N.; MCLAUGHLIN, Ryan J.; BINGHAM, Brenda; SHRESTHA, Lalita; LEE, Tiffany T. Y.; GRAY, J. Megan; HILLARD, Cecilia J.; GORZALKA, Boris B.; VIAU, Victor. Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 107, n. 20, p. 9406–11, 2010. DOI: 10.1073/pnas.0914661107. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20439721>. Acesso em: 5 mar. 2018.

HILL, Matthew N.; MILLER, Gregory E.; CARRIER, Erica J.; GORZALKA, Boris B.; HILLARD, Cecilia J. Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. **Psychoneuroendocrinology**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 1257–1262, 2009. DOI: 10.1016/J.PSYNEUEN.2009.03.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306453009000961?via%3Dihub>. Acesso em: 12 fev. 2018.

HILLERER, Katharina M.; NEUMANN, Inga D.; COUILLARD-DESPRES, Sebastien; AIGNER, Ludwig; SLATTERY, David A. Sex-dependent regulation of hippocampal neurogenesis under basal and chronic stress conditions in rats. **Hippocampus**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 476–487, 2013. DOI: 10.1002/HIPO.22107. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hipo.22107>. Acesso em: 29 mar. 2023.

HILLHOUSE, Todd M.; PORTER, Joseph H. A brief history of the development of antidepressant drugs: From monoamines to glutamate. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 1, 2015. DOI: 10.1037/A0038550. Disponível em: [/fulltext/2015-04254-001.html](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25814444/). Acesso em: 10 jan. 2023.

HITOSHI, Seiji; MARUTA, Noriko; HIGASHI, Mikito; KUMAR, Akhilesh; KATO, Nobumasa; IKENAKA, Kazuhiro. Antidepressant drugs reverse the loss of adult neural stem cells following chronic stress. **Journal of Neuroscience Research**, [S. l.], v. 85, n. 16, p. 3574–3585, 2007.

DOI: 10.1002/JNR.21455. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jnr.21455>. Acesso em: 29 mar. 2023.

HOEFLER, Rogério; GALVÃO, Taís Freire; RIBEIRO-VAZ, Inês; SILVA, Marcus Tolentino. Trends in Brazilian market of antidepressants: A five-year dataset analysis. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 13, p. 3891, 2022. DOI: 10.3389/FPHAR.2022.893891/BIBTEX. Acesso em: 14 jan. 2023.

HOSSEINI, Adele; MCLACHLAN, Andrew J.; LICKLITER, Jason D. A phase I trial of the safety, tolerability and pharmacokinetics of cannabidiol administered as single-dose oil solution and single and multiple doses of a sublingual wafer in healthy volunteers. **British Journal of Clinical Pharmacology**, [S. l.], p. bcp.14617, 2020. DOI: 10.1111/bcp.14617. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bcp.14617>. Acesso em: 28 nov. 2020.

HOU, Ming; WANG, Suji; YU, Dandan; LU, Xinyi; ZHAO, Xiansen; CHEN, Zhangpeng; YAN, Chao. Cannabidiol prevents depressive-like behaviors through the modulation of neural stem cell differentiation. **Frontiers of Medicine**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 227–239, 2022. DOI: 10.1007/S11684-021-0896-8/METRICS. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11684-021-0896-8>. Acesso em: 17 jan. 2023.

JAYATISSA, Magdalena N.; BISGAARD, Christina F.; WEST, Mark J.; WIBORG, Ove. The number of granule cells in rat hippocampus is reduced after chronic mild stress and re-established after chronic escitalopram treatment. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 54, n. 3, p. 530–541, 2008. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2007.11.009.

JAYATISSA, Magdalena N.; BISGAARD, Christina; TINGSTRÖM, Anders; PAPP, Mariusz; WIBORG, Ove. Hippocampal cytogenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 31, n. 11, p. 2395–2404, 2006. DOI: 10.1038/sj.npp.1301041.

JIANG, Wen; ZHANG, Yun; XIAO, Lan; VAN CLEEMPUT, Jamie; JI, Shao Ping; BAI, Guang; ZHANG, Xia. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 115, n. 11, p. 3104–3116, 2005. DOI: 10.1172/JCI25509. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16224541/>. Acesso em: 28 jun. 2021.

JUNG, Seonghee et al. Autophagic death of neural stem cells mediates chronic stress-induced decline of adult hippocampal neurogenesis and cognitive deficits. **Autophagy**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 512–530, 2020. DOI: 10.1080/15548627.2019.1630222. Acesso em: 29 mar. 2023.

JURKOWSKI, Michal P.; BETTIO, Luis; K. WOO, Emma; PATTEN, Anna; YAU, Suk Yu; GIL-MOHAPEL, Joana. Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [S. l.], v. 14, p. 293, 2020. DOI: 10.3389/FNCEL.2020.576444/BIBTEX. Acesso em: 24 jan. 2023.

KEMPERMANN, Gerd; SONG, Hongjun; GAGE, Fred H. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. a018812, 2015. DOI: 10.1101/CSHPERSPECT.A018812. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26330519/>. Acesso em: 7 dez. 2022.

- KODAMA, Masafumi; FUJIOKA, Takashi; DUMAN, Ronald S. Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat. **Biological psychiatry**, [S. l.], v. 56, n. 8, p. 570–580, 2004. DOI: 10.1016/J.BIOPSYCH.2004.07.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15476686/>. Acesso em: 28 jan. 2023.
- KOKKOSIS, Alexandros G.; MADEIRA, Miguel M.; MULLAHY, Matthew R.; TSIRKA, Stella E. Chronic stress disrupts the homeostasis and progeny progression of oligodendroglial lineage cells, associating immune oligodendrocytes with prefrontal cortex hypomyelination. **Molecular Psychiatry** 2022 27:6, [S. l.], v. 27, n. 6, p. 2833–2848, 2022. DOI: 10.1038/s41380-022-01512-y. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41380-022-01512-y>. Acesso em: 26 jan. 2023.
- KONDEV, Veronika; BLUETT, Rebecca; NAJEED, Mustafa; ROSAS-VIDAL, Luis E.; GRUETER, Brad A.; PATEL, Sachin. Ventral hippocampal diacylglycerol lipase-alpha deletion decreases avoidance behaviors and alters excitation-inhibition balance. **Neurobiology of Stress**, [S. l.], v. 22, p. 100510, 2023. DOI: 10.1016/J.YNSTR.2022.100510. Acesso em: 14 mar. 2023.
- KUCERA, Ryan; BOUSKILA, Joseph; ELKRIEF, Laurent; FINK-JENSEN, Anders; PALMOUR, Roberta; BOUCHARD, Jean François; PTITO, Maurice. Expression and localization of CB1R, NAPE-PLD, and FAAH in the vervet monkey nucleus accumbens. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, 2018. DOI: 10.1038/S41598-018-26826-2. Disponível em: </pmc/articles/PMC5989267/>. Acesso em: 12 mar. 2023.
- KUHN, Roland. The treatment of depressive states with G22355 (Imipramine hydrochloride). **American Journal of Psychiatry**, [S. l.], v. 115, n. 5, p. 459–464, 1958. DOI: 10.1176/ajp.115.5.459. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13583250>. Acesso em: 9 mar. 2018.
- LACZKOVICS, Clarissa; KOTHGASSNER, Oswald D.; FELNHOFER, Anna; KLIER, Claudia M. Cannabidiol treatment in an adolescent with multiple substance abuse, social anxiety and depression. **Neuropsychiatrie**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 31–34, 2021. DOI: 10.1007/S40211-020-00334-0/TABLES/1. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40211-020-00334-0>. Acesso em: 17 jan. 2023.
- LANGGARTNER, Dominik; FÜCHSL, Andrea M.; KAISER, Lisa M.; MEIER, Tatjana; FOERTSCH, Sandra; BUSKE, Christian; REBER, Stefan O.; MULAW, Medhanie A. Biomarkers for classification and class prediction of stress in a murine model of chronic subordination stress. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. e0202471, 2018. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0202471. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0202471>. Acesso em: 14 mar. 2023.
- LEISHMAN, Emma; MANCHANDA, Meera; THELEN, Rachel; MILLER, Sally; MACKIE, Ken; BRADSHAW, Heather B. Cannabidiol's Upregulation of N-acyl Ethanolamines in the Central Nervous System Requires N-acyl Phosphatidyl Ethanolamine-Specific Phospholipase D. [S. l.], 2018. DOI: 10.1089/can.2018.0031. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/can.2018.0031>. Acesso em: 28 nov. 2020.

LEMTIRI-CHLIEH, Fouad; LEVINE, Eric S. 2-AG and anandamide enhance hippocampal long-term potentiation via suppression of inhibition. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [S. l.], v. 16, p. 498, 2022. DOI: 10.3389/FNCEL.2022.1023541/BIBTEX. Acesso em: 1 fev. 2023.

LEWEKE, Fm; PIOMELLI, D.; PAHLISCH, F.; MUHL, D.; GERTH, Cw; HOYER, C.; KLOSTERKÖTTER, J.; HELLMICH, M.; KOETHE, D. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. **Translational Psychiatry**, [S. l.], v. 2, 2012. DOI: 10.1038/tp.2012.15. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3316151/pdf/tp201215a.pdf>. Acesso em: 5 mar. 2018.

LI, Chen-Xin; ZHENG, Ying; ZHU, Hong; LI, Cheng-Wu; HE, Zhang; WANG, Cong; DING, Jian-Hua; HU, Gang; LU, Ming. β -arrestin 2 is essential for fluoxetine-mediated promotion of hippocampal neurogenesis in a mouse model of depression. [S. l.], [s.d.]. DOI: 10.1038/s41401-020-00576-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00576-2>. Acesso em: 29 mar. 2023.

LI, Nanxin; LEE, Boyoung; LIU, Rong-Jian; BANASR, Mounira; DWYER, Jason M.; IWATA, Masaaki; LI, Xiao-Yuan; AGHAJANIAN, George; DUMAN, Ronald S. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, [S. l.], v. 329, n. 5994, p. 959–64, 2010. DOI: 10.1126/science.1190287. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20724638>. Acesso em: 8 mar. 2018.

LI, Nanxin; LIU, Rong-Jian; DWYER, Jason M.; BANASR, Mounira; LEE, Boyoung; SON, Hyeon; LI, Xiao-Yuan; AGHAJANIAN, George; DUMAN, Ronald S. Glutamate N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonists Rapidly Reverse Behavioral and Synaptic Deficits Caused by Chronic Stress Exposure. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 69, n. 8, p. 754–761, 2011. DOI: 10.1016/j.biopsych.2010.12.015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322310013065>.

LIN, Shih Chun; BERGLES, Dwight E. Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 24–32, 2004. DOI: 10.1038/nn1162. Acesso em: 23 ago. 2019.

LIU, Wei Zhu et al. Identification of a prefrontal cortex-to-amygdala pathway for chronic stress-induced anxiety. **Nature Communications** 2020 11:1, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–15, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-15920-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-15920-7>. Acesso em: 24 jan. 2023.

LOOMER, H. P.; SAUNDERS, J. C.; KLINE, N. S. A clinical and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer. **Psychiatric research reports**, [S. l.], v. 8, p. 129–41, 1957. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13542681>. Acesso em: 9 mar. 2018.

MAGARIÑOS, Ana María; MCEWEN, Bruce S.; FLÜGGE, Gabriele; FUCHS, Eberhard. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 3534–3540, 1996. DOI: 10.1523/jneurosci.16-10-03534.1996. Acesso em: 22 jan. 2023.

MALBERG, Jessica E.; EISCH, Amelia J.; NESTLER, Eric J.; DUMAN, Ronald S. Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 20, n. 24, 2000. . Acesso em: 8 mar. 2018.

MALVESTIO, R. B. et al. Cannabidiol in the prelimbic cortex modulates the comorbid condition between the chronic neuropathic pain and depression-like behaviour in rats: The role of medial prefrontal cortex 5-HT1A and CB1 receptors. **Brain Research Bulletin**, [S. l.], v. 174, p. 323–338, 2021. DOI: 10.1016/J.BRAINRESBULL.2021.06.017. Acesso em: 13 mar. 2023.

MANTEROLA, Andrea et al. Deregulation of the endocannabinoid system and therapeutic potential of ABHD6 blockade in the cuprizone model of demyelination. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 157, p. 189–201, 2018. DOI: 10.1016/J.BCP.2018.07.042. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC6239900>. Acesso em: 9 mar. 2023.

MANZ, Kevin M.; GHOSE, Dipanwita; TURNER, Brandon D.; TAYLOR, Anne; BECKER, Jennifer; GRUETER, Carrie A.; GRUETER, Brad A. Calcium-Permeable AMPA Receptors Promote Endocannabinoid Signaling at Parvalbumin Interneuron Synapses in the Nucleus Accumbens Core. **Cell Reports**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 107971, 2020. DOI: 10.1016/J.CELREP.2020.107971. Acesso em: 12 mar. 2023.

MARINELLI, Silvia; PACIONI, Simone; BISOGNO, Tiziana; DI MARZO, Vincenzo; PRINCE, David A.; HUGUENARD, John R.; BACCI, Alberto. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is responsible for the slow self-inhibition in neocortical interneurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 28, n. 50, p. 13532–13541, 2008. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0847-08.2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19074027/>. Acesso em: 14 mar. 2023.

MARX, James O.; VUDATHALA, Daljit; MURPHY, Lisa; RANKIN, Shelley; HANKENSON, F. Claire. Antibiotic administration in the drinking water of mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 301–306, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24827573/>. Acesso em: 25 jan. 2021.

