



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Farmácia
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**“EFEITOS INTERATIVOS DO CANABIDIOL SOBRE O
COMPORTAMENTO COGNITIVO, COMPORTAMENTO EMOCIONAL
E NEUROPLASTICIDADE HIPOCAMPAL DE CAMUNDONGOS”**

ANGÉLICA PUPIN SCHIAVON

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Rúbia Maria Weffort de Oliveira (UEM/DFT)

Co-orientador

Prof. Dr. Humberto Milani (UEM/DFT)

Maringá, 23 de maio de 2014.

Angélica Pupin Schiavon

**“EFEITOS INTERATIVOS DO CANABIDIOL SOBRE O
COMPORTAMENTO COGNITIVO, COMPORTAMENTO EMOCIONAL
E NEUROPLASTICIDADE HIPOCAMPAL DE CAMUNDONGOS”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração - Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira (UEM/DFT)

Co-orientador

Prof. Dr. Humberto Milani (UEM/DFT)

Maringá, 23 de maio de 2014.

Angélica Pupin Schiavon

**“EFEITOS INTERATIVOS DO CANABIDIOL SOBRE O
COMPORTAMENTO COGNITIVO, COMPORTAMENTO EMOCIONAL
E NEUROPLASTICIDADE HIPOCAMPAL DE CAMUNDONGOS”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração - Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____ / ____ / _____

BANCA EXAMINADORA:

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof. Dr. Roberto Andreatini
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Prof^a. Dr^a. Irinéia Paulina Baretta
Universidade Paranaense (UNIPAR)

Prof^a. Dr^a. Valéria Ferreira Garcez
Centro Universitário Cesumar (UniCesumar)

Prof^a. Dr^a. Jacqueline Nelisis Zanoni
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Agradecimentos

Certa vez, ouvi dizer: “E” e “se” são duas conjunções tão inofensivas quanto qualquer palavra. Mas, coloque-as juntas, lado a lado, e elas terão o poder de assombrá-la pelo resto de sua vida. E se... e se?”

Confesso que, juntas, foram mesmo capazes de me apavorar, pelo menos, o último ano do doutorado inteiro. Porém, aprendi também a olhar para elas de uma forma diferente, que quero dividir com vocês nas próximas linhas.

Em primeiro lugar, “e se” eu não estivesse aquele fim de tarde, em Ribeirão Preto, em um momento completamente informal, conversando com o Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães e minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira? Provavelmente, meu projeto de doutorado não teria se desenvolvido com camundongos e canabidiol. Entretanto, no momento em que o professor perguntou – “Por que vocês não testam canabidiol em camundongos isquêmicos?”, minha orientadora olhou para mim e perguntou – “E, por que não?” e, minha resposta, imediata, foi: “Quando podemos começar?”. Dessa forma, começou um trabalho com a incrível colaboração do Prof. Dr. Francisco, a quem agradeço imensamente toda a ajuda.

E, claro, à Prof^a. Dr^a. Rúbia, pela orientação neste trabalho, por toda sua atenção e esforço, que tornaram possível a realização deste, por seus valiosos ensinamentos científicos e paciência ao compartilhar comigo um pouco do seu conhecimento. Obrigada por ser mais que uma orientadora, por ser uma amiga, exemplo de vida, que pretendo seguir pessoal e profissionalmente.

Meu projeto de doutorado estava decidido. No entanto, “e se” meu esposo não tivesse concordado com a loucura que se tornaria minha vida, a partir de então? Com certeza não estaria aqui, hoje, completando mais esta etapa da minha vida científica. Portanto, a meu esposo, amigo, amante, companheiro e confidente, Fabrício Fregadolli, não sei se existem palavras capazes de expressar o quanto eu agradeço por ele sempre me auxiliar e me confortar com sua paciência e sabedoria, mesmo consciente de que, para eu concluir meu doutorado, teria de ficar sozinho em casa, semanalmente. Enfim, muito obrigada, sempre.

“E se” eu não tivesse escolhido continuar na UEM durante o doutorado? Sem dúvida, não teria conhecido tantos graduandos e pós-graduandos que, durante os quatro anos de convivência, me ensinaram as facilidades e as dificuldades de

relacionamento inter-pessoal no ambiente de trabalho. Assim, agradeço à doutoranda Vivian Taciany Bonassoli, por ser amiga e companheira, desde o mestrado. À futura biomédica Jéssica Mendes Bonato, pela ajuda inestimável, auxiliando, experimentalmente, durante os últimos três anos. À doutoranda Lígia Mendes Soares, pela colaboração no início deste projeto. A todos os pós-graduandos e graduandos do laboratório - Amanda, Cássia, Cristiano, Emilene, Gislene, Jacqueline, Janaína, Letícia, Lucas, Manuela, Marco Aurélio, Mariane, Mário, Mônica, Paulo, Rafael, Vanessa - que, direta ou indiretamente, contribuíram pela realização deste trabalho.

No mesmo ambiente de trabalho, sem optar pela UEM, eu não teria convivido com outro exemplo de dedicação, o Prof. Dr. Humberto Milani. Obrigada pela co-orientação neste trabalho, por me auxiliar desde o início de minha carreira científica, pela sua compreensão em relação às minhas limitações (principalmente as limitações estatísticas), por nunca ter negado ajuda e por me aceitar como amiga.

Ainda no Departamento de Farmacologia e Terapêutica, agradeço aos técnicos Marcos Alberto Trombelli, Carlos Eduardo de Oliveira, Jaílson Araújo Dantas e Admir Arantes, pelo apoio técnico, por seus valiosos ensinamentos e pela bela amizade. Também agradeço às auxiliares Solidalva Caruso Fernandes de Oliveira e Célia Regina Miranda, pelo apoio técnico e pela grande amizade.

Além disso, “e se” eu não tivesse escolhido o Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas? Também não teria conhecido as secretárias Francisca Helena Mesquita de Carvalho e Érika Gobi dos Santos. Obrigada pelo carinho, pela dedicação e trabalho exemplares e pela constante amizade.

Depois de tanto tempo, percebi que as respostas aos “e ses” eram sempre resultado das escolhas que eu fazia durante minha vida. Diante disso, como conclusão de mais uma escolha feita por mim, quero agradecer aos professores doutores Roberto Andreatini, Irinéia Paulina Baretta, Valéria Ferreira Garcez e Jacqueline Nelisis Zanoni que aceitaram, gentilmente, compor a banca de defesa desta tese.

Certamente, não poderia deixar de agradecer a meus pais Márcia Cristina Pupin Schiavon e Levi Schiavon, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu os trilhasse sem medo, que se doaram inteiros e, muitas vezes, renunciaram aos seus próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus. A eles, pais por

natureza, por opção e amor, não tenho palavras para agradecer todo o incentivo que tornaram possível a realização deste trabalho. Pois se eles não tivessem escolhido serem pais, eu não existiria.

Agradeço também a minha irmã Adriane Pupin Schiavon e meu cunhado Marcelo Candiani Bortoli, por sua constante amizade e companheirismo, auxiliando, sempre que podiam, a realização deste sonho.

Ainda em família, agradeço a meus sogros, Maria de Lourdes Marin Fregadolli e Luiz Artur Fregadolli, pela compreensão, carinho e incentivo constantes.

Finalmente, porém não menos importante, agradeço a Deus, porque sou resultado de Sua escolha. Agradeço por ter iluminado meu caminho, colocando nele as pessoas certas e por me guiar com todas as ferramentas necessárias ao meu desenvolvimento acadêmico e científico.

EPÍGRAFE

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

“Alguns homens veem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”

(Geroge Bernard Shaw)

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

(Benjamin Disraeli)

Lista de abreviaturas e siglas

%EBA = porcentagem de entrada nos braços abertos	FMR = fluxo migratório rostral
%TBA = porcentagem de tempo nos braços abertos	GABA = ácido gama-aminobutírico
2-AG = 2-araquidonoil-glicerol	GD = giro denteado
2VO = oclusão dos 2-vasos	GFAP = <i>glial fibrillary acidic protein</i>
5-HT = serotonina (5-hidróxi-triptamina)	ICGT = isquemia cerebral global e transitória
AA = ácido araquidônico	IF = isquemia focal
ABC = complexo avidina-biotina	IL-1β = interleucina-1 β
AC = adenilato ciclase	iNOS = forma induzida da enzima óxido nítrico sintase
ACh = acetilcolina	ISRS = inibidores seletivos de recaptção da serotonina
AD = antidepressivo	LCE = labirinto em cruz elevado
ADs = antidepressivos	MGL = lipase monoacilglicerol
AEA = araquidonoil-etanolamida (anandamida)	NA = noradrenalina
AVC = acidente vascular cerebral	NADA = N-araquidonoil-dopamina
BDNF = <i>brain-derived neurotrophic factor</i>	NMDA = N-metil-D-aspartato
BHE = barreira hemato-encefálica	OACM = oclusão da artéria cerebral média
BO = bulbo olfatório	OBACC = oclusão bilateral das artérias carótidas comuns
BrdU = 5-bromo-2'-deoxiuridina	PB = tampão fosfato
BSA = soro albumina bovino	PBS = tampão fosfato salina
CA = campo aberto	PFA = paraformaldeído
CBD = canabidiol	PPARγ = <i>proliferator-activated receptor-γ</i>
CCG = camada celular granular	PSA-NCAM = <i>polysialylated-neural cell adhesion</i>
CCL2 e CCL5 = quimiocinas 2 e 5 (do inglês, <i>chemokines</i>)	SCB = sistema canabinoide
CRF = fator de liberação de corticotropina	SNC = sistema nervoso central
DAB = 3,3,9-hidrocloro de diaminobenzidina	T = transportador de membrana de endocanabinoide
DCX = <i>doublecortin</i>	TC = tempo no centro
DH = doença de Huntington	TEPT = transtorno de estresse pós-traumático
DP = doença de Parkinson	TNF = teste do nado forçado
DTP = distância total percorrida	TOC = transtorno obsessivo compulsivo
EBF = entradas nos braços fechados	TQC = tempo no quadrante correto
EC = entradas no centro	TSC = teste de suspensão pela cauda
eCB = endocanabinoide	VCAM-1 = <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
eCBs = endocanabinoides	ZSG = zona subgranular
EEG = eletroencefalograma	ZSV = zona subventricular
EGF = <i>epidermal growth factor</i>	Δ^9-THC = Δ^9 -tetrahydrocannabinol
EM = esclerose múltipla	
EPM = erro padrão da média	
ERK = quinase regulada por sinal extracelular	
FAAH = <i>fatty acid amide hydrolase</i>	
FGF-2 = <i>fibroblast growth factor-2</i>	

Lista de figuras, esquemas e tabela

Figura 1: Ilustração das estruturas dos receptores CB1 e CB2	21
Figura 2: Estruturas químicas bidimensionais de endocanabinoides presentes em mamíferos	22
Figura 3: Possíveis vias de síntese dos eCBs AEA (A) e 2-AG (B)	23
Figura 4: Representação esquemática da ação endocanabinoide (eCB)	24
Figura 5: Geração de novos interneurônios no bulbo olfatório (BO) a partir de células-tronco neurais da zona subventricular (SVZ)	33
Figura 6: Geração de novos neurônios granulares no giro dentado (GD) do hipocampo a partir de células-tronco neuronais na zona subgranular (ZSG)	36
Figura 7: Esquema representativo do equipamento circular utilizado para o desenvolvimento do modelo experimental do labirinto aquático de Morris	50
Figura 8: Efeito do tratamento com canabidiol (CBD) sobre camundongos submetidos ao labirinto aquático de Morris (LAM)	59
Figura 9: Efeito do CBD sobre os prejuízos de aprendizagem causados pela oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC) em camundongos	60
Figura 10: Efeito do CBD na sobrevivência celular (coloração de Nissl) e na degeneração (histoquímica para Fluoro-Jade-C (FJC)) após OBACC em camundongos	62
Figura 11: Efeito do CBD sobre a proliferação celular na ZSG do GD hipocampal de camundongos submetidos à OBACC	64
Figura 12: Efeito do CBD sobre o número de neurônios <i>doublecortin</i> (DCX)-positivos na ZSG do GD hipocampal de camundongos submetidos à OBACC	65
Figura 13: Efeito do CBD sobre a expressão de células <i>glial fibrillary acidic protein</i> (GFAP)-positivas após OBACC em camundongos	66
Figura 14: Efeito do CBD sobre os processos <i>microtubule-associated protein 2</i> (MAP2)-positivos após OBACC em camundongos	67
Figura 15: Foto representativa da arena utilizada para o desenvolvimento do modelo experimental do campo aberto (CA)	81
Figura 16: Foto representativa do aparato utilizado para o desenvolvimento do modelo experimental do labirinto em cruz elevado (LCE)	82
Figura 17: Foto representativa do modelo experimental do teste de suspensão pela cauda (TSC)	83

Figura 18: Efeito do tratamento agudo com CBD em camundongos submetidos ao campo aberto (CA)	87
Figura 19: Efeito do tratamento agudo com CBD em camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE)	89
Figura 20: Efeito do tratamento agudo com CBD em camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC)	90
Figura 21: Efeito do tratamento repetido com CBD em camundongos submetidos ao CA	91
Figura 22: Efeito do tratamento repetido com CBD em camundongos submetidos ao LCE	92
Figura 23: Efeito do tratamento repetido com CBD em camundongos submetidos ao TSC	93
Figura 24: Efeito do tratamento repetido com CBD sobre a proliferação celular na ZSG do GD do hipocampo e na ZSV de camundongos	95
Figura 25: Efeito do tratamento repetido com CBD sobre o número de neurônios DCX-positivos na ZSG hipocampal e na ZSV de camundongos	97
Figura 26: Efeito do tratamento repetido com CBD sobre a expressão de células GFAP-positivas em camundongos	98
Figura 27: Avaliação da sobrevivência celular na ZSG hipocampal e na ZSV 11 ou 21 dias após o término do tratamento repetido com CBD em camundongos	100
Figura 28: Efeito do CBD sobre o número de neurônios DCX-positivos na ZSG hipocampal e na ZSV 11 ou 21 dias após o término do tratamento repetido com CBD em camundongos	102
Figura 29: Efeito do CBD sobre a expressão de células GFAP-positivas no hipocampo de camundongos 11 dias após o término do tratamento repetido com CBD	103
Esquema 1: Delineamento experimental	49
Esquema 2: Delineamento experimental	81
Tabela 1: Descrição dos marcadores histológico, histoquímico e imuno-histoquímicos utilizados e suas respectivas funções	46
Tabela 2: Taxa de sobrevivência de camundongos submetidos à oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC)	57
Tabela 3: Resumo dos resultados obtidos no capítulo 1	68
Tabela 4: Resumo dos resultados obtidos no capítulo 2	104

EFEITOS INTERATIVOS DO CANABIDIOL SOBRE O COMPORTAMENTO COGNITIVO, COMPORTAMENTO EMOCIONAL E NEUROPLASTICIDADE HIPOCAMPAL DE CAMUNDONGOS

Angélica Pupin Schiavon

Resumo: O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos interativos do canabidiol (CBD) sobre o comportamento cognitivo, comportamento emocional e neuroplasticidade hipocampal de camundongos. No primeiro capítulo, foi investigado se o CBD protege contra a neurodegeneração hipocampal e prejuízos cognitivos induzidos pela isquemia cerebral em camundongos adultos. Camundongos foram submetidos a um modelo de oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC) e testados no labirinto aquático de Morris (LAM) após 7 dias. CBD (3, 10, e 30 mg/Kg) foi administrado, por via intraperitoneal (*i.p.*), 30 min antes, 3, 24, e 48 h após a OBACC. Após o teste comportamental, os cérebros foram removidos e processados para avaliar a sobrevivência das células do hipocampo e a degeneração utilizando a coloração de Nissl e a histoquímica para FluoroJade-C (FJC), respectivamente. Alterações da proliferação celular e da neurogênese foram analisadas pela imuno-histoquímica para Ki-67 e *doublecortin* (DCX), respectivamente. Resposta astrogliar e integridade dendrítica dos neurônios foram examinadas usando imuno-histoquímica para *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) e *microtubule-associated protein 2* (MAP2), respectivamente. CBD (3-30 mg/Kg) melhorou o desempenho da aprendizagem espacial em camundongos isquêmicos. Os resultados da coloração de Nissl e a histoquímica para FJC revelaram uma diminuição na neurodegeneração do hipocampo após tratamento com CBD (10 e 30 mg/Kg). O tratamento com CBD promoveu, de forma dual, na proliferação celular e na neurogênese, aumentando e diminuindo o número de células Ki-67- e DCX-positivas na zona subgranular (ZSG) do GD hipocampal de animais isquêmicos. A imunorreatividade para GFAP apresentou-se diminuída em ratos isquêmicos tratados com CBD (30 mg/Kg). O tratamento com CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg) não alterou as densidades de superfície dos processos MAP2-positivos no subcampo CA1 do hipocampo de camundongos isquêmicos. Portanto, esses resultados sugerem um efeito protetor do CBD sobre a morte neuronal induzida por isquemia e indicam que o CBD pode exercer efeitos terapêuticos benéficos após isquemia cerebral. No segundo capítulo, investigaram-se os efeitos da administração aguda ou repetida de CBD sobre o comportamento emocional de camundongos não estressados e sua relação com a neurogênese. Os camundongos receberam, por via *i.p.*, CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg) ou veículo, em dose aguda, uma hora antes dos testes comportamentais. Para a avaliação dos efeitos repetidos do CBD, camundongos receberam CBD (3 ou 30 mg/Kg) ou veículo, via *i.p.*, durante 15 dias consecutivos. Vinte e quatro horas, 11 ou 21 dias após o término do tratamento repetido com CBD, os animais foram sacrificados e tiveram seus cérebros retirados para posteriores análises imuno-histoquímicas para Ki-67, BrdU, DCX e GFAP. A administração aguda de CBD resultou em efeito tipo-ansiolítico no campo aberto (CA) e no labirinto em cruz elevado (LCE) bem como efeito tipo-antidepressivo no teste de suspensão pela cauda (TSC), sem que houvesse alteração na atividade locomotora geral dos animais. Com a administração repetida do CBD por 15 dias, no entanto, apenas o efeito tipo-antidepressivo se manteve. Vinte e quatro horas após o término do tratamento repetido com CBD (3 mg/Kg), observamos um aumento da proliferação celular nas ZSG e zona subventricular (ZSV; Ki-67 e BrdU), enquanto que um aumento significativo de neurônios jovens (DCX-positivos) foram detectados apenas na ZSG, quando comparados ao grupo veículo. Onze dias após o término do tratamento com CBD, um aumento significativo no número de células BrdU- e DCX-positivas foi detectado na ZSG do hipocampo. Neste local, a administração repetida de CBD 30 mg/Kg produziu um efeito supressor sobre a neurogênese hipocampal (DCX). Nenhuma diferença significativa entre os grupos tratados com CBD ou salina foi observada sobre a sobrevivência (BrdU) ou neurogênese (DCX) 21 dias após o término do tratamento com CBD.