MATSUDA, Lisa A.; LOLAIT, Stephen J.; BROWNSTEIN, Michael J.; YOUNG, Alice C.; BONNER, Tom I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, [S. l.], v. 346, n. 6284, p. 561–564, 1990. DOI: 10.1038/346561a0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2165569/>. Acesso em: 30 jun. 2021.

MCEWEN, Bruce S. Allostasis and Allostatic Load: Implications for Neuropsychopharmacology. **Neuropsychopharmacology** 2000 22:2, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 108–124, 2000. DOI: 10.1016/s0893-133x(99)00129-3. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1395453>. Acesso em: 6 jan. 2023.

MCEWEN, Bruce S.; AKIL, Huda. Revisiting the Stress Concept: Implications for Affective Disorders. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 12–21, 2020. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0733-19.2019. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/40/1/12>. Acesso em: 5 jan. 2023.

MCEWEN, Bruce S.; GIANAROS, Peter J. Stress- and Allostasis-Induced Brain Plasticity. **Annual review of medicine**, [S. l.], v. 62, p. 431, 2011. DOI: 10.1146/ANNUREV-MED-052209-100430. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC4251716/>. Acesso em: 19 jan. 2023.

MCEWEN, Bruce S.; STELLAR, Eliot. Stress and the Individual: Mechanisms Leading to Disease. **Archives of Internal Medicine**, [S. l.], v. 153, n. 18, p. 2093–2101, 1993. DOI: 10.1001/ARCHINTE.1993.00410180039004. Disponível em:

<https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/617820>. Acesso em: 5 jan. 2023.

MCEWEN, Bruce S.; WINGFIELD, John C. What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. **Hormones and Behavior**, [S. l.], v. 57, n. 2, p. 105–111, 2010. DOI: 10.1016/J.YHBEH.2009.09.011. Acesso em: 9 jan. 2023.

MCLAUGHLIN, Ryan J.; HILL, Matthew N.; BAMBICO, Francis R.; STUHR, Kara L.; GOBBI, Gabriella; HILLARD, Cecilia J.; GORZALKA, Boris B. Prefrontal cortical anandamide signaling coordinates coping responses to stress through a serotonergic pathway. **European Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 22, n. 9, p. 664–671, 2012. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2012.01.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924977X12000211>.

MECHA, M.; TORRAO, A. S.; MESTRE, L.; CARRILLO-SALINAS, F. J.; MECHOULAM, R.; GUAZA, C. Cannabidiol protects oligodendrocyte progenitor cells from inflammation-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. **Cell Death and Disease**, [S. l.], v. 3, n. 6, 2012. DOI: 10.1038/cddis.2012.71. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22739983/>. Acesso em: 11 out. 2020.

MOLENDIJK, Marc L.; DE KLOET, E. Ronald. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. **Psychoneuroendocrinology**, [S. l.], v. 62, p. 389–391, 2015. DOI: 10.1016/J.PSYNEUEN.2015.08.028. Acesso em: 14 mar. 2023.

MOLINA-HOLGADO, Eduardo; VELA, José M.; ARÉVALO-MARTÍN, Angel; ALMAZÁN, Guillermina; MOLINA-HOLGADO, Francisco; BORRELL, José; GUAZA, Carmen. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: Involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 22, n. 22, p. 9742–9753, 2002. DOI: 10.1523/jneurosci.22-22-09742.2002. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/22/22/9742>. Acesso em: 11 out. 2020.

MOLTKE, Julie; HINDOCHA, Chandni. Reasons for cannabidiol use: a cross-sectional study of CBD users, focusing on self-perceived stress, anxiety, and sleep problems. **Journal of Cannabis Research**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–12, 2021. DOI: 10.1186/S42238-021-00061-5/FIGURES/3. Disponível em: <https://j cannabisresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s42238-021-00061-5>. Acesso em: 17 jan. 2023.

MOREIRA, Fabrício A.; AGUIAR, Daniele C.; GUIMARÃES, Francisco S. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 30, n. 8, p. 1466–1471, 2006. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2006.06.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16876926/>. Acesso em: 9 out. 2020.

MULINARI, Shai. Divergence and convergence of commercial and scientific priorities in drug development: The case of Zelmid, the first SSRI antidepressant. **Social Science & Medicine**, [S. l.], v. 138, p. 217–224, 2015. DOI: 10.1016/J.SOCSCIMED.2015.06.020. Acesso em: 10 jan. 2023.

MUNRO, Sean; THOMAS, Kerrie L.; ABU-SHAAR, Muna. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, [S. l.], v. 365, n. 6441, p. 61–65, 1993. DOI: 145

10.1038/365061a0. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/365061a0>. Acesso em: 10 mar. 2018.

NAVARRIA, Andrea et al. The dual blocker of FAAH/TRPV1 N-arachidonoylserotonin reverses the behavioral despair induced by stress in rats and modulates the HPA-axis. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 87, p. 151–159, 2014. DOI: 10.1016/j.phrs.2014.04.014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104366181400067X>.

NIETO-GONZALEZ, Jose Luis; HOLM, Mai Marie; VARDYA, Irina; CHRISTENSEN, Trine; WIBORG, Ove; JENSEN, Kimmo. Presynaptic Plasticity as a Hallmark of Rat Stress Susceptibility and Antidepressant Response. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. e0119993, 2015. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0119993. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119993>. Acesso em: 23 jan. 2023.

OHN, J.; YNCH, W. L.; APLAN, Eorge A. K.; ARAH, S.; HEMA, J. S. Cumulative Impact of Sustained Economic Hardship on Physical, Cognitive, Psychological, and Social Functioning. <https://doi.org/10.1056/NEJM199712253372606>, [S. l.], v. 337, n. 26, p. 1889–1895, 1997. DOI: 10.1056/NEJM199712253372606. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199712253372606>. Acesso em: 9 jan. 2023.

OHTA, Ken ichi; SUZUKI, Shingo; WARITA, Katsuhiko; SUMITANI, Kazunori; TENKUMO, Chiaki; OZAWA, Toru; UJIHARA, Hidetoshi; KUSAKA, Takashi; MIKI, Takanori. The effects of early life stress on the excitatory/inhibitory balance of the medial prefrontal cortex. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 379, p. 112306, 2020. DOI: 10.1016/J.BBR.2019.112306. Acesso em: 24 jan. 2023.

PACE, Sebastian A. et al. Infralimbic cortical glutamate output is necessary for the neural and behavioral consequences of chronic stress. **Neurobiology of Stress**, [S. l.], v. 13, p. 100274, 2020. DOI: 10.1016/J.YNSTR.2020.100274. Acesso em: 24 jan. 2023.

PALAZUELOS, Javier; ORTEGA, Zaira; DÍAZ-ALONSO, Javier; GUZMÁN, Manuel; GALVE-ROPERH, Ismael. CB2 Cannabinoid Receptors Promote Neural Progenitor Cell Proliferation via mTORC1 Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 287, n. 2, p. 1198–1209, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M111.291294. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820533565>.

PAPP, Mariusz; WILLNER, Paul; MUSCAT, Richard. **An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress** *Psychopharmacology*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF02244188.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2018.

PARUL; MISHRA, Akanksha; SINGH, Sonu; SINGH, Seema; TIWARI, Virendra; CHATURVEDI, Swati; WAHAJUDDIN, Muhammad; PALIT, Gautam; SHUKLA, Shubha. Chronic unpredictable stress negatively regulates hippocampal neurogenesis and promote anxious depression-like behavior via upregulating apoptosis and inflammatory signals in adult rats. **Brain Research Bulletin**, [S. l.], v. 172, p. 164–179, 2021. DOI: 10.1016/J.BRAINRESBULL.2021.04.017. Acesso em: 25 jan. 2023.

PETRIE, Gavin N.; BALSEVICH, Georgia; FÜZESI, Tamás; AUKEMA, Robert J.; DRIEVER, Wouter P. F.; VAN DER STELT, Mario; BAINS, Jaideep S.; HILL, Matthew N.; HILL, Matthew.

Disruption of Tonic Endocannabinoid Signaling Triggers the Generation of a Stress Response. **bioRxiv**, [S. l.], p. 2022.09.27.509585, 2022. DOI: 10.1101/2022.09.27.509585. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.09.27.509585v1>. Acesso em: 31 jan. 2023.

PHAM, Kara; NACHER, Juan; HOF, Patrick R.; MCEWEN, Bruce S. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 879–886, 2003. DOI: 10.1046/J.1460-9568.2003.02513.X. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1460-9568.2003.02513.x>. Acesso em: 25 jan. 2023.

PICKEL, V. M.; SHOBIN, E. T.; LANE, D. A.; MACKIE, K. Cannabinoid-1 receptors in the mouse ventral pallidum are targeted to axonal profiles expressing functionally opposed opioid peptides and contacting N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D terminals. **Neuroscience**, [S. l.], v. 227, p. 10–21, 2012. DOI: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2012.07.050. Acesso em: 12 mar. 2023.

POGGI, Giulia; ALBIEZ, Jamie; PRYCE, Christopher R. Effects of chronic social stress on oligodendrocyte proliferation-maturation and myelin status in prefrontal cortex and amygdala in adult mice. **Neurobiology of Stress**, [S. l.], v. 18, p. 100451, 2022. DOI: 10.1016/J.YNSTR.2022.100451. Acesso em: 26 jan. 2023.

PRADO, Maria Aparecida Medeiros Barros Do; FRANCISCO, Priscila Maria S. Bergamo; BARROS, Marilisa Berti de Azevedo. Uso de medicamentos psicotrópicos em adultos e idosos residentes em Campinas, São Paulo: um estudo transversal de base populacional. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 747–758, 2017. DOI: 10.5123/S1679-49742017000400007. Disponível em: www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/plano. Acesso em: 13 jan. 2023.

RADLEY, J. J.; SISTI, H. M.; HAO, J.; ROCHER, A. B.; MCCALL, T.; HOF, P. R.; MCEWEN, B. S.; MORRISON, J. H. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. **Neuroscience**, [S. l.], v. 125, n. 1, p. 1–6, 2004. DOI: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2004.01.006. Acesso em: 22 jan. 2023.

RIBEIRO, Melissa A.; AGUIAR, Rafael P.; SCARANTE, Franciele F.; FUSSE, Eduardo J.; DE OLIVEIRA, Rubia M. W.; GUIMARAES, Francisco S.; CAMPOS, Alline C. Spontaneous Activity of CB2 Receptors Attenuates Stress-Induced Behavioral and Neuroplastic Deficits in Male Mice. **Frontiers in pharmacology**, [S. l.], v. 12, 2022. DOI: 10.3389/FPHAR.2021.805758. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35126139/>. Acesso em: 14 mar. 2023.

RIVERA, Patricia; ARRABAL, Sergio; VARGAS, Antonio; BLANCO, Eduardo; SERRANO, Antonia; PAVÓN, Francisco J.; DE FONSECA, Fernando Rodríguez; SUÁREZ, Juan. Localization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) and N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) in cells expressing the Ca²⁺-binding proteins calbindin, calretinin, and parvalbumin in the adult rat hippocampus. **Frontiers in Neuroanatomy**, [S. l.], v. 8, n. MAR, 2014. DOI: 10.3389/fnana.2014.00012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24672435/>. Acesso em: 25 jan. 2021.

RIVERA, Patricia; TOVAR, Rubén; RAMÍREZ-LÓPEZ, María Teresa; NAVARRO, Juan Antonio; VARGAS, Antonio; SUÁREZ, Juan; DE FONSECA, Fernando Rodríguez. Sex-Specific Anxiety

and Prefrontal Cortex Glutamatergic Dysregulation Are Long-Term Consequences of Pre-and Postnatal Exposure to Hypercaloric Diet in a Rat Model. **Nutrients** **2020**, Vol. **12**, Page **1829**, [S. I.], v. 12, n. 6, p. 1829, 2020. DOI: 10.3390/NU12061829. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/6/1829/htm>. Acesso em: 12 mar. 2023.

ROCK, Erin M.; SULLIVAN, Megan T.; COLLINS, Stephen A.; GOODMAN, Hannah; LIMEBEER, Cheryl L.; MECHOULAM, Raphael; PARKER, Linda A. Evaluation of repeated or acute treatment with cannabidiol (CBD), cannabidiolic acid (CBDA) or CBDA methyl ester (HU-580) on nausea and/or vomiting in rats and shrews. **Psychopharmacology**, [S. I.], v. 237, n. 9, p. 2621–2631, 2020. DOI: 10.1007/s00213-020-05559-z. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32488349/>. Acesso em: 28 nov. 2020.

SAKRY, Dominik; YIGIT, Hatice; DIMOU, Leda; TROTTER, Jacqueline. Oligodendrocyte Precursor Cells Synthesize Neuromodulatory Factors. **PLOS ONE**, [S. I.], v. 10, n. 5, p. e0127222, 2015. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0127222. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0127222>. Acesso em: 26 jan. 2023.

SALES, Amanda J.; CRESTANI, Carlos C.; GUIMARÃES, Francisco S.; JOCA, Sâmia R. L. Antidepressant-like effect induced by Cannabidiol is dependent on brain serotonin levels. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, [S. I.], v. 86, p. 255–261, 2018. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2018.06.002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29885468>. Acesso em: 22 ago. 2019.

SALES, Amanda J.; FOGAÇA, Manoela V; SARTIM, Ariandra G.; PEREIRA, Vitor S.; WEGENER, Gregers; GUIMARÃES, Francisco S.; JOCA, Sâmia R. L. Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex. **Molecular Neurobiology**, [S. I.], v. 56, n. 2, p. 1070–1081, 2019. DOI: 10.1007/s12035-018-1143-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-018-1143-4>.

SÁNCHEZ-DE LA TORRE, Aníbal et al. Cannabinoid CB1 receptor gene inactivation in oligodendrocyte precursors disrupts oligodendrogenesis and myelination in mice. **Cell Death & Disease** **2022** **13:7**, [S. I.], v. 13, n. 7, p. 1–13, 2022. DOI: 10.1038/s41419-022-05032-z. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-022-05032-z>. Acesso em: 14 mar. 2023.

SANTARELLI, Luca et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, [S. I.], v. 301, n. 5634, p. 805–9, 2003. DOI: 10.1126/science.1083328. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12907793>. Acesso em: 8 mar. 2018.

SANTOMAURO, Damian F. et al. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, [S. I.], v. 398, n. 10312, p. 1700–1712, 2021. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02143-7. Acesso em: 3 jan. 2023.

SCARANTE, Franciele F. et al. Cannabidiol as an add-on therapy to overcome the slow-onset and, possibly, resistance to antidepressant treatment: involvement of NAPE-PLD in the medial prefrontal cortex. **bioRxiv**, [S. I.], p. 2021.04.23.441143, 2021. DOI:

10.1101/2021.04.23.441143. Disponível em:

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.04.23.441143v1>. Acesso em: 2 ago. 2021.

SCHIAVON, Angélica Pupin; BONATO, Jéssica Mendes; MILANI, Humberto; GUIMARÃES, Francisco Silveira; WEFFORT DE OLIVEIRA, Rúbia Maria. Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 64, p. 27–34, 2016. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2015.06.017. Acesso em: 24 set. 2020.

SCHUELE, Lena-Louise et al. Diacylglycerol lipase alpha in astrocytes is involved in maternal care and affective behaviors. **Glia**, [S. l.], p. glia.23903, 2020. DOI: 10.1002/glia.23903. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/glia.23903>. Acesso em: 28 nov. 2020.

SELYE, H. Stress and psychiatry. **The American journal of psychiatry**, [S. l.], v. 113, n. 5, p. 423–427, 1956. DOI: 10.1176/ajp.113.5.423.

SHEPARD, Ryan; COUTELLIER, Laurence. Changes in the Prefrontal Glutamatergic and Parvalbumin Systems of Mice Exposed to Unpredictable Chronic Stress. **Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 55, n. 3, p. 2591–2602, 2018. DOI: 10.1007/S12035-017-0528-0/FIGURES/5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-017-0528-0>. Acesso em: 6 dez. 2022.

SILOTE, Gabriela P.; GATTO, Michelle C.; ESKEKUND, Amanda; GUIMARÃES, Francisco S.; WEGENER, Gregers; JOCA, Sâmia R. L. Strain-, Sex-, and Time-Dependent Antidepressant-like Effects of Cannabidiol. **Pharmaceuticals 2021, Vol. 14, Page 1269**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 1269, 2021. DOI: 10.3390/PH14121269. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/12/1269/htm>. Acesso em: 6 dez. 2022.

SMAGA, Irena; BYSTROWSKA, Beata; GAWLIŃSKI, Dawid; POMIERNY, Bartosz; STANKOWICZ, Piotr; FILIP, Małgorzata. Antidepressants and Changes in Concentration of Endocannabinoids and N-Acylethanolamines in Rat Brain Structures. **Neurotoxicity Research**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 190–206, 2014. DOI: 10.1007/s12640-014-9465-0. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12640-014-9465-0>. Acesso em: 12 fev. 2018.

SMAGA, Irena; GAWLIŃSKI, D.; BRODOWICZ, J.; FILIP, M. Brain region-dependent changes in the expression of endocannabinoid-metabolizing enzymes in rats following antidepressant drugs. **Journal of Physiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 70, n. 5, p. 1–9, 2019. DOI: 10.26402/jpp.2019.5.06. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31889042/>. Acesso em: 25 jan. 2021.

SMAGA, Irena; ZANIEWSKA, Magdalena; GAWLIŃSKI, Dawid; FARON-GÓRECKA, Agata; SZAFRAŃSKI, Przemysław; CEGŁA, Marek; FILIP, Małgorzata. Changes in the cannabinoid receptors in rats following treatment with antidepressants. **NeuroToxicology**, [S. l.], v. 63, p. 13–20, 2017. DOI: 10.1016/J.NEURO.2017.08.012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161813X17301717?via%3Dihub>. Acesso em: 12 fev. 2018.

SOARES, Bernardo et al. Prevalence and Impact of Treatment-Resistant Depression in Latin America: a Prospective, Observational Study. **Psychiatric Quarterly**, [S. l.], v. 92, n. 4, p. 1797–149

1815, 2021. DOI: 10.1007/S11126-021-09930-X/TABLES/6. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11126-021-09930-x>. Acesso em: 4 fev. 2023.

SOLICH, Joanna; KUŚMIDER, Maciej; FARON-GÓRECKA, Agata; PABIAN, Paulina; KOLASA, Magdalena; ZEMŁA, Beata; DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, Marta. Serum Level of miR-1 and miR-155 as Potential Biomarkers of Stress-Resilience of NET-KO and SWR/J Mice. **Cells** **2020**, **Vol. 9**, **Page 917**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 917, 2020. DOI: 10.3390/CELLS9040917. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/4/917/htm>. Acesso em: 14 mar. 2023.

SOLOWIJ, Nadia et al. Therapeutic Effects of Prolonged Cannabidiol Treatment on Psychological Symptoms and Cognitive Function in Regular Cannabis Users: A Pragmatic Open-Label Clinical Trial. **Cannabis and Cannabinoid Research**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 21, 2018. DOI: 10.1089/CAN.2017.0043. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5870061/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35870061/). Acesso em: 16 jan. 2023.

SOMPOL, Pradoldej; LIU, Xia; BABA, Kenkichi; PAUL, Ketema N.; TOSINI, Gianluca; IUVONE, P. Michael; YE, Keqiang. N-acetylserotonin promotes hippocampal neuroprogenitor cell proliferation in sleep-deprived mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 108, n. 21, p. 8844–8849, 2011. DOI: 10.1073/PNAS.1105114108/SUPPL_FILE/PNAS.201105114SI.PDF. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1105114108>. Acesso em: 14 mar. 2023.

SOUZA, José Diogo S. et al. Maintained anxiolytic effects of cannabidiol after treatment discontinuation in healthcare workers during the COVID-19 pandemic. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 13, p. 3554, 2022. DOI: 10.3389/FPHAR.2022.856846/BIBTEX. Acesso em: 17 jan. 2023.

SPIGA, Saturnino; ACQUAS, Elio; PUDDU, Maria C.; MULAS, Giovanna; LINTAS, Alessandra; DIANA, Marco. Simultaneous Golgi-Cox and immunofluorescence using confocal microscopy. **Brain Structure and Function**, [S. l.], v. 216, n. 3, p. 171–182, 2011. DOI: 10.1007/s00429-011-0312-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21461741/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

SPOHRS, Jennifer; PROST, Michael; ULRICH, Martin; PLENER, Paul L.; BINDILA, Laura; ABLER, Birgit. Endocannabinoid system reactivity during stress processing in healthy humans. **Biological Psychology**, [S. l.], v. 169, 2022. DOI: 10.1016/j.biopsycho.2022.108281.

STASSEN, H. H.; ANGST, J.; DELINI-STULA, A. Delayed onset of action of antidepressant drugs? Survey of recent results. **European Psychiatry**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 166–176, 1997. DOI: 10.1016/S0924-9338(97)89100-6. Acesso em: 14 jan. 2023.

STERLING, Peter. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. **Handbook of life stress cognition and health**, [S. l.], 1988. Disponível em: https://www.academia.edu/21182641/Allostasis_a_new_paradigm_to_explain_arousal_pathology. Acesso em: 5 jan. 2023.

SUGIURA, Takayuki et al. Evidence That the Cannabinoid CB1 Receptor Is a 2-Arachidonoylglycerol Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 274, n. 5, p. 2794–2801, 1999. DOI: 10.1074/jbc.274.5.2794. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925819880560/fulltext>. Acesso em: 11 mar. 2023.

SUGIURA, Takayuki; KONDO, Sachiko; KISHIMOTO, Seishi; MIYASHITA, Tomoyuki; NAKANE, Shinji; KODAKA, Tomoko; SUHARA, Yoshitomo; TAKAYAMA, Hiroaki; WAKU, Keizo. Evidence That 2-Arachidonoylglycerol but Not N-Palmitoylethanolamine or Anandamide Is the Physiological Ligand for the Cannabinoid CB2 Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 275, n. 1, p. 605–612, 2000. DOI: 10.1074/jbc.275.1.605. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925819529040/fulltext>. Acesso em: 14 mar. 2023.

SUGIURA, Takayuki; KONDO, Sachiko; SUKAGAWA, Akihiro; NAKANE, Shinji; SHINODA, Akira; ITOH, Kiyoko; YAMASHITA, Atsushi; WAKU, Keizo. 2-Arachidonoylglycerol: A Possible Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand in Brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 215, n. 1, p. 89–97, 1995. DOI: 10.1006/BBRC.1995.2437. Acesso em: 11 mar. 2023.

SUN, Jing; FANG, Yinquan; CHEN, Tao; GUO, Jingjing; YAN, Jun; SONG, Shu; ZHANG, Luyong; LIAO, Hong. WIN55, 212-2 promotes differentiation of oligodendrocyte precursor cells and improve remyelination through regulation of the phosphorylation level of the ERK 1/2 via cannabinoid receptor 1 after stroke-induced demyelination. **Brain Research**, [S. l.], v. 1491, p. 225–235, 2013. DOI: 10.1016/J.BRAINRES.2012.11.006. Acesso em: 14 mar. 2023.

SURGET, A. et al. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. **Molecular Psychiatry** 2011 16:12, [S. l.], v. 16, n. 12, p. 1177–1188, 2011. DOI: 10.1038/mp.2011.48. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/mp201148>. Acesso em: 14 mar. 2023.

TORRES-BERRÍO, Angélica; NOUEL, Dominique; CUESTA, Santiago; PARISE, Eric M.; RESTREPO-LOZANO, José María; LAROCHELLE, Pier; NESTLER, Eric J.; FLORES, Cecilia. MiR-218: a molecular switch and potential biomarker of susceptibility to stress. **Molecular Psychiatry** 2019 25:5, [S. l.], v. 25, n. 5, p. 951–964, 2019. DOI: 10.1038/s41380-019-0421-5. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41380-019-0421-5>. Acesso em: 14 mar. 2023.

TSUBOI, Kazuhito; UYAMA, Toru; OKAMOTO, Yasuo; UEDA, Natsuo. **Endocannabinoids and related N-acylethanolamines: Biological activities and metabolism Makoto Murakami. Inflammation and Regeneration**BioMed Central Ltd., , 2018. DOI: 10.1186/s41232-018-0086-5. Disponível em: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s41232-018-0086-5>. Acesso em: 26 jan. 2021.

TURCOTTE-CARDIN, Valérie et al. Loss of Adult 5-HT1A Autoreceptors Results in a Paradoxical Anxiogenic Response to Antidepressant Treatment. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 39, n. 8, p. 1334–1346, 2019. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0352-18.2018. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/39/8/1334>. Acesso em: 14 mar. 2023.

VAN DER ZEE, Yentl Y. et al. Blood miR-144-3p: a novel diagnostic and therapeutic tool for depression. **Molecular Psychiatry** 2022 27:11, [S. l.], v. 27, n. 11, p. 4536–4549, 2022. DOI: 10.1038/s41380-022-01712-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41380-022-01712-6>. Acesso em: 14 mar. 2023.

VOSS, Patrice; THOMAS, Maryse E.; CISNEROS-FRANCO, J. Miguel; DE VILLERS-SIDANI, Étienne. Dynamic brains and the changing rules of neuroplasticity: Implications for learning and recovery. **Frontiers in Psychology**, [S. l.], v. 8, n. OCT, p. 1657, 2017. DOI: 10.3389/FPSYG.2017.01657/BIBTEX. Acesso em: 21 jan. 2023.

VYAS, Ajai; MITRA, Rupshi; SHANKARANARAYANA RAO, B. S.; CHATTARJI, Sumantra. Chronic Stress Induces Contrasting Patterns of Dendritic Remodeling in Hippocampal and Amygdaloid Neurons. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 22, n. 15, p. 6810–6818, 2002. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-15-06810.2002. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/22/15/6810>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WARDEN, Diane et al. Early Adverse Events and Attrition in SSRI Treatment: A Suicide Assessment Methodology Study (SAMS) Report. **Journal of clinical psychopharmacology**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 259, 2010. DOI: 10.1097/JCP.0B013E3181DBFD04. Disponível em: </pmc/articles/PMC3119579/>. Acesso em: 4 fev. 2023.

WATANABE, Kazuhito; KAYANO, Yuichiro; MATSUNAGA, Tamihide; YAMAMOTO, Lkuo; YOSHIMURA, Hidetoshi. Inhibition of anandamide amidase activity in mouse brain microsomes by cannabinoids. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], v. 19, n. 8, p. 1109–1111, 1996. DOI: 10.1248/bpb.19.1109. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8874830/>. Acesso em: 10 out. 2020.

WILLNER, Paul; MUSCAT, Richard; PAPP, Mariusz. Chronic mild stress-induced anhedonia: A realistic animal model of depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 525–534, 1992. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80194-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80194-0). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763405801940>.