Palavras-chaves: canabidiol, labirinto aquático de Morris, oclusão bilateral das artérias carótidas comuns, comportamento emocional, hipocampo, neurogênese, camundongos

INTERACTIVE EFFECTS OF CANNABIDIOL ON COGNITIVE BEHAVIOR, EMOTIONAL BEHAVIOR AND HIPPOCAMPAL NEUROPLASTICITY IN MICE

Angélica Pupin Schiavon

Abstract: The aim of this study was to evaluate the interactive effects of cannabidiol (CBD) on cognitive behavior, emotional behavior and hippocampal neuroplasticity in mice. In the first chapter, we investigated whether CBD protects against hippocampal neurodegeneration and cognitive prejuízos induced by cerebral ischemia in adult mice. They were submitted to a bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) model and tested in the Morris water maze (MWM) 7 days later. CBD (3, 10, and 30 mg/Kg) was administered 30 min before, 3, 24, and 48 h after BCCAO. After behavioral testing, the brains were removed and processed to evaluate hippocampal cell survival and degeneration using Nissl staining and FluoroJade C (FJC) histochemistry, respectively. Changes in cellular proliferation and neurogenesis were analyzed by the Ki-67 and doublecortin (DCX) immunostainings, respectively. Astroglial response and dendritic integrity of neurons were examined by the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and microtubule-associated protein 2 (MAP2) immunostainings, respectively. CBD (3–30 mg/kg) improved spatial learning performance in BCCAO mice. The Nissl and FJC staining results showed a decrease in hippocampal neurodegeneration after CBD (10 and 30 mg/kg) treatment. CBD repeated treatment showed a dual effect in cell proliferation and neurogenesis, by increasing and decreasing the number of Ki-67- and DCX-positive cells at the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus (DG) in ischemic animals. GFAP immunoreactivity was also decreased in ischemic mice treated with CBD (30 mg/kg). These findings suggest a protective effect of CBD on neuronal death induced by ischemia and indicate that CBD might exert beneficial therapeutic effects in brain ischemia. In the second chapter, we investigated the effects of acute or repeated CBD administration on unstressed mice emotional behavior and its neurogenesis relation. Mice received CBD (3, 10 or 30 mg/Kg) or vehicle daily intraperitoneally (*i.p.*) once one hour before behavioral testing. To evaluate the effects of repeated CBD effects, mice received CBD (3 or 30 mg/Kg) or vehicle, (*i.p.*), during 15 consecutive days. Twenty-four hours, 11 or 21 days after the end of repeated CBD treatment, the animals were sacrificed and had their brains removed for subsequent Ki-67, BrdU, DCX and GFAP immunostainings analysis. Acute administration of CBD revealed an anxiolytic-like effect in the elevated plus maze (EPM) and open field (OF) models as well as antidepressant-like effect in tail suspension test (TST). None changes in animals locomotor activity was observed. CBD repeated treatment, however, showed only the antidepressant-like effect. Twenty-four hours after the CBD (3 mg/Kg) repeated treatment demonstrated an increase in cell proliferation at the SVZ and SGZ (BrdU- and Ki-67-positive cells), whereas, a significant increase of DCX young neurons were detected only in SGZ. Eleven days after the CBD repeated treatment, a significant increase of BrdU- and DCX-positive cells were detected in the hippocampal SGZ. CBD 30 mg/Kg repeated administration produced a suppressive effect on hippocampal neurogenesis (DCX). Finally, no significant differences were observed on survival (BrdU) and neurogenesis (DCX) 21 days after the end of CBD repeated treatment.

Keywords: cannabidiol, Morris water maze, bilateral common carotid artery occlusion, emotional behavior, hippocampus, neurogenesis, mice

SUMÁRIO

1. Introdução geral	17
1.1. <i>Cannabis</i>	17
1.2. O sistema canabinoide (SCB)	19
1.3. Canabidiol (CBD)	25
1.4. CBD e comportamento emocional	25
1.5. Outros efeitos importantes do CBD	28
1.6. Neurogênese	30
1.6.1. Fases da neurogênese em animais adultos	31
1.6.1.1. Neurogênese a partir da ZSV	31
1.6.1.2. Neurogênese a partir da ZSG	33
1.6.2. Fatores que regulam a neurogênese no cérebro adulto	37
1.6.3. Antidepressivos e neurogênese	38
1.6.4. Isquemia cerebral e neurogênese	39
1.7. Justificativa	41
2. <u>Capítulo 1</u> - Efeitos protetores do canabidiol contra a morte celular hipocampal e prejuízos cognitivos induzidos por OBACC em camundongos	42
2.1. Introdução	43
2.2. Objetivos	47
2.2.1. Geral	47
2.2.2. Específicos	47
2.3. Metodologia	48
2.3.1. Animais	48
2.3.2. Procedimento experimental	48
2.3.2.1. Cirurgia	49
2.3.2.2. O labirinto aquático de Morris (LAM)	50
2.3.2.3. Análises histológica, histoquímica e imunohistoquímica	51
2.3.2.3.1. Coloração de Nissl	52
2.3.2.3.2. Histoquímica para FJC	52
2.3.2.3.3. Imuno-histoquímica para Ki-67, DCX, GFAP e MAP2	52
2.3.3. Análise quantitativa	54

2.3.3.1. Células coradas pelo método de Nissl	54
2.3.3.2. Células FJC-positivas	54
2.3.3.3. Células Ki-67 e DCX-positivas	54
2.3.3.4. Células GFAP-positivas	55
2.3.3.5. Células MAP2-positivas	55
2.3.4. Análise estatística	56
2.3.4.1. Análise comportamental	56
2.3.4.2. Quantificação das células Nissl, Ki-67, DCX, GFAP e MAP2-positivas	56
2.4 Resultados	57
2.4.1. Sobrevivência	57
2.4.2. Labirinto aquático de Morris	58
2.4.3. Coloração de Nissl	61
2.4.4. Histoquímica para FJC	61
2.4.5. Imuno-histoquímica	63
2.4.6. Ki-67	63
2.4.7. DCX	63
2.4.8. GFAP	66
2.4.9. MAP2	67
2.5. Discussão	69
2.6. Conclusão	73
3. <u>Capítulo 2</u> - Efeito do tratamento repetido com canabidiol sobre o comportamento emocional de camundongos: relação com a neurogênese hipocampal	74
3.1. Introdução	75
3.2. Objetivos	78
3.2.1. Geral	78
3.2.2. Específicos	78
3.3. Metodologia	79
3.3.1. Animais	79
3.3.2. Procedimento experimental	79
3.3.2.1. Experimento I – Efeito da administração aguda de CBD	79

3.3.2.2. Experimento II – Efeito da administração repetida de CBD	80
3.3.2.2.1. Avaliação da proliferação após término do tratamento repetido com CBD	80
3.3.2.2.2. Avaliação da sobrevivência e neurogênese 11 e 21 dias após o tratamento repetido com CBD	80
3.3.3. Avaliação comportamental	81
3.3.3.1. Campo aberto (CA)	81
3.3.3.2. Labirinto em cruz elevado (LCE)	82
3.3.3.3. Teste de suspensão pela cauda (TSC)	83
3.3.4. Imuno-histoquímica para Ki-67, BrdU, DCX e GFAP	84
3.3.4.1. Análise quantitativa das células Ki-67-, BrdU- e DCX-positivas	85
3.3.4.2. Análise quantitativa das células GFAP-positivas	86
3.3.5. Análise estatística	86
3.4. Resultados	87
3.4.1. Experimento I – Efeito da administração aguda de CBD	87
3.4.1.1. Campo aberto	87
3.4.1.2. Labirinto em cruz elevado	88
3.4.1.3. Teste de suspensão pela cauda	88
3.4.2. Experimento II – Efeito da administração repetida de CBD	91
3.4.2.1. Campo aberto	91
3.4.2.2. Labirinto em cruz elevado	92
3.4.2.3. Teste de suspensão pela cauda	93
3.4.2.4. Imuno-histoquímica	93
3.4.2.4.1. Avaliação da proliferação após término do tratamento repetido com CBD	94
3.4.2.4.2. Avaliação da sobrevivência e neurogênese 11 e 21 dias após o tratamento repetido com CBD	99
3.5. Discussão	105
3.6. Conclusão	109
4. Considerações finais	110
5. Referências	113
6. Anexo	131

1. Introdução geral

1.1. *Cannabis*

A *Cannabis sativa* (*Cannabis*) está entre as plantas mais antigas cultivadas pelo homem. Ao longo da história e em diferentes culturas, tem sido utilizada como fornecedora de fibras, como alimento, com propósitos religiosos ou recreativos e como medicamento. Seu uso tem sido estimulado ou condenado, dependendo da época, do contexto ou do segmento da população. As primeiras evidências do uso da *Cannabis* foram encontradas na China há 4000 anos a.C., onde achados arqueológicos indicam que esta planta era cultivada para a obtenção de fibras, obtidas do caule da *Cannabis*, com as quais os chineses fabricavam fios, cordas, tecidos e até papel (Zuardi, 2008).

O uso da *Cannabis* como medicamento, foi relatado no primeiro século da era cristã. As indicações para o uso da *Cannabis* incluíam: dores reumáticas, constipação intestinal, desordens do aparelho reprodutor feminino, malária, além de ser utilizado como anestésico, como um composto feito com vinho (Li, Lin, 1974 apud Zuardi, 2008).

A disseminação do uso da *Cannabis* para a Ásia central e ocidental e para a Índia se deu, provavelmente, pela contribuição das tribos nômades do norte da China, que utilizavam a planta em rituais religiosos. Na Índia, o uso da *Cannabis* teve grande difusão, tanto como droga recreativa, como medicamentosa. Após a chegada da planta à Índia, ela passou a fazer parte de inúmeros rituais religiosos nessa região. Como uso recreativo, seus efeitos psicoativos eram bem conhecidos, possivelmente em decorrência da forma como era preparada para consumo, que incluía, pelo menos, três tipos de preparações: (i) o tipo mais fraco, o chamado *Bhang*, constituído das folhas secas, das quais se separam, cuidadosamente, as flores, (ii) um tipo mais forte, conhecido como *Ganja*, preparado com as flores da planta feminina e (iii) o mais potente de todos, o *Charas*, constituído, exclusivamente, da resina que recobre as flores femininas (Touwn, 1981 apud Zuardi, 2008).

Essas formas de preparação da *Cannabis* garantiam a presença de canabinoides ativos. A planta apresenta pelos secretores, no topo dos quais existe

uma glândula com grande quantidade de canabinoides ativos. Esses pelos secretores localizam-se, em maior quantidade, nas folhas do terço superior das plantas e, principalmente, nas flores das plantas femininas. O rompimento das glândulas, localizadas nos pelos secretores, liberam os canabinoides ativos, que constituem a resina que as recobre (Paris, Nahas, 1984 apud Zuardi, 2008).

O início do uso médico da *Cannabis*, na Índia, confunde-se com o uso religioso e data de mais de 1000 anos a.C. A planta foi utilizada numa gama muito ampla de condições clínicas, entre outras funções, como: analgésico, anticolvulsivante, anestésico, anti-inflamatório, antibiótico, antiparasitário, antiespasmódico, digestivo, estimulante do apetite, diurético, antitussígeno e expectorante (Mikuriya, 1969 apud Zuardi, 2008).

Na América do Sul, os primeiros registros de uso da *Cannabis*, datam do início do século XV. No Brasil, o uso recreativo da planta foi relativamente comum entre os negros, na zona rural do Nordeste do país, desde o século XVI, que se reuniam nos fins de semana para consumirem a droga em grupos. Esse uso estendeu-se, posteriormente, para pescadores do rio São Francisco e, pelo mar, para as cidades litorâneas. No início no século XX, o uso da *Cannabis*, no Brasil continuava restrito a pequenos grupos de baixo nível sócio-econômico, sendo conhecida como o “ópio dos pobres” (Pinho, 1975 apud Zuardi, 2008).

A partir dos anos 1960, o uso recreativo da *Cannabis* alastrou-se, rapidamente, nas faixas mais jovens da população, em todo mundo Ocidental. Nessa mesma época, foi identificada a estrutura química do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), por Gaoni e Mechoulam (1964 apud Zuardi, 2008), como sendo o principal ingrediente psicoativo desta erva, ocorrendo, então, uma grande proliferação de trabalhos sobre os constituintes ativos da *Cannabis*. Esse crescimento espantoso no consumo da planta, aumentando sua importância social, ao lado do melhor conhecimento de sua composição química, tornando possível a obtenção de seus constituintes em forma pura, contribuíram para que o interesse científico pela *Cannabis* aumentasse enormemente a partir de 1965.

Com o crescimento do interesse científico pela *Cannabis*, seus efeitos terapêuticos voltaram a ser estudados, agora com metodologias mais acuradas. Nesse sentido, encontram-se, em diferentes fases de estudo, os efeitos terapêuticos

do Δ^9 -THC, em condições tais como: epilepsia, insônia, vômitos, espasmos, dor, glaucoma, asma, inapetência, Síndrome de Tourette. Dentre essas indicações terapêuticas do Δ^9 -THC, são consideradas como praticamente comprovadas, as indicações como: anti-emético, estimulante do apetite, analgésico e para tratar sintomas da esclerose múltipla (EM) (Carlini, 2004).

Outros canabinoides também vêm sendo investigados, como o canabidiol (CBD), que apresenta evidências de efeitos terapêuticos na epilepsia, insônia, ansiedade, inflamações, danos cerebrais (como neuroprotetor) e psicoses (Mechoulam et al., 2002). No início de 2005, um grande laboratório farmacêutico multinacional conseguiu aprovar, no Canadá, a liberação para comercializar uma medicação, contendo Δ^9 -THC e CBD, para alívio da dor neuropática em pacientes com esclerose múltipla (EM) (Zuardi, 2008). Iniciou-se, assim, um novo ciclo de utilização de derivados da *Cannabis* como medicamento, bem mais consistente do que ocorreu no passado. Os compostos químicos derivados dessa planta têm sua estrutura conhecida e seus mecanismos de ação no sistema nervoso central (SNC) estão sendo elucidados. Com a descoberta de um sistema canabinoide endógeno, a eficácia e a segurança dos tratamentos estão sendo comprovados cientificamente.

1.2. O sistema canabinoide (SCB)

O SCB compreende os receptores, os agonistas endógenos e o aparato bioquímico relacionado, responsável por sintetizar essas substâncias e finalizar suas ações.

Antes de identificar todos os componentes citados, é importante lembrar que os compostos da *Cannabis sativa* só foram isolados e identificados, pela primeira vez, na metade do século passado. Atualmente, sabe-se que a *Cannabis sativa* contém mais de 60 substâncias, tais como o CBD, o canabinol, o canabigerol e o canabicromeno, denominados fitocannabinoides (Mechoulam, 1970 apud Zuardi, 2008). Uma vez que os fitocannabinóides apresentam natureza lipídica, isto resultou em obstáculo significativo às experiências químicas, o que poderia explicar porque a descoberta destes compostos ocorreu tardiamente em comparação com outros compostos naturais, como a morfina, que foi isolada do ópio no século XIX.

O caráter lipofílico dos fitocanabinóides também impôs dificuldades técnicas para seu estudo farmacológico. Tanto que, na década de 1970, pensava-se que o principal mecanismo de ação dos canabinoides consistia na dispersão dessas moléculas na bicamada lipídica da membrana celular, por um mecanismo análogo ao que era proposto para os anestésicos gerais. Embora fosse reconhecida “certa especificidade” nas ações dessas moléculas, não se acreditava que elas poderiam se ligar a sítios específicos nas células (Paton, 1975 apud Zuardi, 2008). No decorrer da década de 1980, tornou-se evidente que a hipótese dos efeitos na membrana não explicava adequadamente a farmacologia dos canabinoides. Em 1984, Howlett e Fleming demonstraram que o Δ^9 -THC era capaz de inibir a enzima adenilato ciclase (AC) em concentrações que se correlacionavam, significativamente, com as doses utilizadas em modelos animais. Sendo a AC parte de um dos sistemas de transdução de sinal para receptores acoplados à proteína G, esses dados motivaram a busca de compostos com alta afinidade para supostos sítios de ligação dos canabinoides. A partir de evidências como essas, uma técnica fundamental para que se pudesse sugerir a existência de receptores era a de ligantes marcados radioativamente (*binding*) (Moreira, 2008). Para os canabinoides, esses experimentos foram realizados somente no final dos anos 80. Dessa forma, iniciaram-se os experimentos que identificaram os sítios específicos de acoplamento no cérebro dos mamíferos (Devane et al., 1988), seguidos por isolamento e caracterização das substâncias ligantes endógenas, denominadas endocanabinoides (eCBs) (Devane et al., 1992).

Os receptores para eCBs foram nomeados, de acordo com sua ordem de descoberta, como receptores CB₁ e CB₂ (Figura 1). Ambos pertencem à superfamília dos receptores com sete domínios transmembrana, acoplados à proteína G. Dentro do SNC, o CB₁ está, primariamente, localizado nos terminais nervosos pré-sinápticos e é responsável pela maioria dos efeitos neurocomportamentais dos canabinoides. O CB₂, ao contrário, não é amplamente distribuído no encéfalo, mediando efeitos periféricos, mas é o principal receptor de canabinoide presente no sistema imune (Saito et al., 2010).

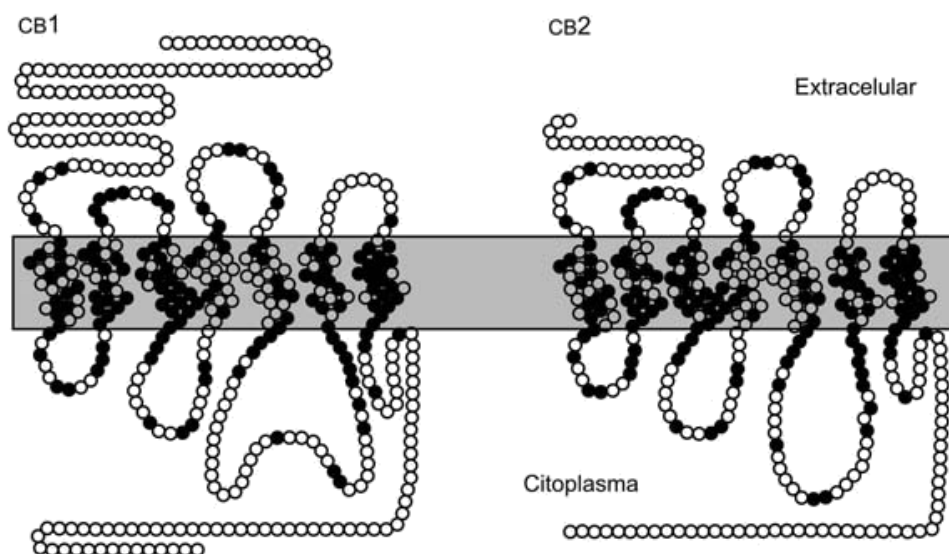


Figura 1: Ilustração das estruturas dos receptores CB1 e CB2. Fonte: Maldonado et al., 2006, modificado.