WOLF, Susanne A. et al. Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis. **Cell Communication and Signaling : CCS**, [S. l.], v. 8, p. 12, 2010. DOI: 10.1186/1478-811X-8-12. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2898685/>.

YASMIN, Farhana et al. Stress-induced modulation of endocannabinoid signaling leads to delayed strengthening of synaptic connectivity in the amygdala. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 117, n. 1, 2020. DOI: 10.1073/pnas.1910322116.

YOON, Sang Ho; CHUNG, Geehoon; SONG, Woo Seok; OH, Sung Pyo; KIM, Sang Jeong; KIM, Myoung-Hwan. Shifting hippocampal excitation/inhibition balance modifies despair-like behavior in mice. **bioRxiv**, [S. l.], p. 2020.02.18.953786, 2020. DOI: 10.1101/2020.02.18.953786. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.18.953786v2>. Acesso em: 24 jan. 2023.

ZANELATI, T. V.; BIOJONE, C.; MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S.; JOCA, S. R. L. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: Possible involvement of 5-HT 1A receptors. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 159, n. 1, p. 122–128, 2010. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00521.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20002102/>. Acesso em: 9 out. 2020.

ZELLER, E. A.; BARSKY, J. In vivo Inhibition of Liver and Brain Monoamine Oxidase by 1-Isonicotinyl-2-Isopropyl Hydrazine. **Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 81, n. 2, p. 459–461, 1952. DOI: 10.3181/00379727-81-19910. Disponível em: <http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-81-19910>. Acesso em: 9 mar. 2018.

ZHAI, Qing et al. Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol Levels in the Anterior Cingulate Cortex, Caudate Putamen, Nucleus Accumbens, and Piriform Cortex Were Upregulated by

Chronic Restraint Stress. **Cells**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 393, 2023. DOI: 10.3390/CELLS12030393/S1. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/12/3/393/htm>. Acesso em: 14 mar. 2023.

ZHANG, Hua; HILTON, David A.; HANEMANN, C. Oliver; ZAJICEK, John. Cannabinoid Receptor and N-acyl Phosphatidylethanolamine Phospholipase D-Evidence for Altered Expression in Multiple Sclerosis. **Brain Pathology**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. no-no, 2011. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2011.00477.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3639.2011.00477.x>. Acesso em: 27 set. 2020.

ZHOU, Yanfang et al. Allostatic Load Effects on Cortical and Cognitive Deficits in Essentially Normotensive, Normoweight Patients with Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, [S. l.], v. 47, n. 4, p. 1048–1057, 2021. DOI: 10.1093/SCHBUL/SBAA196. Disponível em: <https://academic.oup.com/schizophreniabulletin/article/47/4/1048/6120669>. Acesso em: 21 jan. 2023.

ZIMMERMANN, Tina et al. Neural stem cell lineage-specific cannabinoid type-1 receptor regulates neurogenesis and plasticity in the adult mouse hippocampus. **Cerebral Cortex**, [S. l.], v. 28, n. 12, p. 4454–4471, 2018. DOI: 10.1093/CERCOR/BHY258. Disponível em: <https://academic.oup.com/cercor/article/28/12/4454/5126794>. Acesso em: 29 mar. 2023.

ZUARDI, A. W.; COSME, R. A.; GRAEFF, F. G.; GUIMARAES, F. S. Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. **Journal of Psychopharmacology**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 82–88, 1993. DOI: 10.1177/026988119300700112. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22290374/>. Acesso em: 9 out. 2020.

ZUARDI, A. W.; SHIRAKAWA, I.; FINKELFARB, E.; KARNIOL, I. G. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 76, n. 3, p. 245–50, 1982. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6285406>. Acesso em: 10 mar. 2018.

ANEXO 1

Estágio realizado no *Centre for Developmental Neurobiology* da *King's College London*, sob orientação do Prof. Benedikt Berninger.

Os resultados apresentados a seguir foram obtidos durante um estágio realizado entre Março e Setembro de 2022 no *Centre for Developmental Neurobiology*, da *King's College London*, sob supervisão do Prof. Benedikt Berninger. O grupo de pesquisa do Prof. Berninger tem interesse em implementar, caracterizar e aprimorar estratégias que visam a reprogramação de células da glia em neurônios *in vivo* no córtex de camundongos através da indução da expressão de fatores de transcrição que são relacionados durante o neurodesenvolvimento a diferenciação de células precursoras em neurônios. O fator de transcrição de particular interesse para esse estudo é o homólogo 1 do *Achaete-scute* (*Ascl1*).

Durante o desenvolvimento do encéfalo, *Ascl1* é um fator de transcrição envolvido na ativação de vias pró-neurais que orquestram a geração de interneurônios corticais e estriatais (Kim et al., 2007; Marín et al., 2000; Parras et al., 2002). O papel de *Ascl1* no neurodesenvolvimento, entretanto, é complexo e vai além do seu efeito pró-neurogênico. Existem evidências que *Ascl1* também está envolvido na regulação da proliferação e diferenciação de células de linhagem oligodendrocítica, assim como na regulação da proliferação de células precursora neurais na zona subventricular. Mas como são reguladas essas diferentes funções de *Ascl1*?

Li e colegas (2014) demonstraram que a ativação da via da ERK e consequente fosforilação de *Ascl1* regula as propriedades funcionais desse fator de transcrição. Em sua forma fosforilada, *Ascl1* ativa vias de sinalização que leva a um efeito pró-proliferativo e pó-gliogênico. De forma a caracterizar o papel do estado de fosforilação para a função do fator de transcrição,

Li e colegas geraram um Ascl1 modificado nos quais todos os 6 sítios de fosforilação serina-prolina da molécula são modificados para alanina-prolina, gerando Ascl1SA6 . De modo interessante, eles demonstraram que esse Ascl1 fosfomutante promove um estímulo pró-neurogênico (Li et al., 2014).

Dados prévios obtidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Berninger demonstraram que, *in vitro*, aproximadamente 27% dos astrócitos corticais nos quais a expressão de Ascl1 foi induzida através de um vetor retroviral adquiriram características morfológicas de neurônio e passaram a expressar o marcador neuronal β -tubulina III. Por outro lado, a porcentagem de astrócitos corticais que adquiriram um fenotipo do tipo-neuronal foi quase dobrada (51%) em células que foram transduzidas com Ascl1SA6, indicando que o fator fosfomutante melhora significativamente a eficiência de reprogramação de células da glia em neurônios *in vitro* (Galante et al., 2022). *In vivo*, entretanto, a eficiência de reprogramação de células gliais no córtex cerebral pós-natal foi baixa mesmo com o fator fosfomutante. A partir dessa observação, nós dividimos nossa abordagem em duas questões independentes: (1) Se as células transduzidas com Ascl1 ou Ascl1SA6 não são eficientemente convertidas em neurônios, o que está acontecendo com essas células; e (2) Como melhorar a eficiência de conversão de células da glia em neurônios *in vivo*?

Com relação a primeira questão, Galante e colaboradores (2022) observaram que no grupo de animais que receberam injeção intracortical do vetor retroviral que induzia a expressão de Ascl1, havia uma maior proporção de células expressando o marcador de células de linhagem oligodendrocítica Sox1. Para entender qual a origem desse aumento de células Sox10-positivas, precisamos considerar as funções biológicas de Ascl1 para além de seus efeitos pró-neurogênicos. Estudos demonstraram que a deleção de Ascl1 durante neurodesenvolvimento impacta significativamente a diferenciação de precursores em oligodendrócitos maduros. Considerando que astrócitos e oligodendrócitos compartilham precursores em comum durante o neurodesenvolvimento, uma possível hipótese para o aumento de células Sox10 seria que os astrócitos transduzidos com Ascl1 são reprogramados em oligodendrócitos. Outro papel de Ascl1, entretanto, é a modulação da proliferação de células gliais, particularmente células precursoras de oligodendrócitos (CPOs), um efeito que é potencializado quando o fator de transcrição está em sua forma fosforilada (Li et al., 2014). Portanto, outra hipótese é que nas CPOs corticais que são alvo do vetor retroviral, a expressão de Ascl1 leva a um aumento da atividade proliferativa dessa população celular. A primeira hipótese foi testada em um projeto independente. Nesse contexto, o objetivo do nosso estudo foi:

- (1) Caracterizar a atividade proliferativa de células transduzidas nos grupos controle, Ascl1 e Ascl1SA6;
- (2) Identificar a identidade de células transduzidas em proliferação.

Já com relação a segunda questão, Gascón e colaboradores (2016) descreveram previamente que a morte celular é um fator limitante crucial durante a reprogramação de células da glia em neurônios. Eles demonstraram que a co-transfecção das células com a proteína anti-apoptótica Bcl2 usando um segundo vetor retroviral melhora significativamente a eficiência de Ascl1 em converter células da glia em neurônios tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O efeito de Bcl2 foi independente de sua ação anti-apoptótica, mas foi associado com uma redução do estresse oxidativo e ferroptose (Gascón et al., 2016). Dados prévios (Marichal et al., em preparação) do laboratório demonstraram que a combinação de Bcl2 com Ascl1SA6 tem uma maior eficiência para a reprogramação de células da glia em neurônios no córtex cerebral pós-natal. Os neurônios induzidos (NI) gerados nessa abordagem são caracterizados por potenciais de ação de alta frequência e aproximadamente 20% dessas células expressam parvalbumina (PV). Essas características assemelham-se a interneurônios PV de disparo rápido. Portanto, a combinação de Ascl1SA6 e Bcl2 favorece a reprogramação de células da glia em NIs com um fenótipo de interneurônio GABAérgico. Entretanto, qual seria a população de células de glia que é alo do vetor retroviral e qual a eficiência com que as diferentes populações gliais são convertidas em NIs? Nesse contexto, o objetivo da segunda parte do nosso estudo foi:

- (1) Investigar, através de uma abordagem de *fate mapping*, se os NIs são originados a partir de CPOs NG2-positivas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e injeções estereotáxicas

Todos os protocolos foram conduzidos de acordo com as normas do *Animals Scientific Procedures Act* 1986 (Número da Licença: X24D82DFF). Para as injeções reovirais, foram utilizados filhotes machos e fêmeas de camundongos da linhagem C57Bl6/J ou da linhagem obtida através do cruzamento de camundongos NG2-CreERTM (Jackson Laboratory #008538) com Ai6(RCL-ZsGreen) (Jackson Laboratory #007906). Filhotes foram mantidos em caixas de policarbonato do tipo II (350 cm²) com suas mães. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura, com ciclo claro/escuro 12h/12h e com água e comida *ad libitum*.

Todos os esforços foram tomados para a máxima redução do número de animais utilizados e para prevenir seu sofrimento.

A cirurgia foi realizada nos filhotes no dia 5 pós-natal (P5). Antes da cirurgia, animais receberam uma injeção subcutânea de carprofeno (Rimadyl®, Zoetis, 4 mg/kg diluído em salina 0.9% NaCl). Anestesia foi induzida através de uma injeção intraperitoneal (i.p.) de medetomidina (0,5mg/kg; Pfizer), midazolam (5 mg/kg, Hameln) e fentanil (0.025mg/kg, Albrecht) diluídos em salina 0,9%. Os vetores retrovirais foram injetados no córtex somatossensorial e córtex visual usando capilares de vidro (Hirschmann, 9600105) com 20 µm de diâmetro. Brevemente, uma pequena incisão foi realizada na pele com uma lâmina cirúrgica e o crânio foi cuidadosamente perfurado com uma agulha. Cada filhote recebeu uma injeção de 0,5-1,0 µl da suspensão de vetores retrovirais. Após a injeção, a incisão foi fechada usando uma cola cirúrgica (3M Vetbond, NC0304169) e o efeito anestésico foi interrompido através de uma injeção (i.p.) de atipamezol (2,5mg/kg, Pfizer), flumazenil (0,5mg/kg, Hameln) e Buprenorfina (0,1 mg/Kg, RB Pharmaceutials) diluídos em salina 0,9%. Antes de retornarem para as caixas com suas mães, os filhotes foram mantidos para recuperação em uma placa aquecida (37°C). A recuperação pós-cirúrgica foi checada todos os dias por no mínimo uma semana após a cirurgia.

Plasmídeos e retrovírus

Vetores retrovirais baseados no vírus da leucemia murina Moloney (MMLV) (Heinrich et al., 2011) foram utilizados para induzir a expressão de Ascl1, Ascl1SA6 e/ou Bcl2 sob controle do promotor de β -actina de galinha com um *enhancer* de citomegalovírus (pCAG). Um gene reporter (GFP ou DsRed) foi adicionado ao construto após um elemento de sítio de entrada so ribossomo (IRES). Para gerar os constructos pCAG-Ascl1-IRES-DsRed/GFP e pCAG-Ascl1SA6-IRES-DsRed/GFP, um cassete contendo as sequências codificadoras flanqueadas em sítios de recombinação atttL foram gerados através da excisão das sequências codificadoras para Ascl1 ou Ascl1SA6 a partir dos vetores parentais pCIG2 (Li et al., 2014) através de restrição dupla via XhoI/SalI. Fragmentos isolados foram inseridos no vetor intermediário pENTRY1A *Dual Selection* (Invitrogen) linearizado via SalI. Os constructos retrovirais finais foram subsequentemente obtidos através de recombinação catalizada pela *LR Clonase II* (Invitrogen, 11791020), que substitui o cassete ccdB no vetor de destino pCAG-ccdB-IRES-DsRed ou pCAG-ccdB-IRES-GFP com as sequências codificadoras para Ascl1 ou Ascl1SA6. Transdução com vetores retrovirais MMLV codificando apenas os reporteres GFP ou DsRed (pCAG-IRES-DsRed/pCAG-IRES-GFP) foram usados como controle (Heinrich et al., 2011). As partículas virais foram produzidas usando um *GPG Helper Free Packaging Cells* para gerar partículas retrovirais

pseudotipadas de glicoproteína do vírus da estomatite vesicular (VSV-G) (Ory et al., 1996). Estoques virais foram titulados em cultura de células HEK293 transduzidas. Titulações virais foram utilizadas na escala de 10^7 TU/ml.