A demonstração da existência de receptores para os canabinoides desencadeou uma intensa busca pelo ligante endógeno. Em 1992, Devane e colaboradores publicaram a primeira proposta de um ligante endógeno para os receptores canabinoides, a etanolamida do ácido araquidônico (AA), ou araquidonoil-etanolamida (AEA), que recebeu a denominação de anandamida, do sânscrito *ananda*, que significa felicidade serena, bem-aventurança ou felicidade perfeita (Moreira, 2008). Confirmada a proposta da AEA, o grupo científico de Mechoulam identificou, em 1995, o segundo eCB, o 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995). Outros possíveis eCBs, sugeridos mais recentemente por De Petrocellis e Di Marzo (2009), incluem a N-araquidonoil-dopamina (NADA), o 2-araquidonoil-glicerol éter (noladina) e a O-araquidonoil-etanolamina (virodamina). Nota-se que todos eles são éteres, ésteres ou amidas do AA (Figura 2).

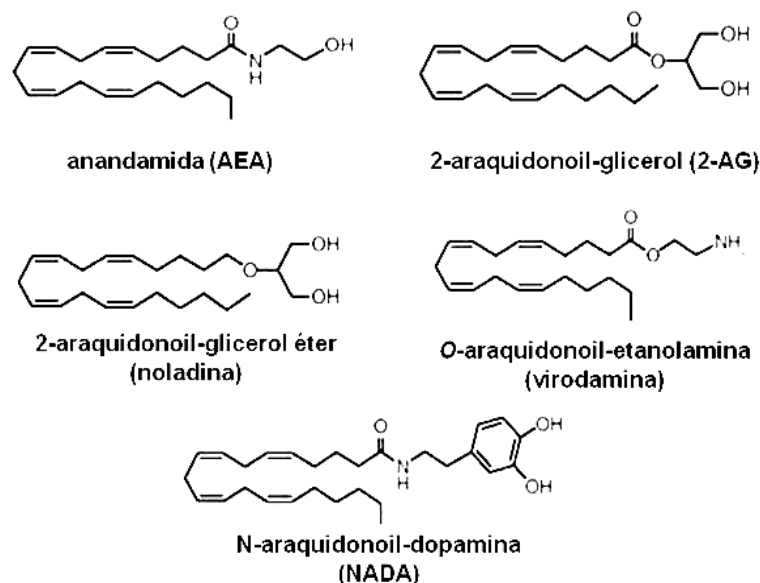


Figura 2: Estruturas químicas bidimensionais de endocanabinoides presentes em mamíferos. Fonte: Rang et al., 2011.

A descoberta dos eCBs gerou uma nova pergunta: como seriam sintetizados e inativados esses eCBs? A resposta começou a surgir na Itália, com o grupo de pesquisadores de Di Marzo (1994), quando foi sugerido que a AEA fosse sintetizada a partir de fosfolídeos de membrana. Além disso, esse mesmo grupo de pesquisadores propôs que a transferência das informações fosse realizada dos terminais pós aos pré-sinápticos, de uma forma retrógrada. Dessa forma, os autores sugeriram que os eCBs fossem sintetizados sob demanda e não armazenados em vesículas. A partir da confirmação dessa característica, tornou-se evidente que os eCBs são desprovidos de algumas características que definem os neurotransmissores clássicos, ou seja, estes critérios tornam os eCBs mensageiros atípicos.

Piomelli (2003), dando continuidade a esses estudos, confirmou que as sínteses dos eCBs ocorrem nos neurônios pós-sinápticos após o influxo de cálcio e a subsequente ativação das fosfolipases, que convertem os fosfolídeos em eCBs. É provável que a AEA origine-se da hidrólise do fosfolípido N-araquidonoil-fosfatidil-etanolamina, através de um processo catalisado por uma enzima da família da fosfolipase D. O 2-AG pode ser sintetizado por vários mecanismos, o que explica o fato de se encontrar no sistema nervoso em concentração bem maior que a AEA.

Um dos possíveis mecanismos é a quebra de fosfolipídeos (como o fosfatidil-inositol) por meio da fosfolipase C, seguida de des-acilação catalisada pela diacilglicerol lipase (Figura 3) (Moreira, 2008).

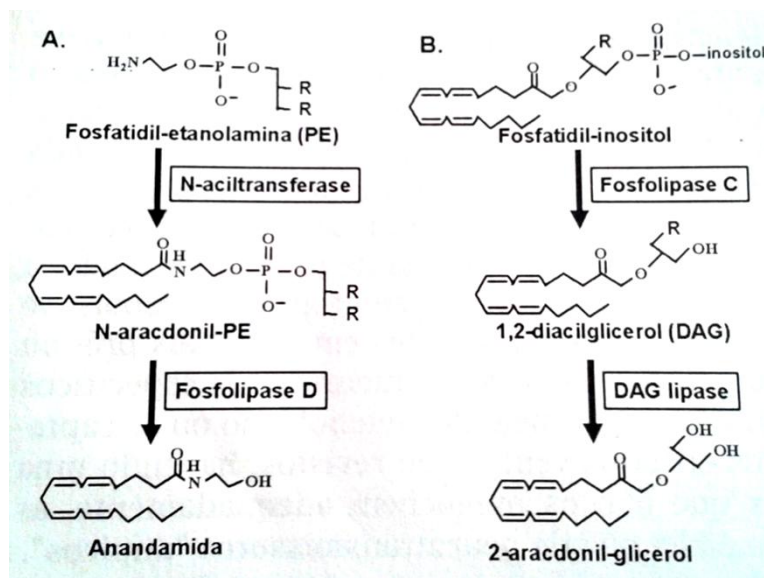


Figura 3: Possíveis vias de síntese dos endocanabinoides (eCBs) anandamida (AEA) (A) e 2-aracidonil-glicerol (2-AG) (B). Fonte: Moreira, 2008.

Os eCBs parecem atingir, imediatamente, a fenda sináptica, por meio da difusão livre ou assistida e se acoplam aos receptores CB_1 pré-sinápticos (Egertová et al., 1998).

Por meio de uma rede complexa de processos de sinalização intracelular, a ativação dos receptores CB_1 resulta, finalmente, em uma diminuição no influxo de cálcio nos terminais axônicos e, dessa forma, na diminuição da liberação de neurotransmissores clássicos, como o ácido gama-aminobutírico (GABA) e o glutamato. Ademais, da ativação do CB_1 , a ativação dos receptores potenciais transitórios de vaniloide tipo-1 (TRPV1) pela AEA leva à despolarização aumentada das membranas pós-sinápticas. Portanto, a ativação do CB_1 e do TRPV1 parece exercer efeitos opostos (Saito et al., 2010).

Quanto ao término da ação, alguns neurotransmissores clássicos são metabolizados na fenda sináptica, a exemplo da acetilcolina (ACh). Outros são recaptados e predominantemente metabolizados no interior nos neurônios, como a noradrenalina (NA). Para os eCBs, esses aspectos vêm mostrando-se bastante

controversos. Todas as evidências indicam que a AEA seja metabolizada após a sua recaptação nos neurônios, por uma hidrolase de amidas de ácidos graxos, a FAAH, do inglês *fatty acid amide hydrolase*. Além da FAAH, a AEA também pode sofrer a ação de enzimas que metabolizam o AA, como a ciclo-oxigenase e a lipo-oxigenase (Moreira, 2008).

Apesar de alguns aspectos ainda não elucidados, a etapa do metabolismo da AEA está mais bem compreendida do que a sua entrada para os neurônios. Uma das explicações para a entrada dos eCBs é que, por serem lipossolúveis, difundem-se através das membranas plasmáticas a favor do gradiente de concentração. Há também evidências de um mecanismo de transporte facilitado, saturável, dependente da temperatura, para a AEA e o 2-AG, denominado “transportador de membrana de eCB (T)”. Após a internalização, os eCBs sofrem, então, hidrólise enzimática. Como já citado anteriormente, a FAAH é responsável pela hidrólise da AEA, convertendo-a em AA mais etanolamina (EtNH₂). Já a principal enzima responsável pela hidrólise do 2-AG é a monoacilglicerol lipase (MGL), convertendo-o em AA mais glicerol (Figura 4) (Rang et al., 2011).

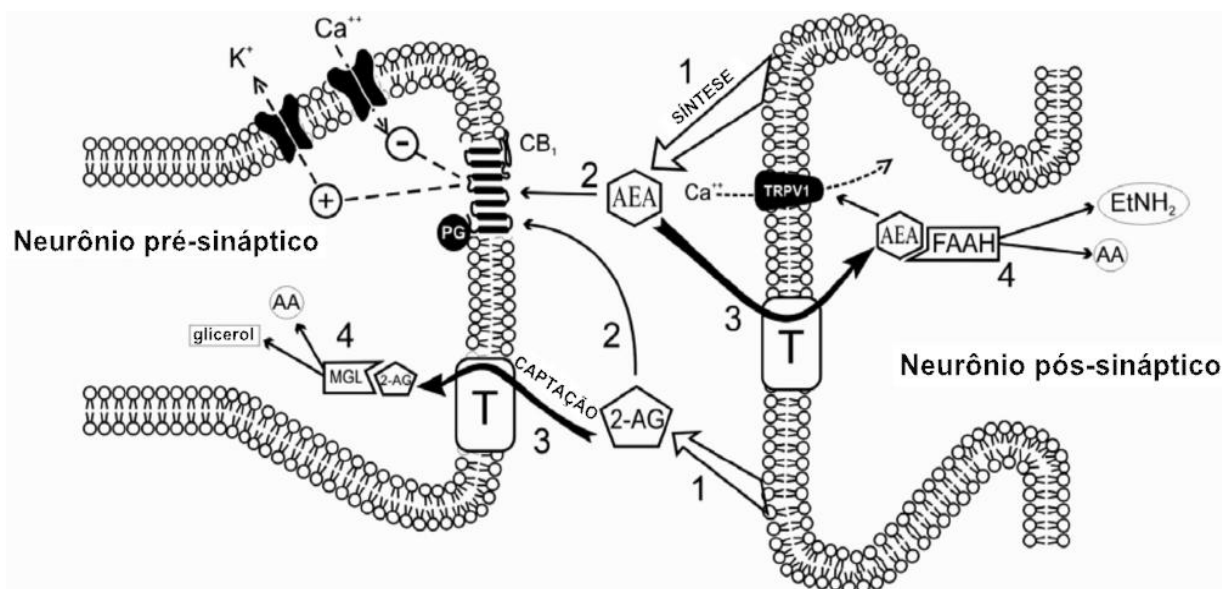


Figura 4: Representação esquemática da ação endocanabinoide (eCB). FAAH: *fatty acid amide hydrolase*; TRPV1: receptor potencial transitório de vaniloide tipo-1; AEA: anandamida; 2-AG: 2-araquidonoil-glicerol; MGL: monoacilglicerol lipase; AA: ácido araquidônico; T: transportador de membrana de eCB; EtNH₂: etanolamina; PG: proteína G. Fonte: Saito et al., 2010.

1.3. Canabidiol (CBD)

Embora as quantidades relativas de fitocanabinoides em preparações de *Cannabis* sejam altamente variáveis, a concentração de CBD constitui até 40% de seu extrato (Potter et al., 2008).

O perfil farmacológico do CBD tem sido investigado, extensivamente, *in vivo* e *in vitro*, provando que, mesmo uma ampla gama de concentrações, o mesmo não apresenta efeitos tóxicos. Em 1981, Rosenkrantz et al. e colaboradores relataram que uma dose letal média (DL₅₀) de CBD (212 mg/Kg), estipulada para ratos, apresentou uma baixa toxicidade em macacos *rhesus*. Além disso, a administração aguda desse canabinoide, por diferentes vias, não induziu efeitos tóxicos significativos em seres humanos (Bergamaschi et al., 2011). Mais ainda, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que o CBD é bem tolerável até doses de 1500 mg/dia, considerando, ainda, humanos. Diante disso, está claro que o CBD é uma droga considerada segura.

É sabido que o CBD não causa efeitos psicomiméticos, como os gerados pelo Δ^9 -THC, por exemplo. Ao contrário, ele é capaz de antagonizar esses efeitos, como sugerido, primeiramente, em 1974, por Karniol e colaboradores e, mais tarde, confirmado, em estudo com voluntários saudáveis, por Bhattacharyya e colaboradores (2010).

1.4. CBD e comportamento emocional

Atualmente, está claro que o CBD tem potencial terapêutico em uma ampla gama de distúrbios psiquiátricos e não-psiquiátricos, como a ansiedade, a depressão e a psicose (Campos et al., 2012).

Os primeiros relatos que descreveram os efeitos do CBD em modelos animais de ansiedade foram inconsistentes. Silveira Filho e Tufik (1981) não encontraram efeitos do CBD (100 mg/Kg), administrado em dose única, em ratos testados no modelo clássico de ansiedade conhecido como conflito Geller-Seifter. Por outro lado, Zuardi e Karniol (1983) descreveram que uma dose muito menor do CBD (10 mg/Kg) atenuava respostas emocionais condicionadas. Esses resultados contraditórios aparentes foram, posteriormente, explicados por Guimarães e colaboradores (1990). Esses pesquisadores, usando um modelo etológico de ansiedade, o labirinto em

cruz elevado (LCE), mostraram que o CBD promovia efeitos ansiolíticos típicos em ratos, com uma curva dose-resposta em forma de “U” invertido, em que as menores e as maiores doses eram ineficazes.

Reiterando suas propriedades tipo-ansiolíticas, o CBD diminuiu as respostas defensivas evocadas por ratos em exposição a um predador (Campos, Guimarães, 2009), um modelo que simula o pânico e o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT). Além disso, em camundongos, CBD reduziu o comportamento de esconder esferas, mostrando-se, assim, potencial terapêutico no transtorno obsessivo compulsivo (TOC) (Casarotto et al., 2010).

De acordo com os resultados obtidos em modelos animais, estudos clínicos confirmaram que o CBD tem propriedades ansiolíticas. Após o primeiro relato, indicando que o CBD bloqueava os efeitos ansiogênicos de altas doses do Δ^9 -THC (Zuardi et al., 1982), foi demonstrado, que o CBD também reduzia a ansiedade de falar em público em voluntários saudáveis (Zuardi et al., 1993; Crippa et al., 2004). Mais recentemente, Bergamaschi e colaboradores (2011) mostraram que o CBD (600 mg, via oral) diminuiu a ansiedade induzida por falar em público em pacientes com fobia social.

Δ^9 -THC e CBD também apresentaram efeitos muito diferentes em vários modelos de psicose em roedores. Foram encontradas evidências de que o CBD não só exerce efeitos diferentes dos observados por Δ^9 -THC, como é capaz de reverter os fenótipos de psicose. O CBD reduziu a estereotipia induzida por apomorfina ou anfetamina, porém não induziu catalepsia em roedores (Moreira, Guimarães, 2005; Long et al., 2010). Além disso, o CBD mostrou efeito comparável ao da clozapina, do haloperidol e superior ao da ketamina na atenuação da hiperlocomoção induzida em camundongos (Moreira, Guimarães, 2005).

Uma abordagem diferente para avaliar o perfil psicofarmacológico do CBD consistiu em comparar seu efeito com os efeitos da clozapina e do haloperidol sobre a imunoreatividade para c-fos. A alteração na expressão do gene c-fos é vista como um marcador imediato do início da atividade neuronal recente (Day et al., 2008). Em consequência da ação dos antipsicóticos típicos e atípicos, a expressão da proteína Fos, produto do gene c-fos, está especificamente aumentada em várias regiões cerebrais (Dragunow et al., 1995). Guimarães e colaboradores (2004) estudaram a

expressão da proteína Fos no núcleo *accumbens* e no estriato dorsal de ratos em resposta ao haloperidol, à clozapina e ao CBD. O haloperidol induziu a expressão da proteína Fos no núcleo *accumbens* (região límbica) e no estriado dorsal. Em contraste, o CBD e a clozapina somente induziram ativação de Fos no núcleo *accumbens*. Além disso, o CBD não induziu a catalepsia, como o haloperidol fez, e mostrou baixa potência para aumentar os níveis de prolactina, um efeito hormonal característico de antipsicóticos clássicos. A semelhança entre os padrões de ativação de Fos pelo CBD e da clozapina justifica a possível classificação do CBD como um antipsicótico atípico (Zuardi et al., 1991; Guimarães et al., 2004).

Zuardi e colaboradores publicaram vários artigos sobre o uso terapêutico da monoterapia com CBD em pacientes com sintomas psicóticos. Em um relato de caso, o sucesso do tratamento com CBD 1200 mg/dia foi descrito em uma mulher esquizofrênica de 19 anos (Zuardi et al., 1995). Em outro breve relato, de três pacientes esquizofrênicos tratados com doses crescentes de até 1280 mg/dia de CBD, apenas um paciente apresentou melhora dos sintomas leves (Zuardi et al., 2006). Finalmente, um estudo clínico mais recente, mostrou que o CBD atenuou sintomas de esquizofrenia sem causar efeitos extra-piramidais (Leweke et al., 2012).

Até o momento, nenhum estudo clínico controlado foi realizado para se avaliar uma possível atividade antidepressiva do CBD. No campo pré-clínico, os resultados são também escassos. Um dos primeiros estudos que indicaram a presença de propriedades antidepressivas do CBD focou na sua capacidade de prevenir os efeitos autonômicos e comportamentais do estresse inevitável (Resstel et al., 2009). Em 2010, Zanelati e colaboradores administraram o CBD (3-100 mg/Kg) 30 min antes de submeterem os camundongos ao teste do nado forçado (TNF). Nesse modelo, o canabinoide promoveu efeitos tipo-antidepressivos, novamente com uma curva dose-resposta em forma de “U” invertido, em que a dose 30 mg/Kg reduziu a imobilidade de forma semelhante ao antidepressivo imipramina (30 mg/Kg), enquanto as doses de 3, 10 e 100 mg/Kg não promoveram este mesmo efeito.

No entanto, nos testes acima descritos, os efeitos do CBD foram avaliados após administração aguda do composto. Resultados com a administração repetida de CBD são escassos. Apenas recentemente, Campos e colaboradores (2013) demonstraram que a administração repetida de CBD (30 mg/Kg, 14 dias) preveniu

as consequências comportamentais decorrentes do estresse crônico e imprevisível, a saber, anedonia e comportamento tipo-ansioso, em camundongos.

1.5. Outros efeitos importantes do CBD

A partir da combinação de suas propriedades anti-inflamatória e anti-oxidante, o CBD vem demonstrando um perfil neuroprotetor interessante, como indicado por resultados obtidos por meio de intensa investigação pré-clínica em vários processos neurodegenerativos.

Para investigar mecanismos de neuroproteção em modelo de lesão causada por isquemia induzida por hipóxia (IIH) em ratos recém-nascidos, Castillo e colaboradores (2010) submeteram secções desses cérebros imaturos à privação de oxigênio e glicose na presença de veículo ou CBD. Os resultados encontrados mostraram que o CBD induziu neuroproteção robusta no cérebro imaturo, atuando em alguns dos principais mecanismos subjacentes à morte celular causada por IIH. Outras evidências pré-clínicas demonstraram que o CBD age como um agente neuroprotetor capaz de retardar a progressão de sintomas típicos da doença de Huntington em um modelo que simula esta doença em ratos (Sagredo et al., 2011; Valdeolivas et al., 2012). Em um modelo de intoxicação etanólica, a administração de uma forma transdérmica de CBD (gel a 5%, durante 8 dias consecutivos) atenuou a neurodegeneração induzida pela intoxicação em ratos (Liput et al., 2013). Lastres-Becker e colaboradores (2005) demonstraram, ainda, que o CBD apresentou potencial neuroprotetor, tanto *in vivo*, como *in vitro*, em modelos experimentais de doença de Parkinson. Além disso, esses pesquisadores sugeriram que esses efeitos neuroprotetores do CBD ocorriam devido a suas propriedades anti-oxidantes e/ou pela capacidade de modular a função da glia ou por uma combinação de ambos os mecanismos.

Com base nessa combinação de propriedades do CBD, é interessante lembrar que a neuroinflamação, presente nos processos neurodegenerativos, consiste em um processo complexo que envolve um grande número de moléculas e requer a migração de leucócitos do sangue através da barreira hemato-encefálica (BHE) e a ativação de células imunes residentes, como astrócitos e micróglia. Mecha e colaboradores (2013), usando um modelo viral de EM em camundongos,

demonstram que o CBD diminuiu a migração dos leucócitos do sangue através da diminuição da expressão da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1, do inglês *vascular cell adhesion molecule-1*), das quimiocinas (CCL2 e CCL5, do inglês *chemokines*) e da citocina pró-inflamatória interleucina-1 β (IL-1 β), bem como reduziu a ativação da micróglia. Além disso, os autores mostraram que a administração de CBD, no momento da infecção viral, exerceu efeitos de longa duração, melhorando os prejuízos motores na fase crônica da doença. Em conjunto, os resultados destacaram os efeitos anti-inflamatórios do CBD em modelo de EM e demonstram o potencial terapêutico anti-inflamatório significativo desse composto para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Perez e colaboradores (2013), em um modelo de transecção do nervo ciático, demonstraram que o CBD (15 mg/Kg, *i.p.*, 5 dias consecutivos) apresentou papéis neuroprotetores e antiapoptóticos, que foram reforçados pela preservação de sinapses na medula espinhal somada à redução de astrogliose, corroborando também o potencial anti-inflamatório do CBD. Enfim, o CBD produz uma redução significativa de morte neuronal induzida pela proteína β -amilóide, devido a sua capacidade de sequestrar as espécies reativas de oxigênio, reduzir a peroxidação lipídica *in vitro* (Iuvone et al., 2004; Esposito et al., 2006) e diminuir a expressão da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e da IL-1 β (Esposito et al., 2006; Castillo et al., 2010).

Evidências experimentais indicam que pelo menos parte dos efeitos neuroprotetores do CBD ocorre devido a um estímulo da neurogênese. Em um modelo que simula a doença de Alzheimer, através da neurotoxicidade induzida pela proteína β -amilóide, Esposito e colaboradores (2011) mostraram que o CBD exerce suas funções neuroprotetoras através de uma ativação dependente do *peroxisome proliferator-activated receptor- γ* (PPAR γ), que leva a uma redução da gliose reativa e, conseqüentemente, à neurodegeneração. Paralelamente, o CBD estimulou a neurogênese, uma vez que aumentou a taxa de proliferação de células *doublecortin* (DCX)-positivas na zona subgranular (ZSG) do giro denteado (GD) hipocampal.

1.6. Neurogênese

Neurogênese é o processo pelo qual as células progenitoras neuronais dividem-se, mitoticamente, para produzir novos neurônios no cérebro adulto. Esse processo complexo envolve vários passos que vão além da divisão celular, ou seja, o compromisso da nova célula a um fenótipo neuronal, a migração e a maturação das células, bem como o estabelecimento de contatos sinápticos apropriados que culminam em uma plena integração na rede pré-existente. Já bem descrita, a neurogênese, em roedores, ocorre, preferencialmente, em áreas discretas, conhecidas como nichos neurogênicos, os quais são bem caracterizados, como a ZSG do GD do hipocampo, e a zona subventricular (ZSV) das paredes dos ventrículos laterais. Em ambas as regiões, as células astrogliais agem como fonte de células progenitoras. Os neuroblastos nascidos na ZSV migram ao longo do fluxo migratório rostral (FMR), tornando-se, na maior parte, neurônios granulares GABAérgicos e interneurônios periglomerulares no bulbo olfatório (BO). Já as células que surgem na ZSG migram para a camada celular granular (CCG) do GD e se diferenciam em células glutamatérgicas granulares (Patrício et al., 2013).

Embora discutíveis, vários relatos descrevem a geração de novos neurônios em outras regiões do cérebro adulto, incluindo o córtex, a amígdala, o hipotálamo, o estriado e a substância negra. No entanto, em todas essas áreas, a neurogênese parece ocorrer a níveis muito baixos, ou sob condições não fisiológicas (Von Bohlen, Halbach, 2011).

1.6.1. Fases da neurogênese em animais adultos

A neurogênese hipocampal em adultos pode ser dividida em 4 fases, quando se considera a origem na ZSV ou 5 fases, quando se considera a origem na ZSG do GD hipocampal (Ming, Song, 2005).

1.6.1.1. Neurogênese a partir da ZSV

Em primeiro lugar, a ZSV consiste em uma camada de células em divisão que se estende por todas as paredes da porção dorso-ventral do ventrículo lateral. Células progenitoras da ZSV, rapidamente, dão origem a neuroblastos, através de progenitores proliferativos e, estes, são submetidos a uma cadeia de migração até o BO ao longo do FMR (Figura 5). No BO, as células recém-formadas diferenciam-se em inter-neurônios granulares ou periglomerulares que, subsequentemente são funcionalmente integrados ao circuito do BO (Gray, 1982). Para facilitar sua compreensão, a neurogênese que ocorre a partir da ZSV foi dividida nas 4 seguintes fases (Ming, Song, 2005):

Fase 1 (Proliferação): na ZSV, um subconjunto de astrócitos *glial fibrillary acidic protein* (GFAP)-positivos (GFAP⁺) dá origem à proliferação rápida de células transitórias amplificadoras. Estas células param de expressar GFAP, passando a expressar a proteína Dlx2.

Fase 2 (Diferenciação): Nesta fase, as células amplificadoras geram neuroblastos migrantes, positivos para as proteínas Dlx2 e *polysialylated-neural cell adhesion* (PSA-NCAM). Essa fase é influenciada por um conjunto de sinais neurogênicos de proliferação e controle da gliogênese. Este controle é feito por um tipo de células endimárias, adjacentes ao ventrículo lateral, que liberam inibidores de gliogênese. Nessa fase, os neurônios imaturos expressam tanto PSA-NCAM quanto DCX.

Fase 3 (Migração): No sistema olfatório, os neurônios recém-nascidos passam por grandes movimentos migratórios. Primeiro migrando, tangencialmente, ao longo da parede do ventrículo lateral. Em seguida, migram anteriormente ao longo do FMR para o BO, em estreita associação com o outro e, finalmente, dispersam-se, radialmente, como células individuais para camadas de células exteriores do BO (Ming, Song, 2005). Esta extensa migração ocorre em espécies de

roedores a primatas, mas não em seres humanos. A migração ao longo do FMR é um processo muito especial, chamado migração em cadeia, no qual neuroblastos migram, intimamente associados uns aos outros, em uma estrutura tubular formada por células gliais (Lois et al., 1996). A motilidade de migração em cadeia é regulada por um grupo de fatores, incluindo PSA-NCAM (Hu et al., 1996). Além disso, nessa fase, os neurônios ainda expressam DCX e Dlx2.

Estágio 4 (Integração sináptica): Neurônios imaturos diferenciam-se em neurônios granulares ou neurônios periglomerulares. Estes são interneurônios incomuns, que não apresentam um axônio, por isso, lançam seu neurotransmissor das espinhas dendríticas para as sinapses recíprocas especializadas em dendritos de células mitrais. Logo após a conclusão da migração radial, os novos neurônios, já maduros, começam a receber suas entradas sinápticas GABAérgicas antes das glutamatérgicas (Belluzzi et al., 2003; Carleton et al., 2003). Surpreendentemente, os novos neurônios granulares, mas não os novos neurônios periglomerulares (Belluzzi et al., 2003), aparecem para adquirir a capacidade de acionar os potenciais de ação logo depois que as entradas sinápticas são realizadas (Carleton et al., 2003). Esta sequência de desenvolvimento único pode lhes permitir integrar, facilmente, em um cérebro maduro, sem alterar os processos cognitivos existentes. Nessa fase, esses neurônios expressam o marcador neuronal pós-mitótico NeuN (Kuhn et al., 1996).

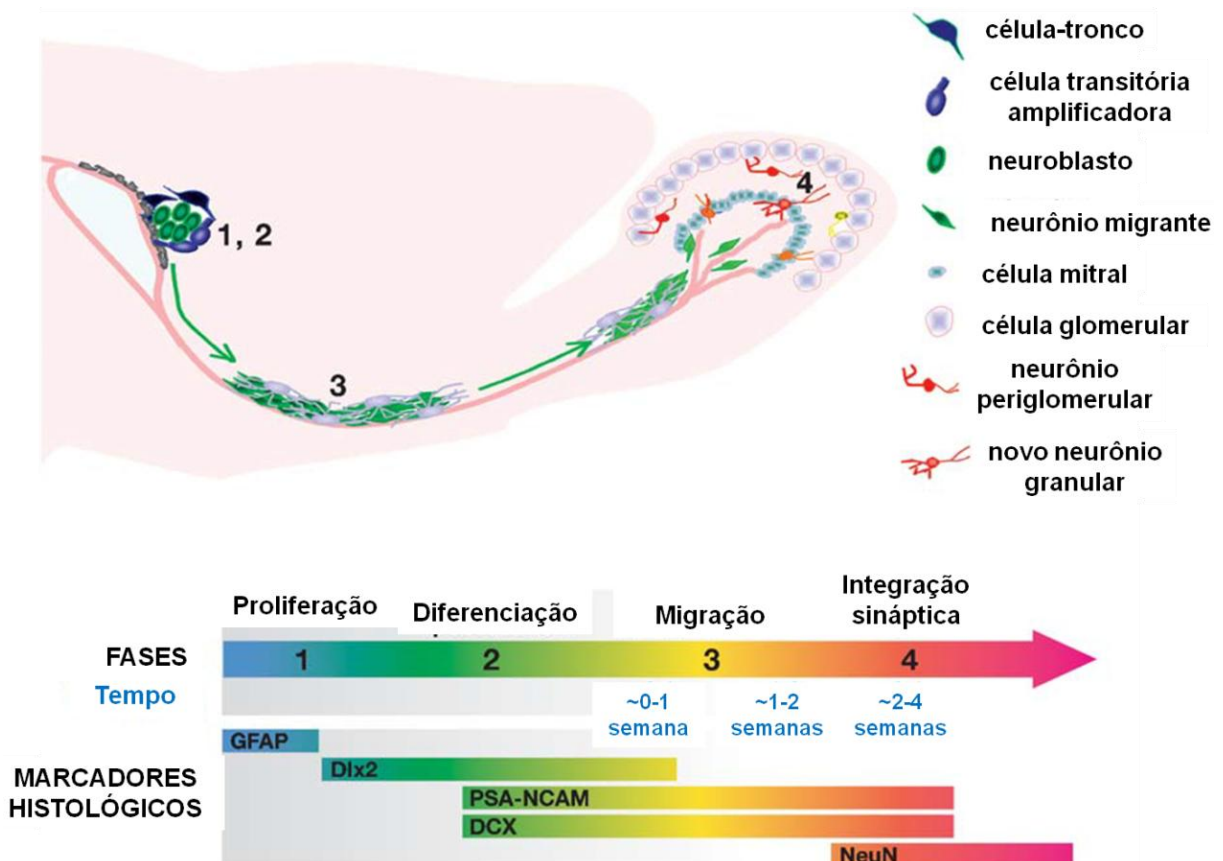


Figura 5: Geração de novos interneurônios no bulbo olfatório (BO) a partir de células-tronco neurais da zona subventricular (ZSV). Neurogênese no sistema olfatório/ZSV ocorre em quatro fases de desenvolvimento. Fase 1 (Proliferação): as células-tronco (azuis) na ZSV dos ventrículos laterais dão origem a células transitórias amplificadoras (azul claro). Fase 2 (Diferenciação): Células transitórias amplificadoras diferenciam-se em neurônios imaturos (verdes). Células endimárias adjacentes (cinza) do ventrículo lateral são essenciais para a diferenciação neuronal através da liberação de inibidores da gliogênese. Fase 3 (Migração): os neurônios imaturos (verdes) migram, em cadeia, através do fluxo migratório rostral (FMR) para o BO. Os neurônios que migram são substituídos pelos astrócitos, na ZSV. Depois de atingir o BO, novos neurônios migram, radialmente, para as camadas de células externas. Estágio 4 (Integração sináptica): Neurônios imaturos diferenciam-se em neurônios granulares (laranja) ou neurônios periglomerulares (vermelho). Esses interneurônios incomuns não apresentam um axônio, por isso, lançam seu neurotransmissor das espinhas dendríticas para as sinapses recíprocas especializadas em dendritos de células mitrais. Fonte: Ming, Song, 2005, modificado.

1.6.1.2. Neurogênese a partir da ZSG

A ZSG consiste em uma fina camada de células localizadas entre a CCG e o *hilus* do GD. Essa camada é caracterizada pela presença de vários tipos de células. Dentre elas, o tipo mais proeminente são as células-tronco neuronais. Além disso, são encontrados, por exemplo, astrócitos e células endoteliais dos vasos sanguíneos que, juntos, formam um micro ambiente que suporta as células-tronco e regula a proliferação, a migração e a diferenciação celulares. A descoberta desse micro ambiente e seu papel crucial no desenvolvimento celular levaram alguns pesquisadores a rotulá-lo como um nicho neurogênico (Doetsch, 2003; Riquelme et al., 2008). Diante disso, a neurogênese que ocorre a partir da ZSG hipocampal em adultos pode ser dividida, didaticamente, em 5 fases (Figura 6; Von Bohlen, 2007):

Fase 1 (Proliferação): Durante este primeiro estágio, a nova geração de células expressa a GFAP e a *nestin* (Fukuda et al., 2003; Filippov et al., 2003). Sugere-se que essas células sejam células-tronco e, portanto, importantes células progenitoras que representam, na ZSG do GD, um subconjunto de astrócitos que dará origem a novas células granulares (Seri et al., 2001). Esses precursores apresentam muitas características semelhantes às células gliais embrionárias (Levitt, Rakic, 1980; Eckenhoff, Rakic, 1984; Cameron et al., 1993), que atuam como progenitoras de neurônios durante o desenvolvimento embrionário (Hartfuss et al., 2001).

Fase 2 (Diferenciação): Representa a fase em que as células transitórias amplificadoras se diferenciam em neurônios maduros na ZSG. As células do início da fase 2 são positivas para a *nestin*, mas negativas para GFAP. Por outro lado, apresentam alto poder de proliferação (Kronenberg et al., 2003). Durante essa fase, as células também formam uma linhagem neuronal. Mais tarde, as células da fase 2 param de expressar *nestin* e começam a expressar DCX e a forma embrionária da PSA-NCAM (Kronenberg et al., 2003; Fukuda et al., 2003).

Fase 3 (Migração): Os neurônios imaturos expressam tanto PSA-NCAM quanto DCX. Eles migram uma curta distância até a camada de células granulares do GD (Von Bohlen, 2007).

Fase 4 (Segmentação de axônios e dendritos): Os neurônios imaturos enviam seus dendritos em direção à camada molecular do GD e estendem suas projeções axonais em direção à camada CA3 do hipocampo (camada de células piramidais).

Ainda nessa fase, a nova geração de neurônios torna-se pós-mitótica. Os neurônios imaturos ainda expressam DCX e PSA-NCAM (Kempermann et al., 2004; Ming, Song, 2005). Já os neurônios pós-mitóticos mais recentes, pelo menos em camundongos, expressam, transitoriamente, a proteína calretinina (Brandt et al., 2003; Llorens-Martin et al., 2006) e o marcador neuronal NeuN (proteína nuclear específica de neurônios; Brandt et al., 2003).

Fase 5 (Integração sináptica): Nesta fase, os novos neurônios granulares formados estabelecem seus contatos sinápticos através da entrada pelo córtex entorrinal e da saída para a região do CA3 e do *hilus*. Aproximadamente 2-3 semanas depois que a nova geração de células torna-se pós-mitótica, a calretinina parece ser trocada por calbidina em células granulares maduras (Brandt et al., 2003; Kempermann et al., 2004). A calbidina está presente em todas as células granulares maduras (Rami et al., 1987; Baimbridge, 1992) e a nova geração de células formadas que expressam calbidina tornam-se funcionalmente integradas no hipocampo (Van Praag et al., 2002). Esses neurônios também expressam o marcador neuronal pós-mitótico NeuN (Kuhn et al., 1996).