Drogas

Nós utilizados 5-Etínil-2'-deoxiuridina (EdU; 50mg/kg, i.p., única injeção com 12 dias pós injeção dos vetores virais (12dpi)) e tamoxifeno (0.6mg/kg, s.c., 2 injeções em P2 e P5 ou 0.2mg/kg, i.p., 3 injeções em P3, P4 e P5).

Preparação do tecido e imunohistoquímica

Animais foram letalmente anestesiados com uma solução de Ketamina (120 mg/kg; Zoetis) e Xylazine (16 mg/kg; Bayer) (em salina 0,9%, i.p.) e perfundidos transcardiacamente com salina 0,9% aquecida seguida de paraformaldeído 4% (PFA, Sigma, P6148) gelado. Os cérebros foram retirados cuidadosamente e pós-fixados em PFA 44% *overnight* a 4°C. Os encéfalos foram então, cortados em secções coronais (40µm de espessura) com a utilização de um vibratomo (Microm HM650V, Thermo Scientific) e os tecidos foram estocados a -20°C em uma solução anticongelante (20% glicose [Sigma, G8270], 40% etilenoglicol [Sigma, 324558], 0.025% azida de sódio [Sigma, S2202], em tampão fosfato [15mM Na₂HPO₄·12H₂O [Merck, 10039-32-4]; 16mM NaH₂PO₄·2H₂O [Merck, 13472-35-0]; pH 7.4]).

Para o protocolo de imunohistoquímica, as secções de cérebro foram lavadas 3 vezes (15 minutos/lavagem) com TBS (50mM Tris [Invitrogen, 15504-020]; 150 mM NaCl [Amresco, 0241]; pH7.6). Para a imunomarcção de NG2, foi realizada uma etapa de recuperação antigênica através da incubação dos cortes em tampão citrato (pH=6.0) por 30 min a 70°C e por 40 min a temperatura ambiente, seguida por 3 lavagens com TBS. Nas demais imunomarcções, a etapa de recuperação antigênica não foi realizada. Os tecidos foram incubados em solução de bloqueio (Para a maioria das imunomarcções: 2.5% soro de asno, 2.5% soro de cabra; 0.3% Triton X-100; 1x TBS; Para a imunomarcção de Sox10: a mesma solução sem o soro de cabra) por 2h. Os tecidos foram incubados com os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio (o tempo de incubação variou dependendo da imunomarcção realizada). Os anticorpos primários utilizados foram:

- Anti-Sox10 (cabra; 1:300; R&D Systems – AF2864) – Incubação por 2h a temperatura ambiente + 70h a 4°C

- Anti-RFP (coelho; 1:500; Rockland – 600-401-379) – Incubação por 2h a temperatura ambiente + *overnight* a 4°C;
- Anti-GFP (galinha; 1:1000; AvesLab – GFP-1020) – Incubação por 2h a temperatura ambiente + *overnight* a 4°C;
- Anti-doublecortina (porquinho da índia; 1:500; Millipore – AB2253) – Incubação por 2h a temperatura ambiente + 46h a 4°C;
- Anti-NeuN (camundongo; 1:500; Millipore – MAB377) – Incubação por 2h a temperatura ambiente + 46h a 4°C;
- Anti-NG2 (coelho; 1:400; Millipore – AB5320) – Incubação *overnight* a temperatura ambiente.

Após a incubação com os anticorpos primários, os tecidos foram lavados 3 vezes com TBS seguido de 2h de incubação a temperatura ambiente com anticorpos secundários (diluição 1:1000). Os anticorpos secundários utilizados foram: *Donkey Anti-goat AlexaFluor 488*; *Donkey Anti-rabbit Cy3*; *Goat Anti-rabbit AlexaFluor 568*; *Donkey Anti-rabbit AlexaFluor 647*; *Donkey Anti-chicken AlexaFluor 488*; *Donkey Anti-guinea-pig Cy5*; *Goat Anti-mouse AlexaFluor 647*. Tecidos foram lavados 3 vezes (15min/lavagem) com TBS.

Para a marcação de células EdU-positivas, os cortes foram incubados com o *Click-iT EdU Imaging Kit Reaction Cocktail* (Para 500µL: 430µL de *1x Click iT EdU Reaction buffer*, 20µL de CuSO₄, 1,2µL de *Alexa Fluor Azide 647*, e 50µL de *Click iT EdU buffer additive*; Invitrogen, C10340) por 30min a temperatura ambiente, seguido por nova etapa de lavagem (3x15min) com TBS.

Os tecidos foram incubados com DAPI (5mM) dissolvido em PBS por 5 min a temperatura ambiente seguida de uma lavagem rápida com TBS. Para a montagem das lâminas, foi utilizado Mowiol como meio de montagem (2.5% 1,4-diazobicyclo-[2.2. 2]-octane (DABCO, Sigma, D2522)) e os tecidos foram cobertos por lamínulas 22x64mm.

As lâminas foram analisadas utilizando um microscópio confocal Zeiss LSM 800 Confocal equipado com laser de estado sólido nos comprimentos de onda 405, 488, 561 e 633nm. Imagens foram obtidas com uma objetiva de 20x (NA 0.8) através de *Z-stacks* seriais intervalados entre 1.0µm e 2.13µm de distância até obter a imagem de toda a espessura do tecido.

Procedimentos experimentais

Experimento 1: Efeito de Ascl1 na proliferação de CPOs no córtex cerebral pós-natal: Camundongos foram divididos nos seguintes grupos experimentais: (1) Controle, (2) Ascl1, e (3) Ascl1SA6. Em P5, camundongos de cada grupo receberam uma injeção intra-cortical da suspensão contendo o vetor retroviral correspondente a cada grupo (para o grupo controle: vetor retroviral que induziu a expressão do repórter DsRed; para o grupo Ascl1: retrovírus induz a expressão de Ascl1 wild-type (WT) e DsRed; e para o grupo Ascl1SA6: retrovírus que induz a expressão do fator fosfomutante Ascl1SA e DsRed). Em 12dpi, camundongos receberam EdU (50mg/kg, i.p.) e, 3h depois, foram submetidos a perfusão. Nesse protocolo, o objetivo foi quantificar a porcentagem de células transduzidas (DsRed-positivas) que estavam em proliferação no 12º dpi (ou seja, que serão EdU-positivas). Além disso, objetivamos também identificar se as células transduzidas em proliferação no 12ºdpi expressaram o marcador oligodendrocítico Sox10.

Experimento 2: Regime de tratamento com tamoxifeno que induz de forma eficiente a expressão da proteína repórter em células NG2-positivas: Camundongos NG2CreERTM/CAG-GFP receberam um dos seguintes regimes de tratamento: (1) 3 injeções em P3, P4 e P5 da dose 0,2mg/kg de tamoxifeno (i.p.); ou (2) 2 injeções em P2 e P5 da dose 0,6mg/kg de tamoxifeno (s.c.). Para avaliar a eficiência da expressão da proteína repórter GFP em células NG2, nós realizamos uma imunomarcagem convencional para Ng2 e quantificamos a porcentagem de células NG2 que era GFP-positivas.

Experimento 3: Fate-mapping de NIs gerados pela combinação de Ascl1SA6 + Bcl2: filhotes de NG2-CreETM/CAG-GFP receberam 2 injeções (s.c.; em P2 e P5) de tamoxifeno (0.6mg/kg). Em P5, o retrovírus (CAG-Ascl1SA6-(GSG)T2A-Bcl2-IRES-dsRED) foi injetado no córtex somatossensorial e no córtex visual. No 12º dpi, camundongos foram submetidos a perfusão. O cérebro foi coletado e processado para os protocolos de imunomarcagem. O objetivo desse experimento foi quantificar a porcentagem de células transduzidas que eram CPOs (GFP-positivas) e a eficiência de conversão neuronal (através da avaliação da co-expressão com os marcadores neuronais DCX e NeuN).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Expressão de Ascl1 aumenta a atividade proliferativa de células transduzidas no 12º dpi no córtex cerebral pós-natal

Para testar nossa hipótese que o aumento no número de células Sox10-positivas entre as células transduzidas com *Ascl1* seria resultado de um aumento na proliferação, nós injetamos EdU no 12º dpi e avaliamos o número de células transduzidas que incorporaram EdU e, portanto, estavam em proliferação. Em concordância com nossa hipótese, nós observamos que a porcentagem de células transduzidas EdU-positivas foi significativamente maior no grupo *Ascl1* em comparação ao grupo controle (teste t de amostras independentes, $t_4=5.209$, $p=0.0065$) (Figura 1).

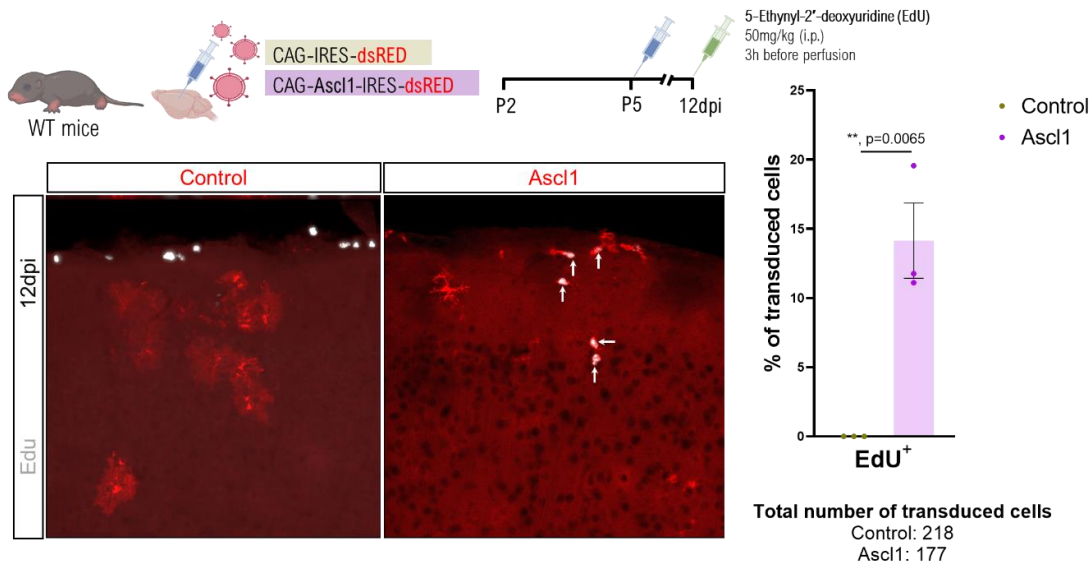


Figura 1. *Ascl1* aumenta a proliferação de células no cérebro pós-natal. Camundongos C57Bl6/J foram injetados com o retrovírus controle (CAG-DsRed) ou *Ascl1* (CAG-*Ascl1*-DsRed) no dia pós-natal 5 (P5). No 12º dia pós-injeção do retrovírus (dpi), camundongos receberão uma injeção sistêmica de EdU. O gráfico representa a quantificação de 3 animais/grupo da porcentagem de células transduzidas (DsRed-positivas) que era EdU-positivas. Um total de 218 células transduzidas foram analisadas no grupo controle e 177 no grupo *Ascl1*. Nas imagens representativas à esquerda, as flechas indicam as células DsRed-positivas/EdU-positivas. (**) representa $p<0.01$ e comparação ao grupo controle (teste t de amostras independentes).

A indução de proliferação foi um fenômeno associado especificamente com a expressão do *Ascl1* WT, uma vez que nenhuma das células transduzidas no grupo *Ascl1*SA6 foi positiva para EdU no 12º dpi (74 células analisadas; Figura 2).