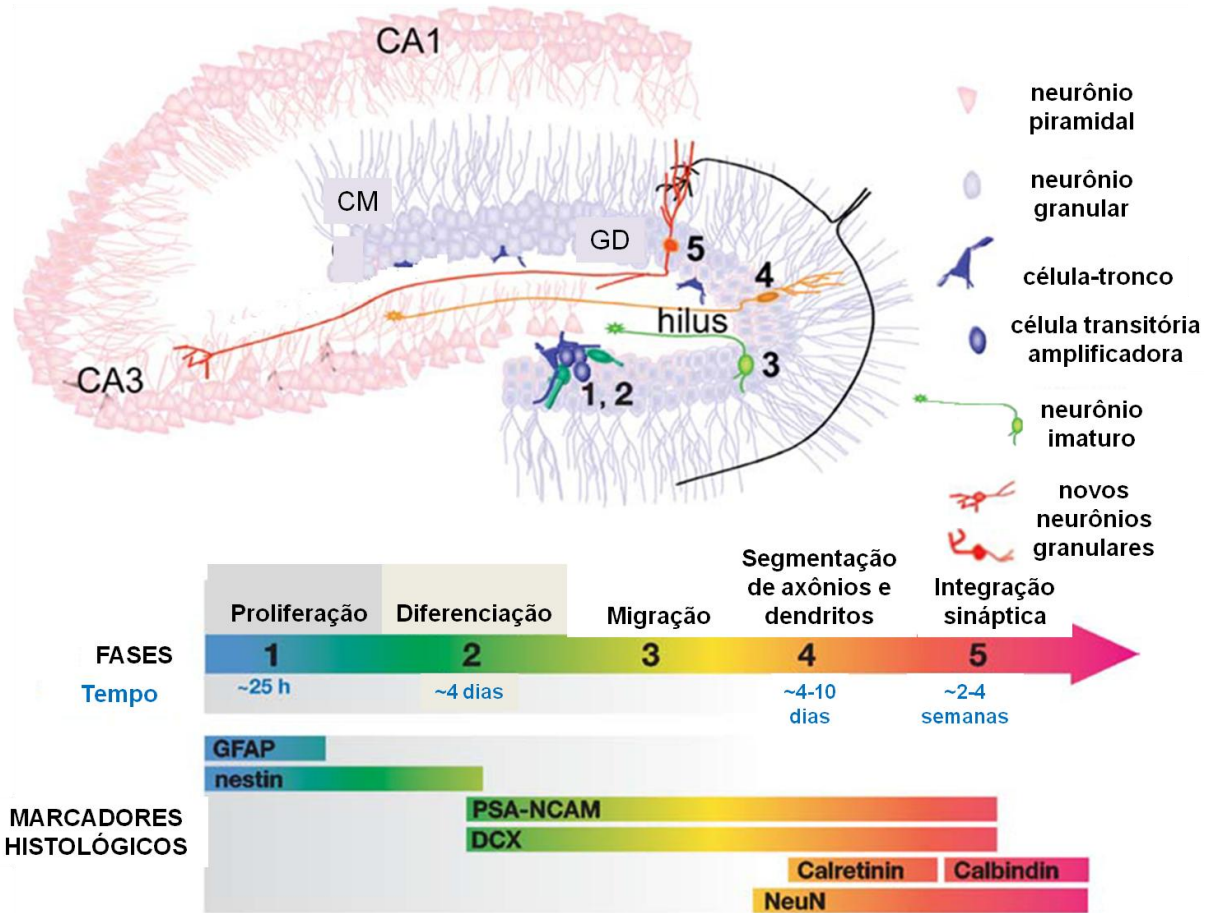


Figura 6: Geração de novos neurônios granulares no giro dentado (GD) do hipocampo a partir de células-tronco neuronais na zona subgranular (ZSG). Neurogênese no giro dentado do hipocampo ocorre em cinco fases. Fase 1 (Proliferação): As células-tronco (azuis), com seus corpos celulares localizados dentro da ZSG do GD, apresentam processos radiais que se projetam através da camada celular granular (CCG) e processos tangenciais curtos que se estendem ao longo da borda da CCG e do *hilus*. Estas células-tronco dão origem a células transitórias amplificadoras (azul claro). Fase 2 (Diferenciação): células transitórias amplificadoras diferenciam-se em neurônios imaturos (verdes). Progenitores proliferativos na ZSG estão firmemente associados aos astrócitos e estruturas vasculares. Fase 3 (Migração): os neurônios imaturos (verde claro) migram, por uma curta distância, até a CCG. Fase 4 (Segmentação de axônios e dendritos): neurônios imaturos enviam seus dendritos em direção à camada molecular (CM) do GD e estendem suas projeções axonais em direção à camada de células piramidais no subcampo CA3 do hipocampo. Fase 5 (Integração sináptica): novos neurônios granulares (vermelho) formados estabelecem seus contatos sinápticos através da entrada pelo córtex entorrinal e da saída para a região do CA3 e do *hilus*. GD, giro dentado; CM, camada molecular. Fonte: Ming, Song, 2005, modificado.

1.6.2. Fatores que regulam a neurogênese no cérebro adulto

Sabe-se que um grande número de fatores regula o processo de proliferação celular no SNC de ratos adultos, tais como a idade, a espécie, o sexo, alguns hormônios, o ambiente, a prática de exercícios físicos e a aprendizagem (Malberg et al., 2000). Modelos que simulam a prática de exercícios físicos, como a corrida voluntária, e o modelo de estimulação cognitiva pela habitação em um ambiente enriquecido, em camundongos, mostram que, estes fatores, potencialmente, estimulam a neurogênese no GD do hipocampo (Brown et al., 2003; Kempermann et al., 2010). Alguns estudos revelam que existem fatores que levam ao decréscimo da proliferação celular e da neurogênese, tais como o estresse agudo ou o estresse crônico físico ou psicossocial (Lucassen et al., 2010). Por exemplo, uma simples exposição de ratos ao cheiro do predador já foi suficiente para causar um decréscimo na proliferação celular, comprovada por marcadores como a timidina tritiada e o 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Tanapat et al., 1998; Tanapat et al., 2001).

Condições patológicas podem também incrementar a neurogênese no SNC adulto. Exemplos disso são modelos que simulam crises convulsivas generalizadas, características de um tipo dramático de epilepsia, nos quais se observou que a neurogênese, no GD do hipocampo, é fortemente estimulada após as convulsões (Parent et al., 1997; Madsen et al., 2000; Scott et al., 2010). Além disso, modelos de isquemia global e focal também induzem o aumento do número de neurônios novos na ZSV dos ventrículos laterais cerebrais e na ZSG do GD do hipocampo (Liu et al., 1998; Yagita et al., 2001). Kawai e colaboradores (2004), demonstraram que um modelo de isquemia cerebral global e transitória (ICGT), em ratos, acelera a proliferação celular na ZSG e, mais além, as células que proliferaram, migraram para fenótipos diferenciados de neurônios com o passar do tempo após o insulto isquêmico. Ainda no mesmo estudo, os resultados mostraram que o aumento no número de células BrdU-positivas foi detectado, significativamente diferente do controle, a partir do quinto dia após a ICGT. Sete dias após o insulto isquêmico, foi observado aumento de até 6 vezes no número de células BrdU-positivas, quando comparado ao controle. Os autores mostraram, portanto, que a proliferação celular,

estimulada pela ICGT, tem um pico máximo de 7 dias, retornando aos níveis do controle 14 dias após a isquemia.

Outro fator importante que regula a neurogênese é o tratamento crônico com medicamentos antidepressivos (ADs). Várias classes, incluindo os tricíclicos, como a imipramina e os inibidores seletivos de recaptção da serotonina (ISRS), como a fluoxetina, mas não outras drogas psicotrópicas como o antipsicótico haloperidol, aumentam o número de células progenitoras no hipocampo, as quais se diferenciam em neurônios maduros (Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003; Sairanen et al., 2007).

1.6.3. Antidepressivos e neurogênese

Os ADs são as drogas mais frequentemente prescritas para o tratamento da depressão, ainda que os mecanismos celulares e moleculares pelos quais estes agentes exercem seus efeitos terapêuticos ainda não sejam bem compreendidos. A maioria dos ADs aumenta os níveis de monoaminas, tais como a serotonina (5-HT) e a NA no SNC, o que sugere que um desequilíbrio neste sistema seja a base da patogênese da depressão. Embora os ADs promovam um rápido aumento no nível de monoaminas na fenda sináptica, o aparecimento dos efeitos terapêuticos ocorre usualmente dentro de 2 a 4 semanas do início do tratamento (Wong, Licinio, 2001). Essa latência para a obtenção do efeito terapêutico sugere que alterações estruturais e neuroquímicas de desenvolvimento mais lento possam ocorrer em áreas límbicas que recebem projeções monoaminérgicas, como, no hipocampo (Santarelli et al., 2003).

O hipocampo é uma estrutura cerebral que tem despertado grande interesse em relação aos efeitos terapêuticos dos ADs, bem como a patogênese dos distúrbios afetivos, incluindo a depressão. Estudos de neuro-imagem e *post mortem* mostram atrofia ou perda neuronal no hipocampo e córtex frontal de pacientes com depressão (Sheline et al., 1996; Shah et al., 1998). Também, situações de estresse crônico, fator conhecidamente desencadeador de depressão em humanos (Post, 1992), causa morte celular e decréscimo de neurotrofinas no hipocampo (Sapolsky, 1992; Duman et al., 1997; McEwen, 1999). Por outro lado, outros estudos mostram

que o hipocampo está entre as poucas regiões cerebrais onde a neurogênese pode ocorrer durante toda a vida (Eriksson et al., 1998).

É interessante notar que o pico da neurogênese se dá no 14^o dia de tratamento com ADs e se mantém num platô até o 28^o dia, o que coincide com o aparecimento do efeito terapêutico na clínica (Santarelli et al., 2003). Neste sentido, este mesmo grupo de pesquisadores sugere que os efeitos comportamentais da administração crônica de ADs podem ser mediados pela estimulação da neurogênese no hipocampo. Com base em métodos radiológicos e genéticos, esse grupo demonstrou ainda que a aplicação de radiação X não impede só a neurogênese hipocampal, mas também o aparecimento dos efeitos comportamentais relacionados aos ADs. Além disso, camundongos que não expressam o receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} (*knockout*), são insensíveis aos efeitos neurogênicos e comportamentais da fluoxetina.

Em 2010, Schiavon e colaboradores demonstraram que o tratamento crônico (14 dias) com o antidepressivo (AD) imipramina (20 mg/Kg) aumentou a proliferação celular na ZSG do GD hipocampal e reduziu a morte neuronal no subcampo CA1 do hipocampo 14 dias após a ICGT em ratos.

1.6.4. Isquemia cerebral e neurogênese

A lesão cerebral isquêmica ocorre agudamente mediante dois mecanismos principais: a) oclusão de uma artéria cerebral (*stroke* ou acidente vascular cerebral - AVC) ou b) parada cardíaca ou choque hipotensivo grave (Zola-Morgan et al., 1986; Petito et al., 1987). Disfunções neuropsicológicas, incluindo prejuízo de aprendizagem e memória, são as principais consequências da ICGT. Em algumas circunstâncias, os pacientes são severamente afetados, apresentando uma grande variedade de prejuízo de memória e disfunção cognitiva que sua reintegração psicossocial e vocacional torna-se prejudicada (Fernandes et al., 2008). Sequelas estruturais e neuropsicológicas também podem ocorrer durante procedimentos terapêuticos, tais como cirurgias de peito aberto ou mesmo durante procedimentos diagnósticos como o cateterismo (Cummings et al., 1984; Sudo et al., 2001). No tocante ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas para tais circunstâncias, duas abordagens parecem promissoras: a abordagem neuroprotetora, que visa a

redução ou bloqueio da morte neuronal induzida pela isquemia, através, por exemplo, de drogas ditas neuroprotetoras ou agentes físicos como a hipotermia, e a abordagem neuroregenerativa, a qual explora a possibilidade de reorganização neuronal (plasticidade) a partir do próprio tecido nervoso remanescente ou, então, através do implante de neurônios diferenciados ou células-tronco.

No rato, tanto a ICGT (Liu et al., 1998; Takagi et al., 1999; Kee et al., 2001; Yagita et al., 2001) quanto a isquemia focal (IF) (Arvidsson et al., 2001; Komitova et al., 2002), induzem um aumento da proliferação celular na ZSG do hipocampo. Se tais neurônios podem reparar a lesão ocorrida, por exemplo, na região CA1 após ICGT, não está devidamente esclarecido. Tem sido observado, entretanto, que a infusão intraventricular de fatores de crescimento, como o EGF (*epidermal growth factor*) ou FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*), após isquemia, resulta em um intenso processo de regeneração dos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo de ratos (Nakatomi et al., 2002). Esses neurônios recebem *input* sináptico e se projetam para o subículo, exibindo recuperação de respostas sinápticas, como a potenciação, a longo prazo, e uma melhora no desempenho no labirinto aquático. Ainda, a possibilidade de células progenitoras se tornarem neurônios funcionais aumenta, no sentido que as mesmas expressam, por exemplo, atividades de fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) em resposta à administração intracerebroventricular de N-metil-D-aspartato (NMDA, Kawai et al., 2004).

Os mecanismos moleculares que regulam a neurogênese induzida pela isquemia ainda não são bem compreendidos. Hipoteticamente, fatores de transcrição, moléculas sinalizadoras e fatores de crescimento poderiam participar deste fenômeno (Kokaia, Lindvall, 2003). Jin e colaboradores (2003) mostraram que a hipóxia em cultura de células corticais estimula a neurogênese através da liberação de fatores de crescimento, tais como o FGF-2. Além disso, o tratamento agudo com o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) estimula a neurogênese e a maturação de neurônios piramidais no CA1 do hipocampo após a isquemia cerebral, promovendo recuperação neuronal e comportamental (Nakatomi et al., 2002). Mais ainda, a infusão de outros fatores, como a citocina eritropoetina, tem mostrado uma neurogênese modular no hipocampo (Shingo et al., 2001).

Enfim, estudos recentes indicam que o CBD protege o cérebro imaturo de uma lesão por isquemia induzida por hipóxia (IIH). A administração de CBD 30 min após a IIH resultou em melhorias histológicas, funcionais e bioquímicas em leitões (Lafuente et al., 2011), camundongos (Castillo et al., 2010) e ratos (Pazos et al., 2012) recém-nascidos. Neste estudo, Pazos e colaboradores (2012) mostraram que a administração de CBD (1 mg/Kg), em ratos recém-nascidos, após a lesão por IIH levou a efeitos neuroprotetores duradouros, demonstrados por um melhor desempenho neurocomportamental em ambos os testes sensório-motor e de reconhecimento de objetos novos, 30 dias após o insulto por IIH. No entanto, ainda não foram descritos estudos que avaliassem os efeitos do CBD sobre a neurogênese em animais submetidos a modelos de isquemia cerebral.

1.7. Justificativa

Ao considerar o perfil farmacológico do CBD e o escasso número de estudos avaliando o tratamento com CBD em animais submetidos a modelos de isquemia cerebral e seu envolvimento com a neuroplasticidade, além de poucos relatos envolvendo a avaliação do tratamento crônico do CBD em animais submetidos a modelos comportamentais que simulam a ansiedade e a depressão e sua relação com a neurogênese, optou-se por dividir este estudo em dois capítulos. Assim, o primeiro capítulo apresenta os efeitos do CBD sobre os danos hipocampais, a neuroplasticidade e o desempenho comportamental em camundongos submetidos a um modelo de oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC). Em seguida, o segundo capítulo discute os efeitos do CBD sobre o comportamento emocional e sua relação com a neurogênese nas ZSV e ZSG do GD hipocampal de camundongos.

2. CAPÍTULO 1

**Efeitos protetores do canabidiol
contra a morte celular hipocampal e
prejuízos cognitivos induzidos por
OBACC em camundongos**



2.1. Introdução

Lesão isquêmica resultante de paradas circulatórias globais no cérebro é uma das principais causas de morte e incapacidade na população adulta (Nikonenko et al., 2009; Neumann et al., 2013). Prejuízos circulatórios prolongados induzem mudanças irreversíveis no tecido cerebral. A lesão e a morte neuronal resultam em uma ampla variedade de distúrbios neurológicos e comportamentais (Anderson, Arciniegas, 2010; Peskine et al., 2010). Os prejuízos cognitivos constituem as sequelas pós-isquemia cerebral mais bem caracterizadas, sendo a memória o fator mais afetado, seguido da atenção e da função executiva (Zola-Morgan et al., 1986; Kartsounis et al., 1995; Moulaert et al., 2010; Mateen et al., 2011). Estudos *post mortem* sugeriram que os danos no hipocampo, associados aos danos comportamentais, tornam-se fatores chave para a compreensão de eventos pós-isquêmicos (Zola-Morgan et al., 1986; Bachevalier, Meunier, 1996; Blum et al., 2012).

No tocante ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas neuroprotetoras, apesar de intensos esforços, somente alguns tratamentos farmacológicos parecem minimizar, efetivamente, os prejuízos funcionais após isquemia cerebral (Auriel, Bornstein, 2010). Portanto, fica claro que são necessários estudos que objetivem identificar estratégias seguras e eficazes para o tratamento da doença isquêmica cerebral.

Um número considerável de estudos pré-clínicos demonstraram que o CBD, um dos principais constituintes não-psicomiméticos da maconha, pode fornecer neuroproteção contra danos cerebrais agudos ou crônicos (Mechoulam, Shohami, 2007; Garcia et al., 2011; Sagredo et al., 2011; Harvey et al., 2012; Valdeolivas et al., 2012; Fernández-Ruiz et al., 2013; Pazos et al., 2013). *In vitro*, o CBD produz uma redução significativa de morte neuronal induzida pela β -amiloide, devido a sua capacidade de sequestrar as espécies reativas de oxigênio, reduzir a peroxidação lipídica (Iuvone et al., 2004), e diminuir a expressão da iNOS e da IL-1 β (Castillo et al., 2010). O CBD também reduz danos causados por necrose e apoptose em secções cerebrais de camundongos recém-nascidos submetidos à privação de glicose e oxigênio (Castillo et al. 2010).

Evidências experimentais demonstram que o CBD protegeu o cérebro imaturo, de uma lesão por isquemia induzida por hipóxia (IIH). A administração de CBD 30 min após a IIH resultou em melhorias histológicas, funcionais e bioquímicas em leitões (Lafuente et al., 2011), camundongos (Castillo et al., 2010) e ratos (Pazos et al., 2012) recém-nascidos. O tratamento repetido com CBD (3 mg/Kg) também diminuiu a ativação glial e aumentou as taxas de sobrevivência após o modelo de oclusão da artéria cerebral média (OACM) em camundongos (Hayakawa et al., 2008 e 2009). Fernández-Ruiz e colaboradores (2013) sugerem que esse perfil neuroprotetor do CBD ocorra devido a uma combinação de suas propriedades anti-inflamatórias e anti-oxidantes, indicado por resultados obtidos por meio de intensa investigação pré-clínica em várias doenças neurodegenerativas, como, em particular, a isquemia neonatal, a doença de Huntington (DH) ou a doença de Parkinson (DP). Com base nessa combinação de propriedades do CBD, é interessante lembrar que a neuroinflamação é um processo que compreende, basicamente, a ativação microglial, a astrogliose e a infiltração de linfócitos (Hirsch, Hunot, 2009). Diante disso e, sabendo que os astrócitos desempenham um papel fundamental na patogênese da morte neuronal (Takuma et al., 2004; Szydlowska et al., 2010; Duan et al., 2011), torna-se fundamental analisar os efeitos do CBD sobre a resposta astrogliar à isquemia cerebral experimental. Nesse estudo, esta análise foi realizada com o auxílio da imunohistoquímica para GFAP, uma proteína expressa por astrócitos em cérebro de roedores.

Do ponto de vista funcional, Pazos e colaboradores (2012) mostraram que o CBD melhorou a desempenho (*score*) neurológico (ou seja, o caminhar, o rolar, e o inclinar-se para o lado ipsilateral da lesão) e a coordenação motora em ratos submetidos à OACM. Ademais, o CBD (5 mg/Kg), administrado 5 min após a OBACC antagonizou o achatamento do gráfico do eletroencefalograma (EEG) e a hiperlocomoção em gerbils (Braidá et al., 2003). Pazos e colaboradores (2012) mostraram que a administração de CBD (1 mg/Kg), em ratos recém-nascidos, após a lesão por IIH levou a efeitos neuroprotetores duradouros, demonstrados por um melhor desempenho neurocomportamental em ambos os testes sensorio-motor e de reconhecimento de objetos novos 30 dias após o insulto por IIH. Este último é considerado um teste de memória não espacial. O que resta a ser determinado,

entretanto, são os efeitos do CBD em prejuízos de memória espacial induzidos por isquemia cerebral em animais adultos.

Para auxiliar na avaliação da morte das células do hipocampo, a histoquímica para Fluoro-Jade C (FJC), um fluorocromo aniônico, que detecta os neurônios que estão em vias de neurodegeneração (Schmued et al., 2005), torna-se uma ferramenta imprescindível. Além disso, Cengiz e colaboradores (2011) mostraram que a perda da expressão da *microtubule-associated protein 2* (MAP2), uma proteína de microtúbulo presente, exclusivamente, em dentritos, é mais um indicativo da degeneração neuronal consequente da isquemia cerebral em camundongos isquêmicos com 9 dias de idade. Concomitantemente aos prejuízos cognitivos e hipocampais, sabe-se que, em ratos, tanto a ICGT (Liu et al., 1998; Takagi et al., 1999; Kee et al., 2001; Yagita et al., 2001) quanto a IF (Arvidsson et al., 2001; Komitova et al., 2002), induzem um aumento da proliferação celular e da neurogênese na ZSG do GD hipocampal (Schiavon et al., 2010). Assim, a detecção imuno-histoquímica de Ki-67, uma proteína nuclear expressa em todas as células em divisão durante o processo de mitose (Scholzen, Gerdes, 2000), pode ser executada para confirmar a indução da proliferação celular pela isquemia cerebral. É importante confirmar se células proliferativas tratam-se de neurônios. Nesse caso, a imuno-histoquímica para DCX, uma proteína que promove a polimerização de microtúbulos e está presente em neuroblastos migrantes e neurônios jovens, pode servir como um marcador de neurogênese no hipocampo de animais adultos (Tabela 1) (Gleeson et al., 1999).

Tabela 1: Descrição dos marcadores histológico, histoquímico e imuno-histoquímicos utilizados e suas respectivas funções.

Marcadores	Descrição	Células que expressam	Função
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina	todas as células que o incorporam na fase S da mitose	Após incorporado, permanece retido na célula por toda sua vida. Característica que permite traçar a linhagem da célula e seu tempo de sobrevivência.
DCX	<i>doublecortin</i>	neuroblastos migrantes e neurônios jovens	Expressa de forma transitória, com pico de expressão em torno de duas semanas. Depois é gradualmente substituída por marcadores de neurônios maduros.
FJC	Fluoro-Jade C	neurônios em vias de neurodegeneração	Fluorocromo aniônico que detecta neurônios em vias de neurodegeneração.
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>	astrócitos	Proteína ácida fibrilar glial, expressa por astrócitos no cérebro.
Ki-67	proteína nuclear	todas as células em divisão mitótica	Protína nuclear expressa por todas as células em divisão durante o processo de mitose. Pode ser utilizada para confirmar a indução de proliferação celular.
MAP2	<i>microtubule-associated protein 2</i>	dendritos	Confirmar a integridade dendrítica neuronal.
NeuN	marcador neuronal pós-mitótico	neurônios maduros ou pós-mitóticos	Proteína expressa por neurônios maduros, que estabelecem seus contatos sinápticos no cérebro.
Nissl	coloração histológica básica	todos os neurônios	Neste estudo, foi utilizada para diferenciar células aparentemente intactas de células picnóticas em toda extensão hipocampal.

2.2. Objetivos

2.2.1. Geral

Investigar os efeitos do canabidiol sobre os danos hipocampais, a neuroplasticidade e o desempenho comportamental em camundongos submetidos a um modelo de OBACC.

2.2.2. Específicos

- Investigar os efeitos do CBD sobre a capacidade de animais isquêmicos em executar as tarefas de aprendizagem e memória no modelo do labirinto aquático de Morris (LAM).
- Avaliar a sobrevivência de células do hipocampo coradas pelo método de Nissl.
- Detectar, pela histoquímica para FJC, a presença de neurônios em vias de degeneração causada pelo insulto isquêmico.
- Analisar se o tratamento com CBD altera a proliferação celular e a neurogênese no hipocampo de camundongos submetidos à lesão cerebral isquêmica através da imuno-histoquímica para Ki-67 e DCX, respectivamente.
- Analisar os efeitos do CBD sobre a resposta astrogliar à isquemia cerebral experimental através da imuno-histoquímica para GFAP.
- Observar a integridade dendrítica de neurônios hipocampais de camundongos submetidos à OBACC através da imuno-histoquímica para MAP2.

2.3. Metodologia

2.3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos albinos, Swiss, pesando de 30 a 40 g. Os animais permaneceram em condições padrões de alojamento, com ciclo de luz claro/escuro (12 h), temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e suprimento de água e ração à vontade durante o desenvolvimento de todo o experimento.

Dessa forma, os procedimentos experimentais seguiram os “Princípios Básicos para a Utilização Animal”, conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (Parecer CEEA 004/2011).

2.3.2. Procedimento experimental

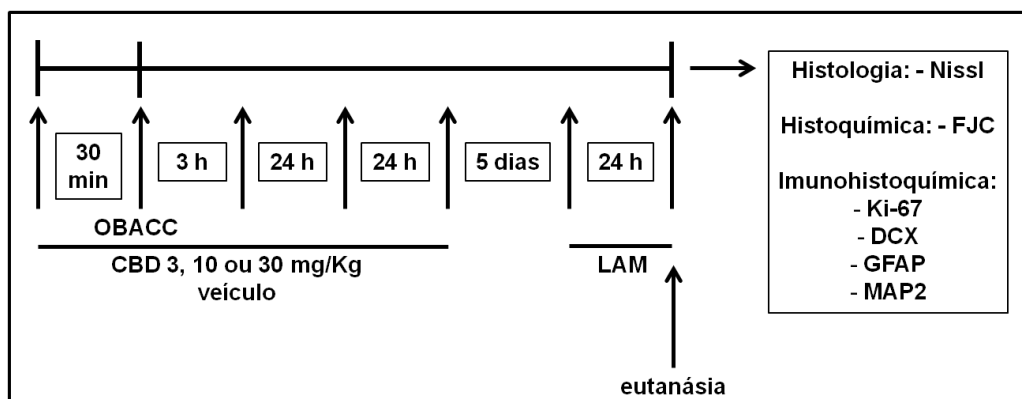
Inicialmente, os animais foram tratados, intraperitonealmente (*i.p.*), com veículo (solução salina com 1 % de Tween 80) ou CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg; Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha) 30 min antes, 3, 24 e 48 h após a OBACC.

Os animais foram divididos em oito grupos experimentais quanto ao tratamento:

- (i) grupo sham (controle, falso operado) tratado com veículo - sham;
- (ii) grupo sham tratado com CBD 3 mg/Kg – sham CBD 3;
- (iii) grupo sham tratado com CBD 10 mg/Kg – sham CBD 10;
- (iv) grupo sham tratado com CBD 30 mg/Kg – sham CBD 30;
- (v) grupo isquêmico tratado com veículo – isq veículo;
- (vi) grupo isquêmico tratado com CBD 3 mg/Kg – isq CBD 3;
- (vii) grupo isquêmico tratado com CBD 10 mg/Kg – isq CBD 10; e
- (viii) grupo isquêmico tratado com CBD 30 mg/Kg – isq CBD 30.

Trinta minutos após a primeira administração de veículo ou CBD, os animais foram submetidos à OBACC, por um período de 17 min. Três, 24 e 48 horas após a reperfusão, os animais receberam as demais doses. O regime de tratamento e as doses de CBD foram baseados nos artigos de Hayakawa e colaboradores (2008). Cinco dias depois da última administração, os animais foram submetidos ao modelo de análise comportamental de aprendizagem e memória, conhecido como LAM.

Logo após o teste no LAM, sendo o oitavo dia após a reperfusão, um grupo de animais foi eutanasiado e teve seus cérebros retirados para posterior análise histoquímica pelo método de Nissl e FJC. Outro grupo, a parte, após o LAM, foi submetido a uma perfusão transcardíaca com o fixador paraformaldeído (PFA) 4% para posterior análise imuno-histoquímica para Ki-67, DCX, GFAP e MAP2 (Esquema 1).



Esquema 1: Delineamento experimental.

2.3.2.1. Cirurgia

Foi realizado o modelo de OBACC, seguindo o método de oclusão dos 2-vasos (2VO), no qual a oclusão das artérias carótidas comuns é feita, temporariamente, por um período de 17 min (Soares et al., 2013). Os animais foram anestesiados por fluxo contínuo de inalação de isoflurano (Isoforine[®], Cristália, Itapira-SP, Brasil) e gás oxigênio (vaporizador Oxigel, São Paulo-SP, Brasil) através de uma máscara facial. Em seguida, tiveram os ramos comuns das artérias carótidas cuidadosamente expostos e isolados dos tecidos adjacentes através de um fio de seda, cujas extremidades ficaram exteriorizadas. Logo depois, as artérias foram ocluídas com o auxílio de cliques de aneurismas (ADCA, Belo Horizonte-MG, Brasil). A incisão foi fechada com linha de algodão e os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) para se recuperarem da anestesia. Durante a oclusão, os animais permaneceram os 17 min sem a influência da anestesia. Nesse período, os sinais de perda do reflexo de endireitamento, midríase, estiramento tônico das patas, temperatura retal mantida entre $37\text{-}38^{\circ}\text{C}$ e

ausência de respostas à estimulação tátil foram considerados indicativos de uma isquemia efetiva.

Para os animais controle, denominados sham, os procedimentos anestésicos utilizados foram os mesmos, porém, não tiveram nenhuma das artérias ocluídas e, portanto, não sofreram injúria isquêmica.

2.3.2.2. O labirinto aquático de Morris (LAM)

Cinco dias após o último tratamento com CBD, os animais foram submetidos ao LAM para avaliação da aprendizagem e memória (Prediger et al., 2008). O LAM trata-se de um equipamento circular, como uma grande piscina (90 cm de diâmetro, 35 cm de altura, preenchido com água à $24 \pm 1^\circ\text{C}$ até uma profundidade de 26 cm). A piscina foi dividida em quatro quadrantes hipotéticos iguais, fixados em ângulos retos entre si na borda da piscina. Uma plataforma submersa (10 cm^2) foi colocada em um dos quadrantes a 1 cm abaixo da superfície da água, servindo como um refúgio para o animal. A posição da plataforma foi mantida inalterada ao longo das sessões de treinamento (Figura 7).

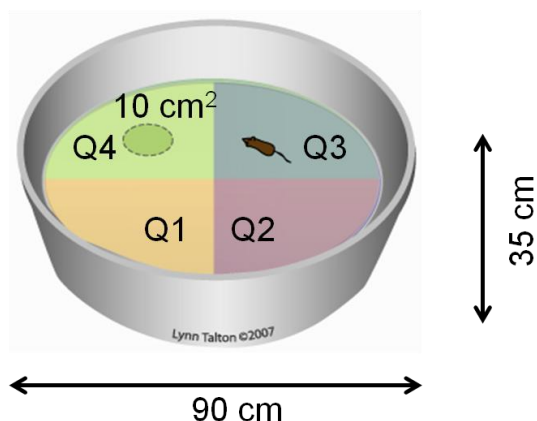


Figura 7: Esquema representativo do equipamento circular utilizado para o desenvolvimento do modelo experimental do labirinto aquático de Morris (LAM).

Os camundongos foram expostos ao modelo do LAM durante dois dias consecutivos. No primeiro dia, chamado de treino, os camundongos foram submetidos a uma sessão de 10 tentativas consecutivas, de 60 segundos (s) cada, para avaliação da aprendizagem. Os animais iniciaram cada tentativa de um

quadrante diferente, em uma ordem aleatória. Após passados os 60 s, se o animal não encontrasse a plataforma, ele era, gentilmente, conduzido a ela e deveria permanecer ali por 10 s. O tempo de latência, que corresponde ao tempo despendido pelo animal da posição inicial até a localização da plataforma, foi anotado e analisado como índice de aquisição de memória ou de aprendizagem.

Para avaliação da retenção da memória, no segundo dia, chamado teste, a plataforma foi retirada e se realizou uma única tentativa de 60 s. Os tempos de exploração nos quatro quadrantes foram anotados separadamente e o período de exploração no quadrante que continha a plataforma, foi avaliado como índice de retenção da memória. O experimentador sempre permaneceu no mesmo local, tomando cuidado para manter a mesma posição relativa entre ele e os objetos, dispostos como pistas, pela parede da sala em que se encontrava o labirinto.

2.3.2.3. Análises histológica, histoquímica e imunohistoquímica

Logo após o teste no LAM, os animais foram anestesiados com overdose de tiopental (0,045 mg/g, Thiopentax[®], Cristália, Itapira-SP, Brasil) e perfundidos, transcardiacamente, com 30 mL de solução salina 0,9%, seguida de 50 mL de solução fixadora de Bouin (750 mL de solução de ácido pícrico saturado, 100 mL de formaldeído, 50 mL de ácido acético glacial e 100 mL de água destilada). Após a perfusão, os animais foram decaptados e as cabeças permaneceram imersas em gelo picado por 2 h. Os hemisférios foram, então, cuidadosamente removidos e conservados na mesma solução fixadora por 72 h à temperatura ambiente. Após a fixação, o tecido cerebral foi submetido à desidratação em uma série gradual de etanol, diafanizados em xilol e emblocados em parafina (56°C). Secções coronais semi-seriadas foram obtidas com o auxílio de um micrótomo (LEICA, RM2445, Göettingen, Alemanha), correspondendo a coordenadas estereotáticas entre -1.70 a -2.70 mm, posteriores ao Bregma, de acordo com o atlas de Franklin e Paxinos (1997). Foram realizados cortes semi-seriados, em quadruplicata, contendo 4 secções com espessura de 7 µm, separadas 28 µm entre si. Secções adjacentes foram, então, coradas pelo método histológico de Nissl (n=6-15) e pelo método histoquímico para detecção de FJC (n=5-8).

2.3.2.3.1. Coloração de Nissl

Em uma replicata, as secções foram desparafinizadas em xilol e alcoóis de graduação decrescente, e, em seguida, tratadas com álcool 80% acrescido de amônia, para diminuir o tom amarelado das secções, deixado pela solução fixadora (Bouin). Subsequentemente, as secções foram coradas com o cresil violeta (5 min) e, na sequência, foram retirados os excessos do corante com álcool absoluto e diafanizadas as lâminas com xilol. Finalmente, as secções coradas foram cobertas com Permount[®] (Fisher Scientific, New Jersey, EUA) e lamínulas.

2.3.2.3.2. Histoquímica para FJC

Na segunda replicata, as secções foram desparafinizadas em xilol e alcoóis de graduação decrescente, e, em seguida, tratadas com álcool 80% acrescido de amônia, para diminuir o tom amarelado das secções, deixado pela solução fixadora (Bouin). Subsequentemente, as secções foram imersas em tampão citrato 10 mM e submetidas à recuperação antigênica durante 30 min no banho-maria à 95°C. Após resfriadas, as secções foram tratadas com uma solução de permanganato de potássio 0,06% por 15 min, para diminuir o *back ground* nas secções e aumentar o tempo de fluorescência do fluorocromo e, em seguida, lavadas com água destilada. As secções foram, então, transferidas para um recipiente contendo FJC (Histo-Chem, Jefferson, AR, EUA) 0,0001% em solução de ácido acético 0,1%, por 30 min. Depois de serem lavadas com água destilada, as lâminas foram secas e armazenadas em freezer -20°C até o momento da análise.

2.3.2.3.3. Imuno-histoquímica para Ki-67, DCX, GFAP e MAP2

Os animais foram anestesiados com overdose de tiopental (Thiopentax[®], Cristália, Itapira-SP, Brasil) para posterior perfusão transcardíaca com 30 mL de salina (0,9%) seguida de 50 mL de solução de PFA 4% (pH=7,4) em tampão fosfato (PB) 0,2 M. Os cérebros foram removidos, pós-fixados em solução de PFA 4% em PB 0,2 M, por 2 h. Durante 72 h, os cérebros foram mantidos em solução de sacarose 30% em tampão fosfato salina (PBS) 0,1M a 4°C para crioproteção. Após congelamento adequado, mergulhando os cérebros em isopentano, sob refrigeração

de nitrogênio líquido, estes foram seccionados com o auxílio de um micrótomo criostato (Criocut 1800, Reichert-Jung, Heidelberg, Alemanha). As secções coronais (30 µm), coletadas em seis tubos de 5 mL contendo PBS acrescido de 1% de azido sódico, correspondiam a coordenadas estereotáxicas entre -1.70 a -2.70 mm, posteriores ao Bregma, de acordo com o atlas de Franklin e Paxinos (1997).

Para a detecção de Ki-67, DCX, GFAP e MAP2, as secções foram submetidas a sucessivas lavagens em PBS 0,1 M. Em seguida, incubadas em solução contendo 2% de soro albumina bovino (BSA) em PBS 0,1 M durante 60 min para o bloqueio de reações inespecíficas. As secções foram, então, incubadas com anticorpo *rabbit* anti-Ki-67 (1:200, Acris Antibodies), *goat* anti-DCX (1:300, Santa Cruz Biotechnology), *rabbit* anti-GFAP (1:500, Santa Cruz Biotechnology) ou *rabbit* anti-MAP2 (1:2000, Abcam) em solução de PBS 0,1 M acrescido de Triton-X 100 0,3%, contendo 2% de BSA e foram mantidas, *overnight*, sob agitação constante à 4°C. Após este período, as secções foram lavadas com PBS 0,1 M e, então, incubadas com os anticorpos secundários *rabbit* anti-*goat* ou *goat* anti-*rabbit* (1:500, Santa Cruz Biotechnology), biotinilados, em uma solução idêntica à utilizada para o anticorpo primário, e foram mantidas, sob agitação constante, à 4°C, por 2 h. Posteriormente, foram incubadas com o complexo avidina-biotina (ABC; Kit, Vector Laboratories) em PBS 0,1 M, sob agitação constante, à temperatura ambiente, por mais 2 h. A revelação foi realizada usando uma solução a 0,025% de 3,3,9-hidrocloreto de diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Alemanha) e 0,05% H₂O₂, acrescida ou não de solução de níquel (Ni) a 8% em tampão Tris/HCl. Após estes procedimentos, as secções foram adequadamente lavadas em PBS 0,1 M e montadas em lâminas previamente gelatinizadas. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram cobertas com Permount[®] (Fisher Scientific, New Jersey, EUA) e lamínulas.

2.3.3. Análise quantitativa

2.3.3.1. Células coradas pelo método de Nissl

Células piramidais gigantes exibindo núcleo e nucléolo distintos, bem como um citoplasma basofílico, foram consideradas como células aparentemente intactas (neurônios viáveis). Estas células foram quantificadas em toda a extensão das regiões CA1, CA2, CA3 e CA4 dos hemisférios hipocampais direito e esquerdo, das 4 secções/animal existentes na replicata, com o auxílio de um microscópio comum (Olympus BX-41), usando o aumento de 400 X. Foram feitas as médias das quatro secções/animal, para cada região de interesse, tanto para o hemisfério hipocampal direito quanto para o esquerdo. O número de células aparentemente intactas está expresso como média \pm erro padrão da média (EPM).

2.3.3.2. Células FJC-positivas

As células positivas para o FJC foram quantificadas, manualmente, nas 4 secções/animal existentes na replicata, nos subcampos hipocampais CA1, CA2, CA3 e CA4, utilizando um microscópio de fluorescência (Zeiss, Axioskop 2 Plus, Jena, Alemanha), no aumento de 400 X. Foram feitas as médias das quatro secções/animal, para cada região de interesse, tanto para o hemisfério hipocampal direito quanto para o esquerdo. O número de células FJC-positivas está expresso como média \pm EPM.