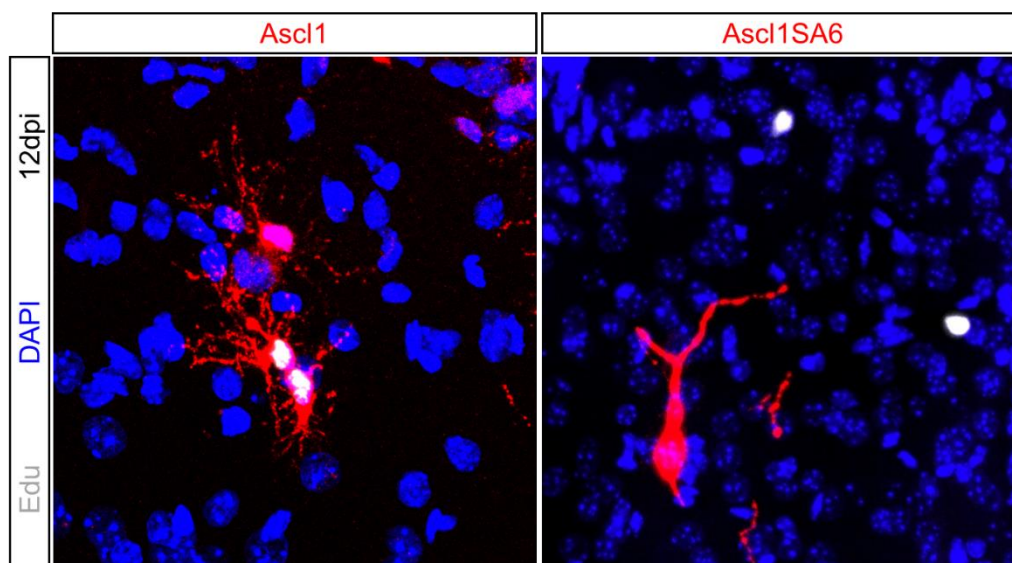


Figura 2. Ascl1SA6 não induz proliferação de células transduzidas no cérebro pós-natal. Camundongos C57Bl6/J foram injetados com retrovírus direcionando a expressão de Ascl1 WT (CAG-Ascl1-DsRed) ou Ascl1SA6 (CAG-Ascl1SA6-DsRed) no dia pós-natal 5. No 12º dia pós-injeção do retrovírus (12dpi), camundongos receberam uma injeção sistêmica de EdU. Imagens representativas de células transduzidas (DsRed-positivas) EdU-positivas no grupo Ascl1e células transduzidas (DsRed-positivas) e EdU-negativas no grupo Ascl1SA6.

As células transduzidas em proliferação são CPOs

Em uma abordagem experimental independente, foi avaliado se o aumento no número de células Sox10 positivas no grupo Ascl1 poderia ser explicado por um efeito do fator de transcrição em reprogramar astrócitos GFAP-positivos em células oligodendrocíticas Sox10-positivas. Através de uma estratégia de *fate mapping* utilizando camundongos GFAP-Cre/CAG-GFP, os resultados indicaram que as células GFAP-positivas que são alvo de Ascl1 não são convertidas em células expressando Sox10. Em conjunto com os achados descritos anteriormente, essas evidências apontam a favor da hipótese que a expressão de Ascl1 pode aumentar a atividade proliferativa de células oligodendrogliais no córtex cerebral pós-natal. Entretanto, ainda precisamos confirmar se as células transduzidas em proliferação são de fato Sox10-positivas. Das 472 células transduzidas analisadas no grupo Ascl1WT, 58 (12%) estavam em proliferação no 12º dpi (ou seja, 12% eram células DsRed-positivas/EdU-positivas), e, dessas, 56 (96%) também expressavam o marcador de células oligodendrogliais Sox10 (Figure 3).

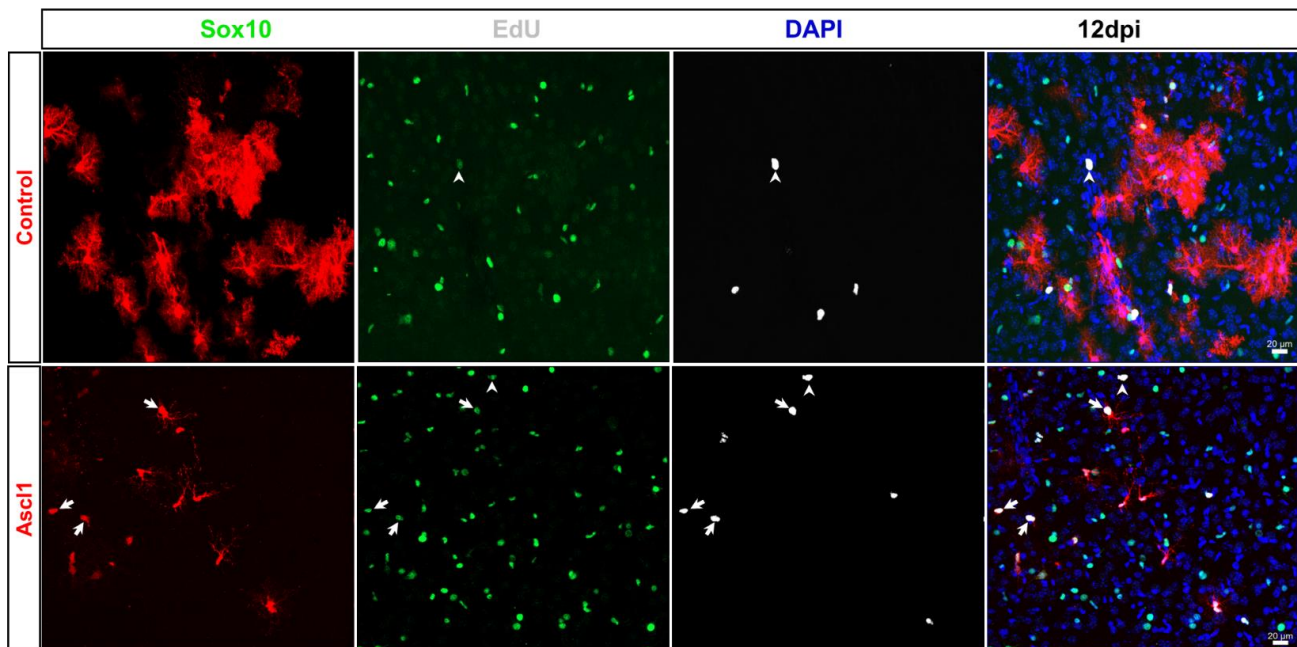


Figura 3. Células transduzidas com Ascl1 expressam o marcador oligodendroglial Sox10. Camundongos C57Bl6/J receberam uma injeção intra-cortical de retrovírus controle (CAG-DsRed) ou Ascl1 (CAG-Ascl1-DsRed) no dia pós-natal 5. no 12º dia pós-injeção (12dpi), camundongos receberam uma injeção sistêmica de EdU. Imagens representativas da imunomarcagem para Sox10 (verde), DsRed (vermelho), EdU (branco) e DAPI (marcador nuclear; azul) nos grupos controle e Ascl1. Flechas apontam para as células tripla-positivas (DsRed/Sox10/EdU-positivas) e as pontas de flecha isoladas apontam as células dupla-positivas (Sox10/EdU positivas).

Em conjunto, nossos resultados indicam que a indução da expressão do fator de transcrição Ascl1 WT, mas não do fosfomutante Ascl1SA6, aumenta a atividade proliferativa de células Sox10-positivas transduzidas pelos vetores retrovirais no córtex cerebral pós-natal.

Uma maior dose com menor número de injeções de tamoxifeno é mais eficiente em promover a expressão da proteína repórter na linhagem tamoxifeno-dependente NG2-CreER™

Estudos de *fate mapping* frequentemente se valem de camundongos geneticamente modificados que permitem a expressão de um gene repórter de maneira Cre-dependente em populações celulares específicas. No caso do nosso estudo, a estratégia de *fate mapping* seria utilizada para investigar se os NIs gerados através da expressão de Ascl1SA6+Bcl2 em células gliais seriam derivados de CPO. A linhagem de camundongos utilizada em nosso estudo foi a NG2-CreER™, na qual a atividade de Cre é desencadeada de forma condicionada frente ao

tratamento com tamoxifeno. Nós cruzamos esses animais com uma linhagem que direciona a expressão dependente de Cre da proteína repórter GFP. Portanto, a primeira etapa para cumprir o objetivo do nosso experimento é padronizar um regime de tratamento com tamoxifeno que permita uma eficiente indução da atividade da Cre e expressão de GFP em uma população significativa de células NG2-positivas. Nós testamos dois regimes de tratamento. No primeiro, uma dose baixa de tamoxifeno (0,2mg/kg) foi administrada via i.p. nos dias pós-natais 3, 4 e 5 (P3, P4 e P5). Entretanto, com esse regime de tratamento, observamos um pequeno número de células GFP no córtex cerebral de camundongos no dia pós-natal 17 (Figura 4, painel a esquerda). Portanto, nós testamos uma segunda abordagem de tratamento utilizando uma maior dose (0,6mg/kg) administrada via s.c. nos dias P2 e P5. Com essa abordagem, nós observamos um número significativamente maior de células GFP-positivas (Figura 4, paine a direita).

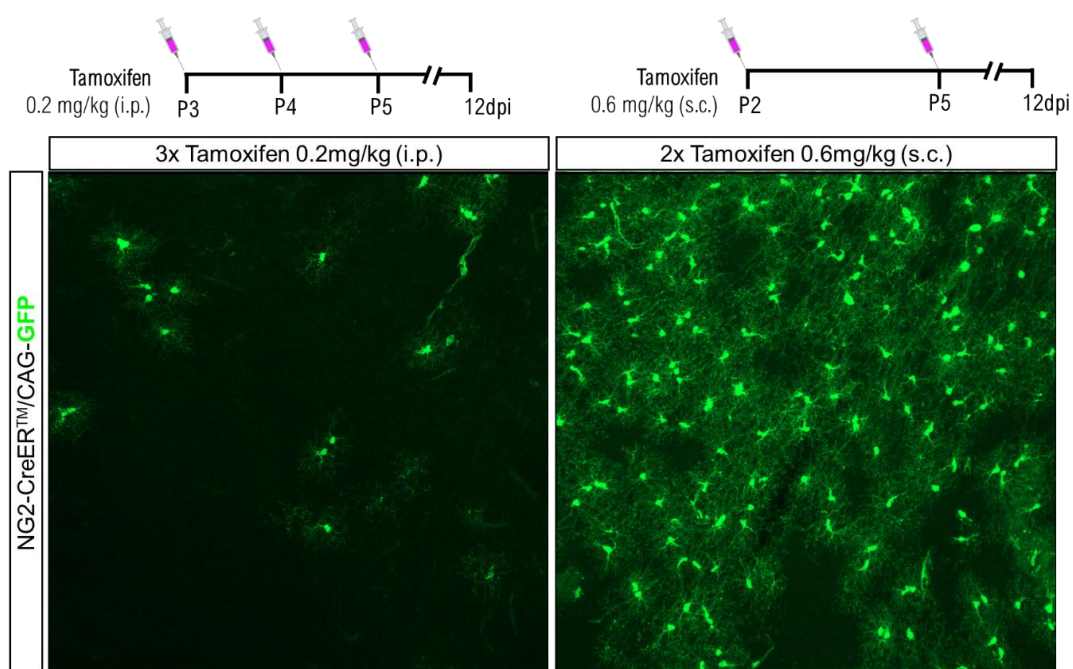


Figura 4. Diferentes regimes de tratamento com tamoxifeno, diferente eficiência na expressão do repórter. Camundongos NG2-CreERTM/CAG-GFP receberam 3 injeções (nos dias pós-natais 3, 4 ou 5 - P3, P4 e P5) de uma baixa dose de tamoxifeno (i.p.; 0,2mg/kg) ou 2 injeções (em P2 e P5) de uma maior dose de tamoxifeno (s.c.; 0.6mg/kg) para induzir a ativação tamoxifeno-dependente da Cre-recombinase e consequente indução do knock-into gene repórter GFP em células NG2-positivas.

Em seguida, nós caracterizamos se as células que expressavam GFP eram de fator NG2-positivas e mensuramos a porcentagem de células NG2 que expressavam a proteína repórter. Para isso, nós realizamos uma imunohistoquímica para marcação de células NG2-positivas e quantificamos a proporção dessas células que co-expressavam GFP. Nós encontramos que

apenas 30,88% das células NG2-positivas expressavam GFP no regime com a menor dose de tamoxifeno. Por outro lado, no protocolo com maior dose, 71.92% das células NG2 expressavam GFP. Ademais, 21,74% (menor dose) e 19.26% (maior dose) das células GFP-positivas eram NG2-negativas no P17 (Figura 5). A maior parte das células GFP-positivas que não expressavam NG2 foram morfológicamente identificáveis como oligodendrócitos maturo, indicando que essas células era originadas de CPOs que expressavam NG2 no momento da recombinação gênica ativada pelo tratamento com tamoxifeno.

Considerando esses achados, o regime de tratamento com uma maior dose de tamoxifeno administrada por 2x via s.c. foi selecionado para o prosseguimento dos experimentos de *fate mapping*.

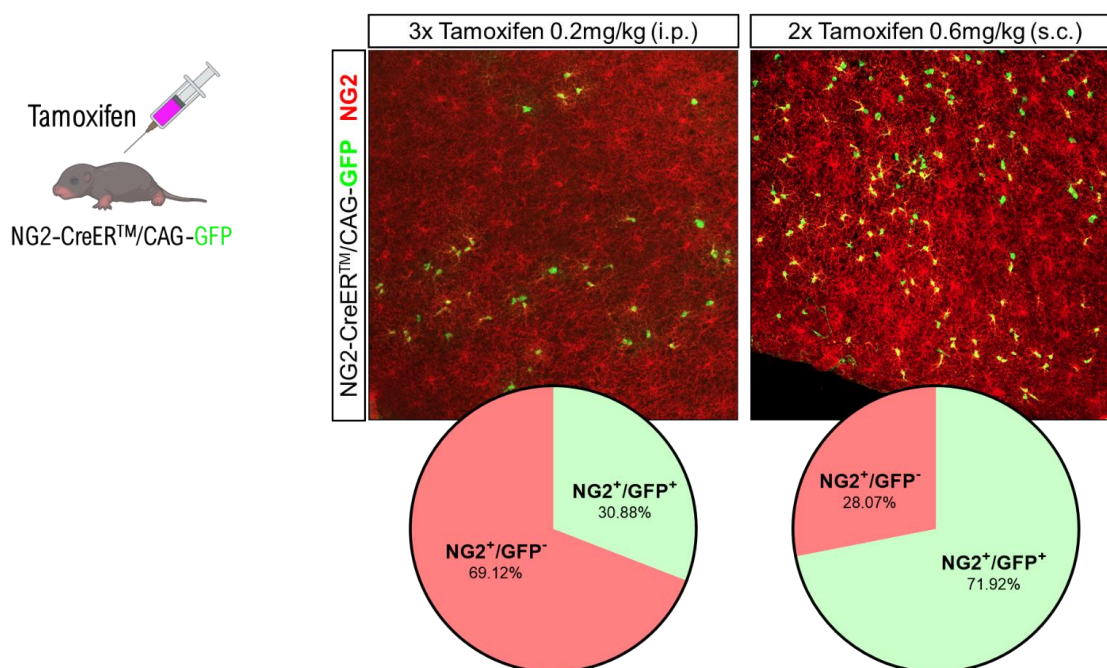


Figura 5. Diferentes regimes de tratamento com tamoxifeno apresentam uma diferente eficiência na expressão do repórter em células NG2-positivas. Camundongos NG2-CreERTM/CAG-GFP receberam 3 injeções (nos dias pós-natais 3, 4 ou 5 - P3, P4 e P5) de uma baixa dose de tamoxifeno (i.p.; 0,2mg/kg) ou 2 injeções (em P2 e P5) de uma maior dose de tamoxifeno (s.c.; 0.6mg/kg) para induzir a ativação tamoxifeno-dependente da Cre-recombinase e consequente indução do knock-into gene repórter GFP em células NG2-positivas. As imagens representativas mostram a imunomarcagem para NG2 em vermelho e o a proteína repórter em verde.

Uma pequena proporção de NIs parecem ser derivados de CPOs

Uma vez definido o protocolo de tratamento com tamoxifeno, nós seguimos nosso experimento de *fate mapping* para completar o objetivo de investigar se os NIs gerados pela

combinação de *Ascl1SA6+Bcl2* seriam CPOs transduzidas pelo retrovírus. Em um *screening* inicial, nós encontramos poucas células transduzidas que eram GFP-positivas em camundongos *NG2CreERTM/CAG-GFP* (Figura 6).

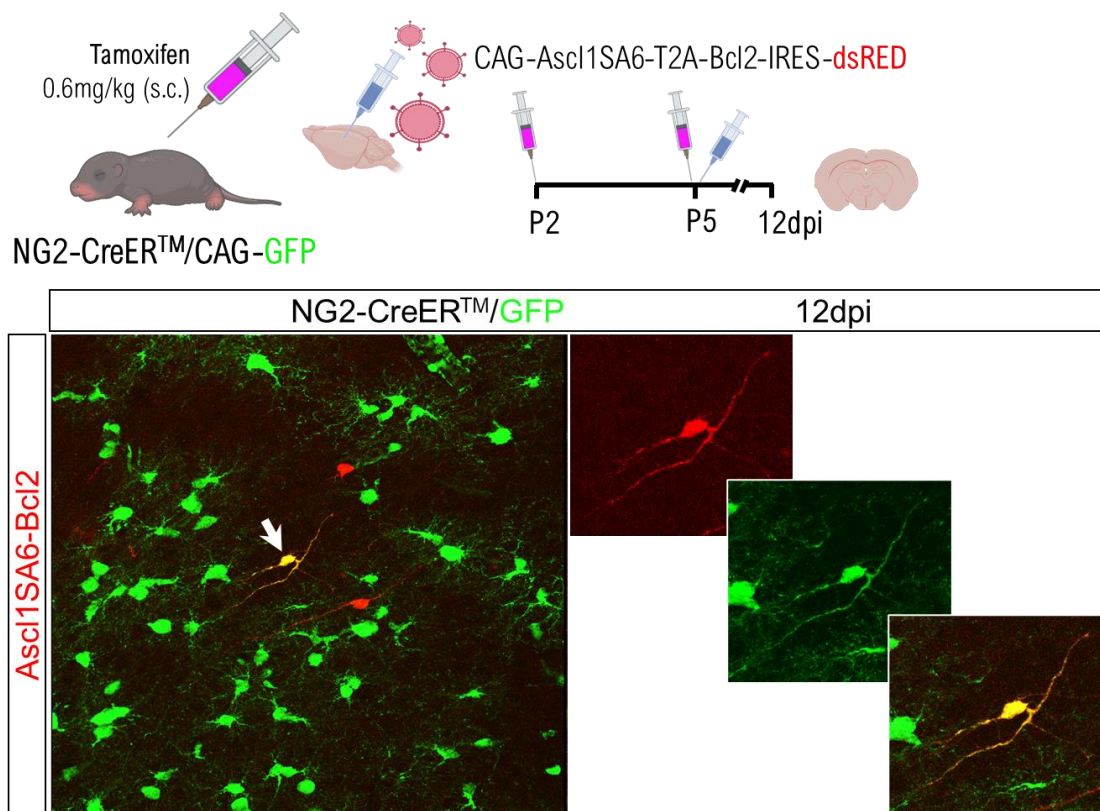
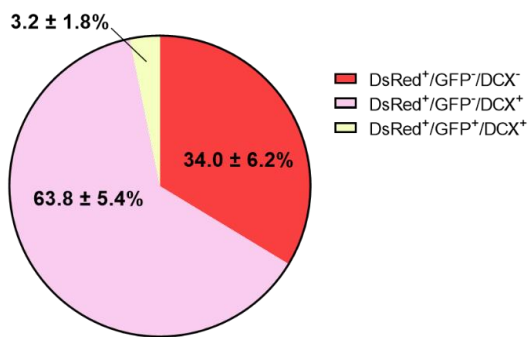
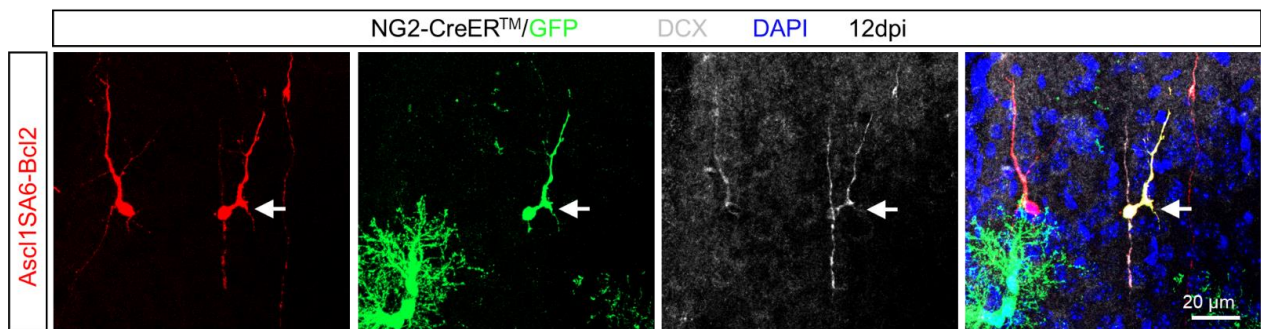


Figura 6. Fate mapping de NIs gerados por *Ascl1SA6+Bcl2*. Camundongos C57Bl6/J receberam uma injeção intracortical de vetor retroviral direcionando a expressão de *Ascl1SA6* e *Bcl2* (*CAG-Ascl1SA6-(GSG)T2A-Bcl2-IRES-dsRED*). No 12º dia pós-injeção do retrovírus (12dpi), os animais foram sacrificados e o tecido cerebral foi processado para a detecção de células transduzidas (em vermelho) que fossem derivadas de células NG2-positivas (em verde).

Ainda assim, nós decidimos investigar a expressão de marcadores neuronais em células transduzidas originadas a partir de células NG2 (Figura 7). Uma baixa porcentagem (3.2%) de células transduzidas eram GFP-positivas, mas, dentre essas células, todas expressavam o marcador de neuroblastos DCX no 12º dpi. Além disso, 63.8% das células transduzidas não expressavam GFP, mas expressavam DCX (Figura 7).



n=416 transduced cells analyzed

Figura 7. Eficiência da conversão de células NG2 em NIs expressando DCX após a transfecção com Ascl1SA6 + Bcl2. Camundongos com a expressão de GFP (verde) direcionada de forma cre-dependente em células NG2-positivas receberam uma injeção intra-cortical de vetor retroviral direcionando a expressão tanto de Ascl1SA6 quanto de Bcl2 (CAG-Ascl1SA6-(GSG)T2A-Bcl2-IRES-dsRED). No 12º dia pós-injeção do retrovírus (12dpi), camundongos foram sacrificados e nós avaliamos o número de células transduzidas (em vermelho). A marcação de DCX é mostrada em branco. Os núcleos marcados pelo DAPI são representados em azul. O gráfico representa a Média ± EPM de 3 camundongos correspondente a porcentagem de células transduzidas expressando apenas DsRed (em vermelho no gráfico), expressando DsRed+DCX (em rosa) ou expressando DsRed+DCX+GFP (em amarelo).

No caso do marcador de neurônios maduros NeuN, 2,1% das células transduzidas foram GFP-positivas e NeuN-positivas e apenas 0,7% foram GFP-positivas e NeuN-negativas. Por outro lado, 70% das células transduzidas foram NeuN-positivas e GFP-negativas (Figura 8).

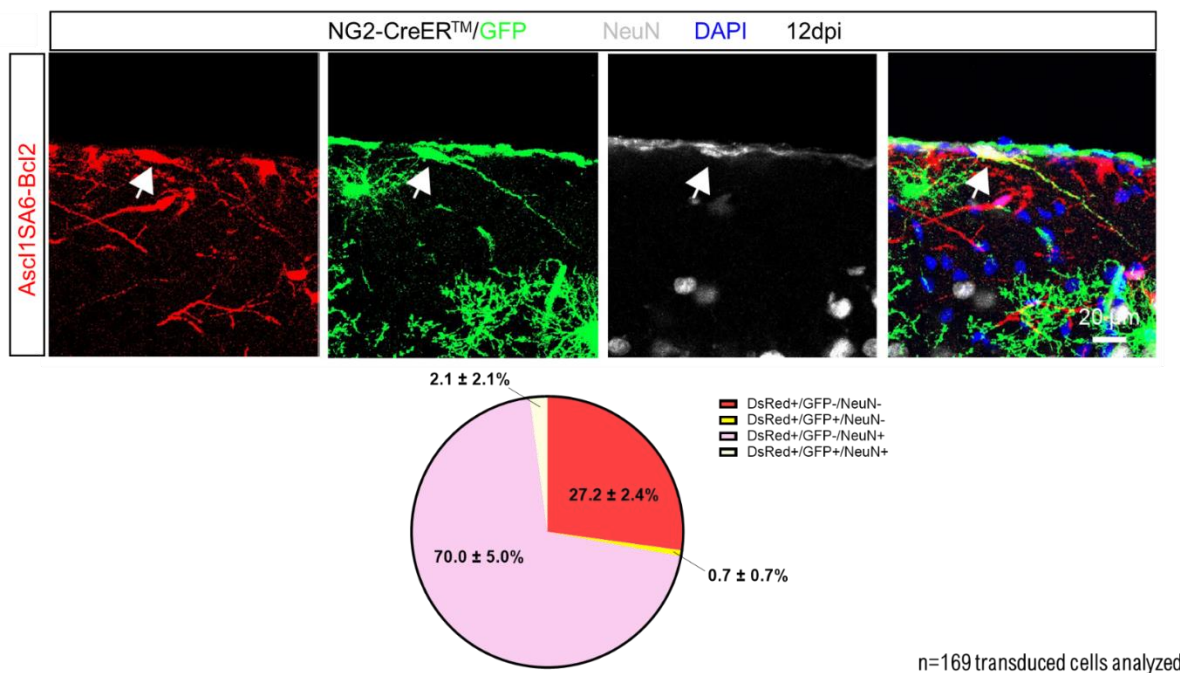


Figura 8. Eficiência da conversão de células NG2 em NIs expressando NeuN após a transfecção com Ascl1SA6 + Bcl2. Camundongos com a expressão de GFP (verde) direcionada de forma cre-dependente em células NG2-positivas receberam uma injeção intra-cortical de vetor retroviral direcionando a expressão tanto de Ascl1SA6 quanto de Bcl2 (CAG-Ascl1SA6-(GSG)T2A-Bcl2-IRES-dsRED). No 12º dia pós-injeção do retrovírus (12dpi), camundongos foram sacrificados e nós avaliamos o número de células transduzidas (em vermelho). A marcação de NeuN é mostrada em branco. Os núcleos marcados pelo DAPI são representados em azul. O gráfico representa a Média ± EPM de 3 camundongos correspondente a porcentagem de células transduzidas expressando apenas DsRed (em vermelho no gráfico), expressando DsRed+NeuN (em rosa) ou expressando DsRed+NeuN+GFP (em amarelo).