2.3.3.3. Células Ki-67 e DCX-positivas

As células positivas para Ki-67 e DCX foram contadas, manualmente, por toda a ZSG do GD hipocampal de ambos os hemisférios de 4 secções escolhidas aleatória e sistematicamente (Keith et al., 2008), correspondendo às coordenadas estereotáticas de -1,82 a -2,18 mm, posteriores ao Bregma (Franklin, Paxinos, 1997) em microscópio óptico comum (Olympus, BX41), com aumento de 400 X. O número de células Ki-67- e DCX-positivas está expresso como média \pm EPM.

2.3.3.4. Células GFAP-positivas

A quantificação para células GFAP-positivas foi realizada em 4 secções escolhidas aleatoriamente, correspondendo às coordenadas estereotáxicas de -1,82 a -2,18 mm, posteriores ao Bregma (Franklin, Paxinos, 1997). Inicialmente, as imagens foram capturadas das lâminas usando câmara de vídeo (QColor, Olympus, America Inc.), acoplada ao microscópio comum (Olympus, BX41). O campo visualizado, correspondendo, sempre, à camada molecular *lacunosum*, foi enviado para o sistema de edição e transferência de imagem (Q Capture Pro 6.0) e para o monitor de vídeo (AOC[®] 15,6" LED Widescreen). Em cada imagem capturada, com o auxílio do programa Image J, foi calculada a densidade óptica integrada (DOI), que corresponde à soma dos valores de *pixels* da área selecionada e é equivalente ao produto desta "área selecionada" e da DOI. A DOI foi obtida em áreas que consistiam em seleções de aproximadamente 38 μm^2 .

2.3.3.5. Células MAP2-positivas

Para quantificar as células MAP2-positivas foi utilizado o método estereológico de densidade de superfície, no qual um conjunto de linhas de teste (arcos ciclóides) foi sobreposto às imagens microscópicas obtidas em microscópio óptico comum (Olympus, BX41), com aumento de 1000 X. As intersecções, entre as linhas teste e os dendritos MAP2-positivos, foram contadas. A densidade de superfície dos processos dendríticos MAP2-positivos foi, então, calculada usando a fórmula: $S_v = 2 (I/ L)$; em que I é o número total de intersecções, somadas todas as amostras (32 campos microscópios aleatórios/animal), e L é o comprimento total da linha de teste na área de amostra (160 μm). A região demarcada para análise quantitativa abrangia sempre uma parte do *stratum radiatum* e do *stratum molecular*, seguindo uma linha paralela ao redor do CA1 hipocampal e das células granulares do GD. Em todas as amostras, o eixo vertical dos arcos das linhas de teste permaneceu alinhado paralelamente à orientação dos veios dendríticos dos neurônios piramidais e, quaisquer corpos celulares MAP2-positivos foram excluídos da quantificação (Baddeley et al. 1986). A densidade de superfície dos processos MAP2-positivos está expressa como média \pm EPM.

2.3.4. Análise estatística

Para as análises estatísticas, foi utilizado o pacote SAS (versão 9.3). Ambos os dados comportamentais e histológicos foram examinados para os pressupostos de normalidade, homocedasticidade e esfericidade (medidas repetidas).

2.3.4.1. Análise comportamental

Para o LAM, o desempenho de aprendizagem foi medido após 10 tentativas. Os valores obtidos, para cada camundongo, foram dados por cinco blocos, consistindo na média de duas tentativas consecutivas cada (latência em blocos). Os dados (em bloco) foram expressos como médias \pm erro padrão das médias para cada grupo. Foi realizada a ANOVA para medidas repetidas, considerando o grupo experimental como o fator independente e o bloco de teste (cinco blocos) como o fator de repetição. Os animais sham e os isquêmicos tratados com CBD foram comparados com camundongos isquêmicos tratados com o veículo, usando uma simples análise de contraste. *One-way* ANOVA foi utilizada para quantificar a latência total (soma das 10 tentativas) e o tempo gasto no quadrante correto. Diferenças com um valor de probabilidade de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

2.3.4.2. Quantificação das células Nissl, FJC, Ki-67, DCX, GFAP e MAP2-positivas

Os dados histológicos e imunohistoquímicos foram normalizados para os valores médios do grupo sham (coloração de Nissl, imuno-histoquímica para Ki-67, DCX, GFAP e MAP2) e isq veículo (histoquímica para FJC). Os valores foram analisados utilizando-se o modelo linear generalizado com a distribuição de Poisson para modelar os dados de contagem (número de células; Nissl, FJC, Ki-67 e DCX) e a distribuição Gamma as medições contínuas (DOI; GFAP), respectivamente. Para avaliar a quantificação da densidade de superfície dos processos MAP2-positivos, foi utilizada a análise de variância de um fator (*one-way* ANOVA), seguida do teste *post hoc* de Tukey. Diferenças com um valor de probabilidade de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

2.4. Resultados

2.4.1. Sobrevivência

No total, foram utilizados 81 animais para o experimento. Quinze desses animais foram utilizados como controle, o grupo sham. Dos 66 camundongos submetidos à ICGT, sete (10,6%) morreram após a recuperação completa da anestesia, provavelmente, refletindo um efeito grave e fatal da isquemia cerebral. Os 59 animais isquêmicos restantes foram distribuídos aleatoriamente em grupos tratados com veículo e CBD (Tabela 2).

Tabela 2: Taxa de sobrevivência de camundongos submetidos à oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC)

procedimento cirúrgico (ICGT ou sham)	número de animais submetidos às cirurgias	número de animais que sobreviveram	taxa de sobrevivência (%)
sham	15	15	100
isq veículo	26	23	88,5
isq CBD 3	12	11	91,6
isq CBD 10	16	14	87,5
isq CBD 30	12	11	91,6

2.4.2. Labirinto aquático de Morris (LAM)

O desempenho de aprendizagem e memória no LAM está demonstrado nas figuras 8 e 9. A latência para encontrar a plataforma foi medida em uma única sessão (dia) de 10 tentativas consecutivas, de 60 segundos cada, e está expressa como uma curva de aprendizado, em cinco blocos, com a média de duas tentativas consecutivas cada (latência em blocos) e latência total (soma das latências das 10 tentativas).

Primeiramente, foi avaliado o efeito do tratamento com CBD sobre camundongos falso operados submetidos ao LAM (Figura 8). Análise de variância de dois fatores (*two way ANOVA*) revelou que a latência para encontrar a plataforma diminuiu regularmente ao longo das tentativas para todos os grupos experimentais, porém, não foi observada diferença significativa entre os diferentes tratamentos com CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg) (latência em blocos: Figura 8A, $F_{3,112}=0,76$, $p>0,05$; latência total: Figura 8B, $F_{3,112}=0,76$, $p=0,53$; distância percorrida no quadrante correto: Figura 8C, $F_{3,112}=0,43$, $p=0,73$).

Ao avaliar o efeito do CBD sobre os prejuízos de aprendizagem causados pela OBACC em camundongos (Figura 9), ANOVA revelou que a latência para encontrar a plataforma diminuiu regularmente ao longo das tentativas para todos os grupos experimentais. Dessa maneira, os grupos sham e isquêmicos tratados com CBD (3, 10 e 30 mg/Kg) apresentaram uma diminuição significativa na latência para encontrar a plataforma, quando comparados com os camundongos isquêmicos tratados com veículo (Figura 9A, $F_{4,276}=20,5$, $p<0,001$). Um efeito significativo de tratamento foi encontrado, no parâmetro latência total, para todos os grupos (Figura 9B, $F_{4,73}=16,7$, $p<0,001$), quando comparados ao grupo isq veículo. Nenhuma diferença significativa foi encontrada no tempo gasto no quadrante correto (TQC) (Figura 9C).

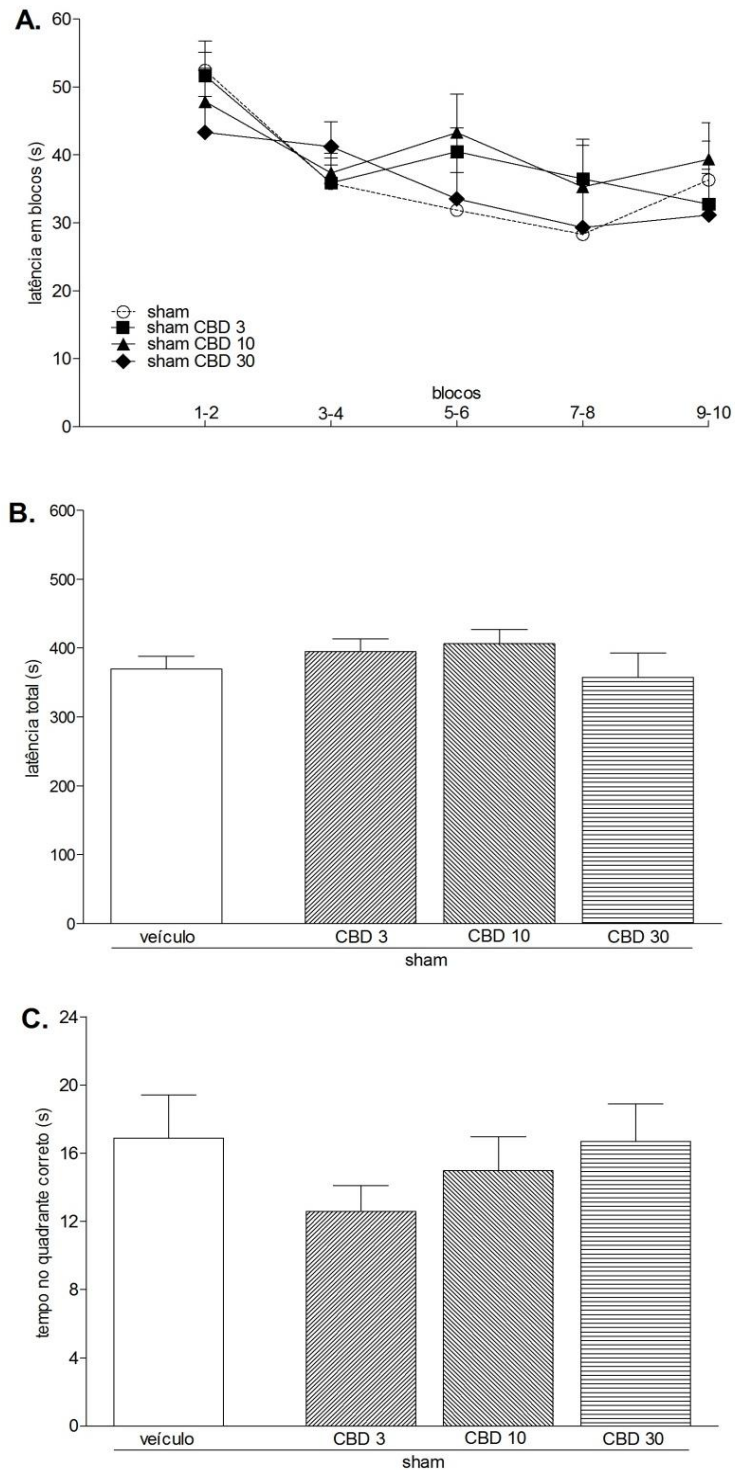


Figura 8: Efeito do tratamento com canabidiol (CBD) sobre camundongos submetidos ao labirinto aquático de Morris (LAM). Os animais receberam veículo ou CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg) 30 minutos antes, 3, 24 e 48 h após a falsa cirurgia (sham operados). O desempenho da aprendizagem foi avaliado 7 dias após a cirurgia e foi expressa pela latência para encontrar a plataforma, em 5 blocos, com a média de duas tentativas cada (A, latência em blocos) e latência total (B, soma das latências das 10 tentativas). A retenção da memória foi dada pelo tempo gasto no quadrante correto durante o teste, que se realizou em uma única tentativa de 60 s, 8 dias após a ICGT (C). Os valores são expressos pela média \pm EPM dos grupos: camundongos sham tratados com veículo (sham, n=8), camundongos sham tratados com CBD 3 (sham CBD 3, n=8), 10 (sham CBD 10, n=7), ou 30 (sham CBD 30, n=9) mg/Kg. Para todos os parâmetros analisados, $p > 0,05$.

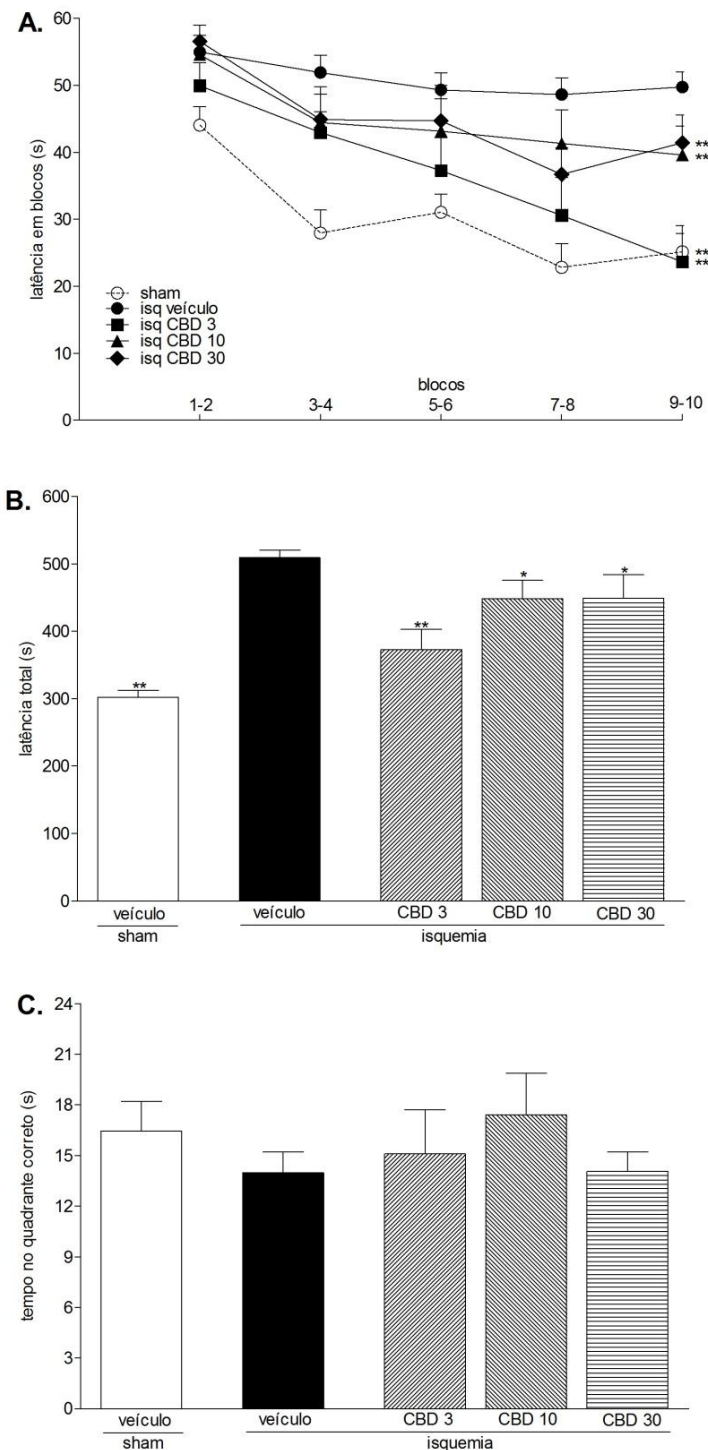


Figura 9: Efeito do CBD sobre os prejuízos de aprendizagem causados pela oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC) em camundongos. Os animais receberam veículo ou CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg) 30 minutos antes, 3, 24 e 48 h após a cirurgia. O desempenho da aprendizagem foi avaliado 7 dias após a OBACC e foi expressa pela latência para encontrar a plataforma, em 5 blocos, com a média de duas tentativas cada (A, latência em blocos) e latência total (B, soma das latências das 10 tentativas). A retenção da memória foi dada pelo tempo gasto no quadrante correto durante o teste, que se realizou em uma única tentativa de 60 s, 8 dias após a OBACC (C). Os valores são expressos pela média \pm EPM dos grupos: camundongos sham tratados com veículo (sham, n=15), camundongos isquêmicos tratados com veículo (isq veículo, n=23), camundongos isquêmicos tratados com CBD 3 (isq CBD 3, n=11), 10 (isq CBD 10, n=14), ou 30 (isq CBD 30, n=11) mg/ Kg. *p<0,05, **p<0,001 em comparação com grupo isq veículo.

2.4.3. Coloração de Nissl

Fotomicrografias representativas da coloração de Nissl no hipocampo são mostradas na figura 10. OBACC resultou em uma neurodegeneração grave no hipocampo, como evidenciado pela presença de neurônios encolhidos, com núcleos picnóticos (Figura 10). Os dados foram normalizados para os valores médios do grupo sham. Comparada com o grupo sham, a OBACC causou perda significativa de células aparentemente intactas em todos os subcampos hipocamais (Figura 10B; CA1, CA2, CA3 e CA4, $\chi^2=6337,54$, $p<0,0001$). O modelo estatístico linear generalizado também mostrou uma diferença significativa entre os grupos isq CBD 10 e isq CBD 30, quando comparados ao grupo isq veículo ($p<0,05$), indicando que a dose de 10 mg/Kg mostrou-se mais eficaz na atenuação do efeito neurodegenerativo da isquemia cerebral.

2.4.4. Histoquímica para FJC

FJC cora, principalmente, corpos celulares de neurônios em degeneração e, ocasionalmente, pode corar também seus processos (Schmued et al., 2005). A maioria dos neurônios FJC-positivos foram detectados no subcampo CA1 do hipocampal (Figura 10C), que são similares às da redução de neurônios corados com pelo método de Nissl (Figura 10B). Nenhuma célula FJC-positiva foi observada em animais do grupo sham. Os dados foram normalizados para os valores médios do grupo isq veículo. A análise estatística revelou uma diminuição significativa no número de células FJC-positivas no hipocampo de animais isquêmicos tratados com CBD (3, 10 e 30 mg/Kg), quando comparados aos animais isquêmicos tratados com veículo ($\chi^2=1656,90$, $p<0,0001$).