Previamente, usando um retrovírus controle (CAG-IRES-DsRed) injetado no córtex cerebral no dia P5 e observamos que, no 3º dpi, cerca de 63% das células alvo do retrovírus eram astrócitos GFAP-positivos e cerca de 32% eram células Sox10-positivas (Galante et al., 2022). Além disso, dados prévios do grupo utilizando uma estratégia de *fate mapping* com animais GFAP-Cre/GFP demonstraram que aproximadamente 50% das células transduzidas eram astrócitos. Cerca de metade dos astrócitos transduzidos expressam os marcadores neuronais NeuN e DCX. Nossos resultados de *fate mapping* utilizando os animais NG2-CreERTM não parecem ser suficientes para concluir o entendimento sobre de quais células são derivados os NIs gerados a partir da reprogramação induzida por Ascl1SA6+Bcl2. A limitação operacional de não obter 100% de eficiência na expressão da proteína repórter GFP em células NG2 positivas com o tratamento com tamoxifeno pode contribuir para uma subestimação do número de INs que podem ser derivados de CPOs. É importante considerar, também, que dados prévios do laboratório

utilizaram Sox10 como um marcador oligodendroglial. NG2 é um marcador expresso por CPOs e Sox10 é expresso por todas as células de linhagem oligodendroglial (Kuhn et al., 2019; Nishiyama et al., 2009). Além disso, existe uma população de células-tronco da crista neural nas meninges durante o neurodesenvolvimento que expressam Sox10 e podem ser potencialmente alvo do retrovírus (Hayakawa et al., 2021).

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

“Uma vez terminado o desenvolvimento, as fontes de crescimento e regeneração dos axônios e dendritos cessam irrevogavelmente. Nos centros adultos, as vias nervosas são algo fixo, acabado e imutável. Tudo pode morrer, nada pode ser regenerado. Cabe à ciência do futuro mudar, se possível, esse duro decreto”. Esta frase do renomado neurocientista Santiago Ramon y Cajal retrata um dos dogmas mais importantes da neurociência: quão plástico é o cérebro? Cajal desafia a ciência do futuro a mudar a visão sobre o sistema nervoso central como “fixo, acabado e imutável”. Os resultados apresentados neste relatório são uma pequena evidência de como alguém poderia mudar este decreto.

Podemos assumir que os neurônios são, como proposto por Cajal, incapazes de regeneração. As células gliais, por outro lado, são caracterizadas por uma notável plasticidade. Propomos que podemos aproveitar essa plasticidade para compensar a limitada capacidade regenerativa dos neurônios. Aqui, mostramos que, a expressão de Ascl1 (WT ou fosfomutante) sozinho ou em combinação com Bcl2, induz alterações plásticas nas células gliais. Nossos resultados indicaram que uma expressão retroviral do fator de transcrição Ascl1 WT aumenta a proliferação de CPOs Sox10-positivas. Além disso, a expressão do fosfomutante Ascl1SA6 combinado com o fator antiapoptótico Bcl2 promove eficientemente uma reprogramação de células da glia em neurônio. No entanto, nossa abordagem de *fate mapping* parece indicar que uma porcentagem muito baixa de NIs gerados pela combinação de Ascl1SA6+Bcl2 são derivados de células gliais NG2-positivas.

Nossos achados com relação ao aumento da atividade proliferativa de CPOs induzida por Ascl1 permite o melhor entendimento sobre a modulação plástica induzida por esse fator de transcrição nessa população celular. Considerando o papel de CPOs na geração de oligodendrócitos, mielização e plasticidade sináptica, a caracterização da superexpressão Ascl1 como uma abordagem que permite aumentar a atividade proliferativa dessa população de células pode permitir a definição de novas estratégias para recrutamento dessa célula glial em mecanismos de reparo frente a degeneração tecidual. Uma discussão mais completa sobre esses

achados pode ser encontrada no artigo científico derivado desses e de outros resultados do grupo (Galante et al., 2022).

Os resultados apresentados aqui e outros dados do laboratório abriram caminho para outras questões, que infelizmente não conseguimos elucidar completamente em tempo hábil durante o estágio:

- Como estudos anteriores (Gascón et al., 2016) indicaram que a coexpressão de Bcl2 também aumenta a eficiência da conversão de células da glia em neurônios mesmo do Ascl1 WT, questionamos se Bcl2 poderia afetar o efeito pró-proliferativo de Ascl1 WT em CPOs. Para investigar isso, camundongos foram injetados (em P5) com 2 vetores retrovirais: um direcionando a expressão de Ascl1 WT e outro direcionando a expressão de Bcl2. No 12º dpi, os camundongos receberam uma única injeção de EdU (50mg/kg) e, 3h depois, foram sacrificados. Realizamos uma imunocoloração para identificar as células transduzidas em proliferação EdU-positivas (Figura 9), mas a análise ainda está em andamento.

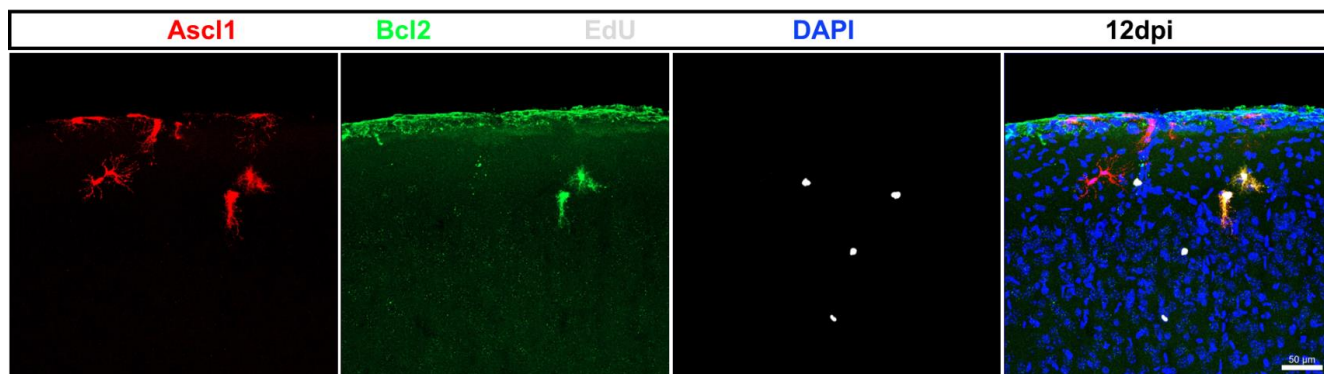


Figura 9. Efeito da co-expressão de Bcl2 na proliferação de CPOs induzida por Ascl1 WT no córtex cerebral pós-natal. Camundongos C57Bl6/J receberam uma injeção intracortical de vetores virais direcionando a expressão de Ascl1 WT (CAG-Ascl1-dsRED) e Bcl2 (pMIG-hBcl2-ires-GFP). No 12 dia pós-injeção do retrovírus (12dpi), camundongos receberam uma única administração sistêmica de EdU (50mg/kg) e, 3h depois, foram eutanasiados. As imagens representativas mostram células transduzidas com Ascl1 (em vermelho), células transduzidas com Bcl2 (em verde) e células EdU-positivas (em branco).

- Outra questão era sobre a sobrevivência e as características funcionais e morfológicas de NIs gerados pela combinação de Ascl1Sa6+Bcl2. Camundongos foram injetados com 2 vetores retrovirais direcionando a expressão de Ascl1SA6 e Bcl2. Nosso objetivo foi analisar a expressão tanto do NeuN quanto de parvalbumina. No entanto, uma análise inicial mostrou muito poucas células duplamente transduzidas e não conseguimos repetir o protocolo a tempo.

Durante o estágio no Laboratório do Prof. Berninger, tive a oportunidade de aprender sobre manipulações genéticas induzidas por vetores virais graças a imensa experiência do Prof. Berninger e todos os membros do seu grupo de pesquisa. Outro aspecto importante do estágio para o meu crescimento científico foi a possibilidade de trabalhar com *knock-in* condicionado dependente de tamoxifeno em camundongos NG2-CreERTTM, uma abordagem com ampla aplicação em neurociência tanto para abordagens de *fate mapping* quanto em outros experimentos que objetivam manipulações genéticas de populações celulares específicas em uma janela temporal controlada, determinada pelo momento de tratamento com tamoxifeno.

A título pessoal, este estágio foi uma oportunidade única de abrir a minha visão sobre a neurociência sob uma nova e inspiradora perspectiva. Aprendi muito com o prof. Berninger e todos em seu brilhante grupo de pesquisa. Além disso, ao assistir a várias palestras e seminários promovidos pelo *Centre of Developmental Neurobiology* e outros departamentos do King's College London, pude ver algumas das pesquisas de ponta mais empolgantes no campo da neurociência.

REFERÊNCIAS

- Galante, C., Marichal, N., Schuurmans, C., Berninger, B., & Péron, S. (2022). Low-efficiency conversion of proliferative glia into induced neurons by *Ascl1* in the postnatal mouse cerebral cortex in vivo. *BioRxiv*, 2022.04.13.488173. <https://doi.org/10.1101/2022.04.13.488173>
- Gascón, S., Murenu, E., Masserdotti, G., Ortega, F., Russo, G. L., Petrik, D., Deshpande, A., Heinrich, C., Karow, M., Robertson, S. P., Schroeder, T., Beckers, J., Irmeler, M., Berndt, C., Angeli, J. P. F., Conrad, M., Berninger, B., & Götz, M. (2016). Identification and Successful Negotiation of a Metabolic Checkpoint in Direct Neuronal Reprogramming. *Cell Stem Cell*, 18(3), 396–409. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2015.12.003>
- Hayakawa, K., Snyder, E. Y., & Lo, E. H. (2021). Meningeal Multipotent Cells: A Hidden Target for CNS Repair? *Neuromolecular Medicine*, 23(3), 339. <https://doi.org/10.1007/S12017-021-08663-1>
- Heinrich, C., Gascón, S., Masserdotti, G., Lepier, A., Sanchez, R., Simon-Ebert, T., Schroeder, T., Götz, M., & Berninger, B. (2011). Generation of subtype-specific neurons from postnatal astroglia of the mouse cerebral cortex. *Nature Protocols* 2011 6:2, 6(2), 214–228. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.188>
- Kim, E. J., Leung, C. T., Reed, R. R., & Johnson, J. E. (2007). In Vivo Analysis of *Ascl1* Defined Progenitors Reveals Distinct Developmental Dynamics during Adult Neurogenesis and Gliogenesis. *The Journal of Neuroscience*, 27(47), 12764. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3178-07.2007>

- Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., & Dombrowski, Y. (2019). Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells* 2019, Vol. 8, Page 1424, 8(11), 1424. <https://doi.org/10.3390/CELLS8111424>
- Li, S., Mattar, P., Dixit, R., Lawn, S. O., Wilkinson, G., Kinch, C., Eisenstat, D., Kurrasch, D. M., Chan, J. A., & Schuurmans, C. (2014). RAS/ERK Signaling Controls Proneural Genetic Programs in Cortical Development and Gliomagenesis. *Journal of Neuroscience*, 34(6), 2169–2190. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4077-13.2014>
- Marín, O., Anderson, S. A., & Rubenstein, J. L. R. (2000). Origin and Molecular Specification of Striatal Interneurons. *Journal of Neuroscience*, 20(16), 6063–6076. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-16-06063.2000>
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., & Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* 2009 10:1, 10(1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrn2495>
- Ory, D. S., Neugeborent, B. A., & Mulligan, R. C. (1996). A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21), 11400–11406. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.21.11400>
- Parras, C. M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D. J., & Guillemot, F. (2002). Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes & Development*, 16(3), 324. <https://doi.org/10.1101/GAD.940902>

ANEXO 2

Artigos científicos derivados do projeto principal e de projetos paralelos

Título: *Enhanced proliferation of oligodendrocyte progenitor cells following retrovirus mediated Achaete-scute complex-like 1 overexpression in the postnatal cerebral cortex in vivo*

Journal: *Frontiers in Neuroscience*

DOI: [10.3389/fnins.2022.919462](https://doi.org/10.3389/fnins.2022.919462)

Título: *Maintained anxiolytic effects of cannabidiol after treatment discontinuation in healthcare workers during the COVID-19 pandemic*

Journal: *Frontiers in Pharmacology*

DOI: [10.3389/fphar.2022.856846](https://doi.org/10.3389/fphar.2022.856846)

Título: *Spontaneous Activity of CB2 Receptors Attenuates Stress-Induced Behavioral and Neuroplastic Deficits in Male Mice*

Journal: *Frontiers in Pharmacology*

DOI: [10.3389/fphar.2021.805758](https://doi.org/10.3389/fphar.2021.805758)

Título: *Cannabidiol for COVID-19 Patients with Mild to Moderate Symptoms (CANDIDATE Study): A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial*

Journal: *Cannabis and Cannabinoid Research*

DOI: [10.1089/can.2021.0093](https://doi.org/10.1089/can.2021.0093)

Título: *Efficacy and Safety of Cannabidiol Plus Standard Care vs Standard Care Alone for the Treatment of Emotional Exhaustion and Burnout Among Frontline Health Care Workers During the COVID-19 Pandemic: A Randomized Clinical Trial*

Journal: *JAMA Network Open*

DOI: [10.1001/jamanetworkopen.2021.20603](https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.20603)

Título: *Zebrafish as a Translational Model: An Experimental Alternative to Study the Mechanisms Involved in Anosmia and Possible Neurodegenerative Aspects of COVID-19?*

Journal: *eNeuro*

DOI: [10.1523/ENEURO.0027-21.2021](https://doi.org/10.1523/ENEURO.0027-21.2021)

Título: *Glial Cells and Their Contribution to the Mechanisms of Action of Cannabidiol in Neuropsychiatric Disorders*

Journal: *Frontiers in Pharmacology*

DOI: [10.3389/fphar.2020.618065](https://doi.org/10.3389/fphar.2020.618065)

Título: *Cannabidiol as an add-on therapy to overcome the slow-onset and, possibly, resistance to antidepressant treatment: involvement of NAPE-PLD in the medial prefrontal cortex.*

Journal: *Pre-print disponível em BioRxiv*

DOI: [10.1101/2021.04.23.441143](https://doi.org/10.1101/2021.04.23.441143)