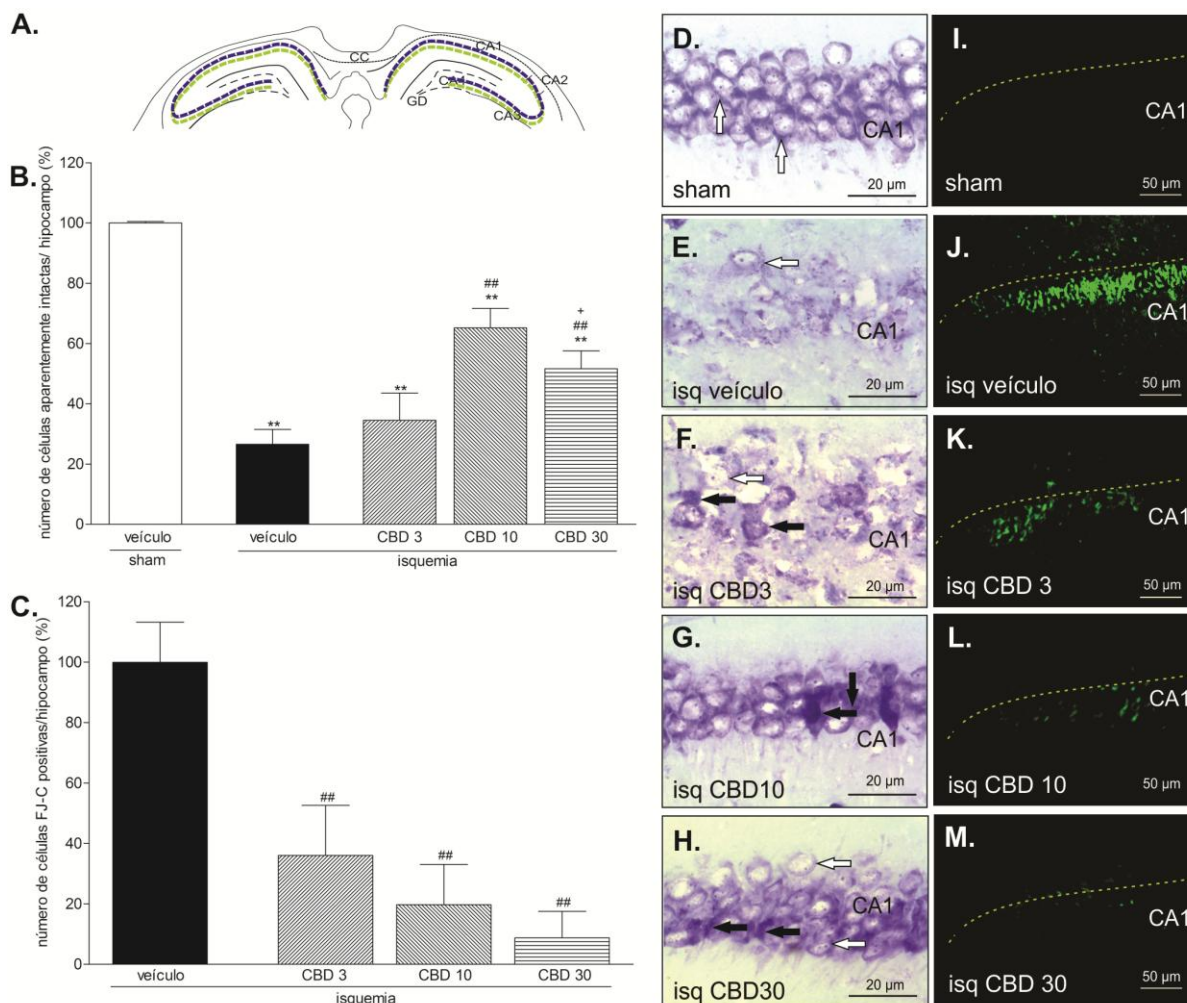


Figura 10: Efeito do CBD na sobrevivência celular (coloração de Nissl) e na degeneração (histoquímica para Fluoro-Jade-C (FJC)) após OBACC em camundongos. Análise histológica foi feita por toda a extensão das regiões CA1, CA2, CA3 e CA4 dos hemisférios hipocâmpais 7 dias após a OBACC. (A) Esquema representativo de uma seção coronal cerebral, correspondendo às coordenadas estereotáticas entre -1,70 e -2,70 mm posteriores ao Bregma (Franklin and Paxinos, 1997). Em (B) e (C), as colunas representam a média \pm EPM de células marcadas pela coloração de Nissl (n=6-15) ou pela histoquímica para FJC (n=5-8), respectivamente. Os dados foram normalizados para os valores médios do grupo sham (coloração de Nissl) e isq veículo (histoquímica para FJC), respectivamente. **p<0,001 comparados ao grupo sham; ##p<0,001 comparados ao grupo isq veículo e +p<0,05 comparado ao grupo isq CBD 3. Fotomicrografias representativas dos subcampos CA1 hipocâmpais contendo células Nissl-(D-H) e FJC-(I-M) positivas para cada grupo experimental. Setas brancas indicam células aparentemente intactas no CA1 e setas pretas indicam células escuras com núcleo picnótico, indicando degeneração.

2.4.5. Imuno-histoquímica

2.4.5.1. Ki-67

Os núcleos corados das células Ki-67-positivas aparecem escuros e distribuídos uniformemente pela camada celular da ZSG do GD hipocampal, onde são tipicamente encontrados e, frequentemente, aparecem agrupados ou em *clusters* (Figura 11). A análise estatística demonstrou um aumento significativo na quantidade de células Ki-67-positivas no GD dos grupos isq veículo, isq CBD 3 e isq CBD 10, quando comparados ao grupo sham. Em contraste, o grupo isq CBD 30 mostrou uma diminuição significativa no número de células Ki-67-positivas, quando comparado ao grupo sham (Figura 11B; $\chi^2=744,12$, $p<0,0001$). Em comparação com o grupo isq veículo, os grupos isq CBD 10 ($p<0,0001$) e 30 ($p<0,0001$) reduziram significativamente o número de células Ki-67-positivas. Enfim, quando comparados ao grupo isq CBD 3, os grupo isq CBD 10 ($p<0,0001$) e isq CBD 30 ($p<0,0001$) também demonstram uma diminuição significativa no número de células Ki-67-positivas na ZSG do GD hipocampal.

2.4.5.2. DCX

A análise estatística demonstrou um aumento significativo na quantidade de neurônios DCX-positivos no GD dos grupos isq veículo e isq CBD 10, quando comparados ao grupo sham (Figura 12). Em contraste, os grupos isq CBD 3 e isq CBD 30 mostraram uma diminuição significativa no número de neurônios DCX-positivos, quando comparados ao grupo sham (Figura 12B; $\chi^2=146,58$, $p<0,0001$). Em comparação com o grupo isq veículo, os grupos isq CBD 3 ($p<0,0001$) e 30 ($p<0,0001$) apresentaram redução significativa do número de neurônios DCX-positivos, enquanto para o grupo isq CBD 10 ($p=0,02$) houve um aumento desse número. Enfim, quando comparados ao grupo isq CBD 3, os grupo isq CBD 10 ($p<0,0001$) e isq CBD 30 ($p=0,0003$) demonstram um aumento no número de neurônios DCX-positivos na ZSG do GD hipocampal.

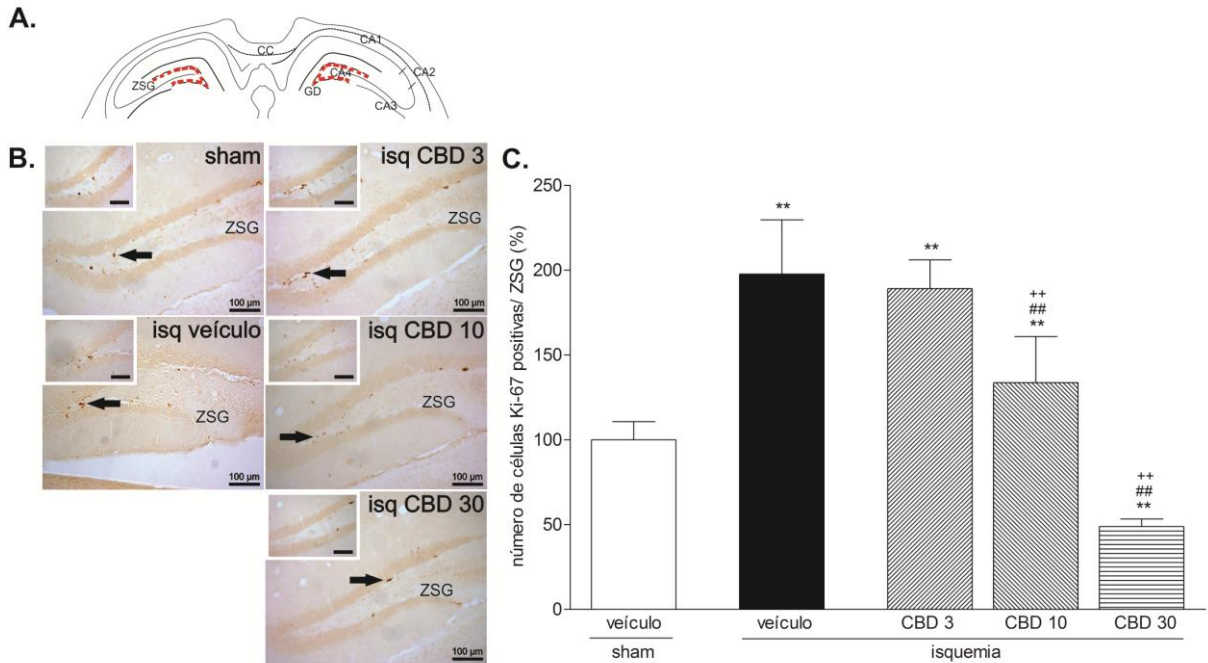


Figura 11: Efeito do CBD sobre a proliferação celular na ZSG do GD hipocampal de camundongos submetidos à OBACC. Os animais receberam administração *i.p.* de veículo ou CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg) 30 minutos antes, 3, 24 e 48 h após a OBACC. Logo após o LAM, no oitavo dia após a reperusão, os animais tiveram seus cérebros adequadamente retirados e processados para a detecção imuno-histoquímica do Ki-67 para verificação da proliferação celular. Células positivas para Ki-67 foram quantificadas por toda a extensão da ZSG, conforme indicado (em vermelho) no esquema representativo de uma seção coronal cerebral, correspondendo às coordenadas estereotáticas entre -1,70 e -2,70 mm posteriores ao Bregma (Franklin and Paxinos, 1997), em (A). Em (B), fotomicrografias representativas da imuno-histoquímica para Ki-67 mostram as alterações quantitativas na expressão de células Ki-67-positivas entre os grupos analisados. Em (C), as colunas representam a média \pm EPM no número de células Ki-67-positivas dos diversos grupos experimentais ($n=5-8$). Os dados foram normalizados para os valores médios do grupo sham. ** $p<0,001$, comparados ao grupo sham; ### $p<0,001$, comparados ao grupo isq veículo; ## $p<0,001$, comparados ao grupo isq CBD 3. Barras nas fotomicrografias = 100 μ m; barras nos detalhes = 50 μ m.

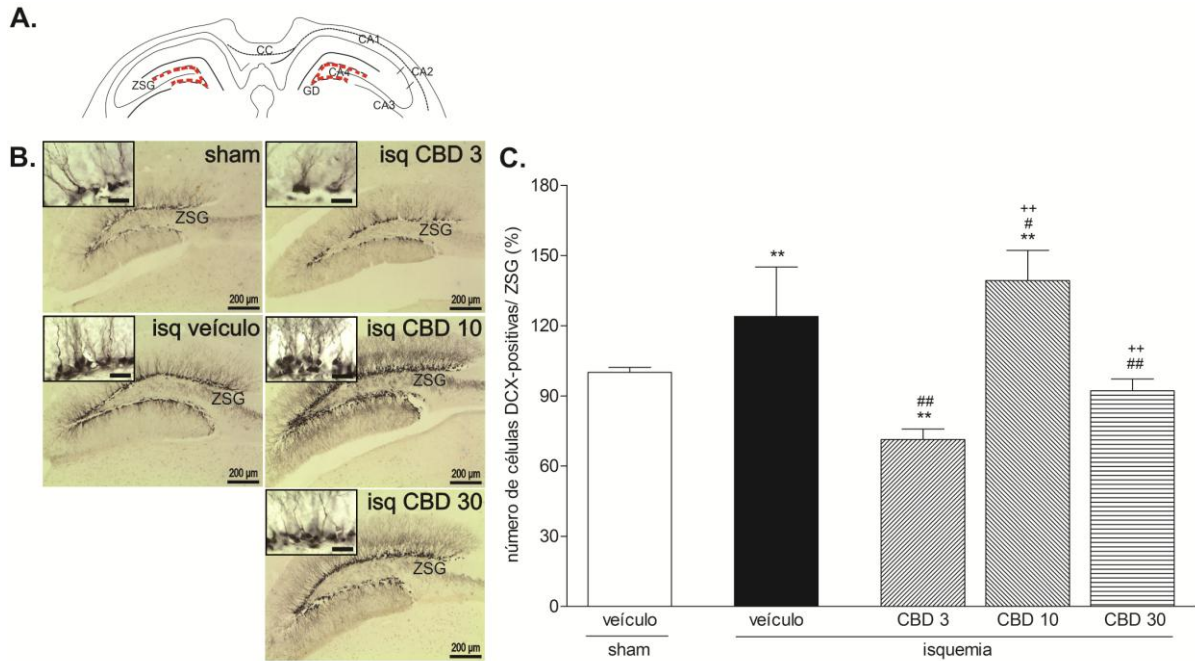


Figura 12: Efeito do CBD sobre o número de neurônios *doublecortin* (DCX)-positivos na ZSG do GD hipocampal de camundongos submetidos à OBACC. Os animais receberam administração *i.p.* de veículo ou CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg) 30 minutos antes, 3, 24 e 48 h após a OBACC. Logo após o LAM, no oitavo dia após a reperfusão, os animais tiveram seus cérebros adequadamente retirados e processados para a detecção imuno-histoquímica da DCX, um marcador de neuroblastos jovens, para verificação de neurogênese. Células positivas para DCX foram quantificadas por toda a extensão da ZSG do GD hipocampal, conforme indicado (em vermelho) no esquema representativo de uma seção coronal cerebral, correspondendo às coordenadas estereotáticas entre -1,70 e -2,70 mm posteriores ao Bregma (Franklin and Paxinos, 1997), em (A). Em (B), fotomicrografias representativas da imuno-histoquímica para DCX mostram as alterações quantitativas na expressão de células DCX-positivas entre os grupos analisados. Em (C), as colunas representam a média \pm EPM no número de células DCX-positivas dos diversos grupos experimentais ($n=5-8$). Os dados foram normalizados para os valores médios do grupo sham. * $p<0,05$ e ** $p<0,001$, comparados ao grupo sham; ## $p<0,001$, comparados ao grupo isq veículo; ++ $p<0,001$, comparados ao grupo isq CBD 3. Barras nas fotomicrografias = 200 μm ; barras nos detalhes = 25 μm .

2.4.5.3. GFAP

A expressão de células GFAP-positivas está demonstrada na figura 13. OBACC aumentou significativamente a DOI dos grupos isq veículo ou isq CBD 3, quando comparados ao grupo sham ($\chi^2=17,63$, $p=0,001$). Em comparação com o grupo isq veículo, CBD 30 reduziu significativamente a DOI de células GFAP-positivas no grupo isq veículo ($p=0,0003$) e isq CBD 3 ($p=0,001$).

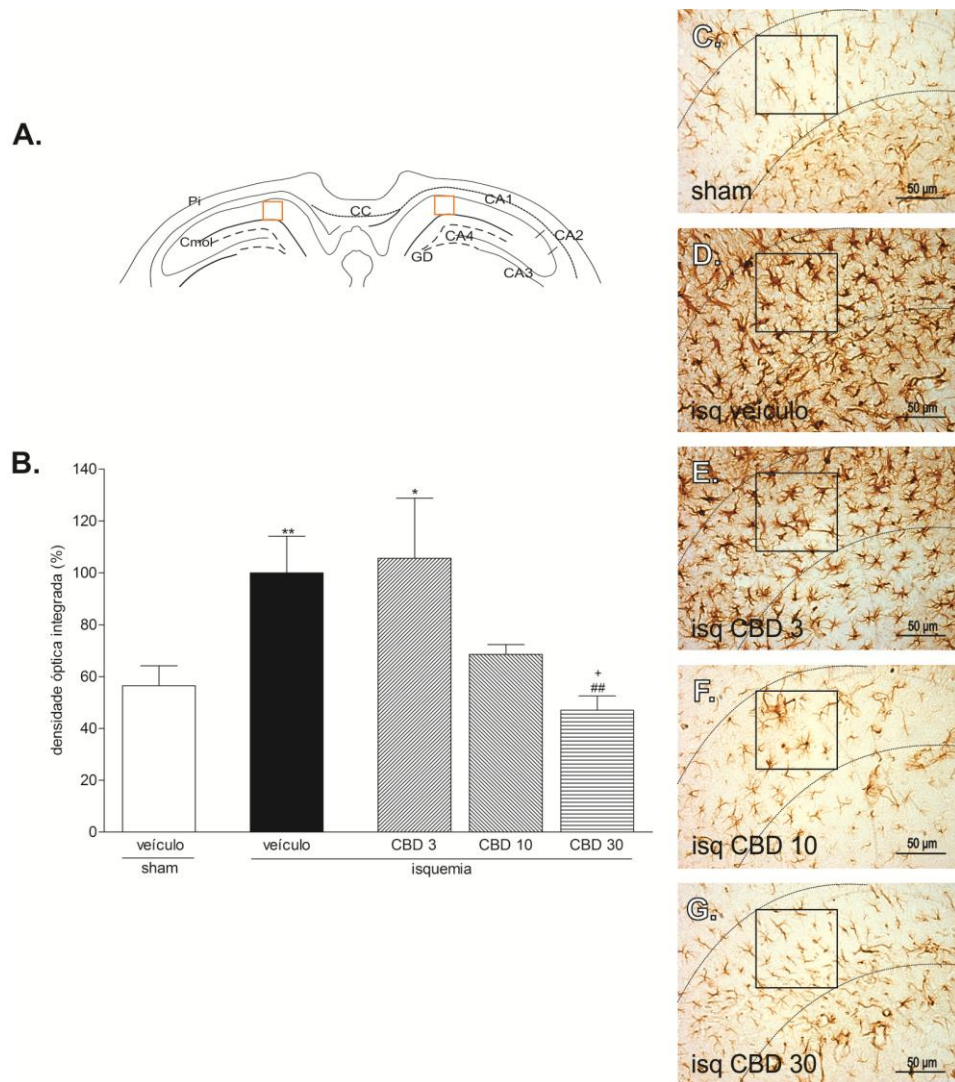


Figura 13: Efeito do CBD sobre a expressão de células *glial fibrillary acidic protein* (GFAP)-positivas após OBACC em camundongos. (A) Esquema representativo de uma secção coronal cerebral contendo o hipocampo com a área selecionada (em alaranjado), de onde foram obtidas as densidades ópticas integradas (DOI) da imuno-histoquímica para GFAP. Em (B), as colunas representam a média \pm EPM das DOI das células GFAP-positivas dos diversos grupos experimentais ($n=5-8$). Os dados foram normalizados para os valores médios do grupo sham. ** $p<0,001$ e * $p<0,05$, comparados ao grupo sham; ## $p<0,001$, comparado ao grupo isq veículo; + $p<0,05$, comparado ao grupo isq CBD3. (C-G) Fotomicrografias representativas da imuno-histoquímica para GFAP, mostrando alterações morfológicas na expressão de GFAP do grupo isq veículo, quando comparado ao grupo sham. Os detalhes em (A) e (C-G) mostram a área selecionada em que as DOI da imuno-histoquímica para GFAP foram avaliadas. Pi: camada celular piramidal; Cmol: camada molecular lacunosum; GD: giro denteado.

2.4.5.4. MAP2

ANOVA demonstrou que o tratamento com CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg) não alterou as densidades de superfície dos processos MAP2-positivos no subcampo CA1 do hipocampo de camundongos submetidos à OBACC (Figura 14B, $F_{4,22}=0,07$, $p=0,99$).

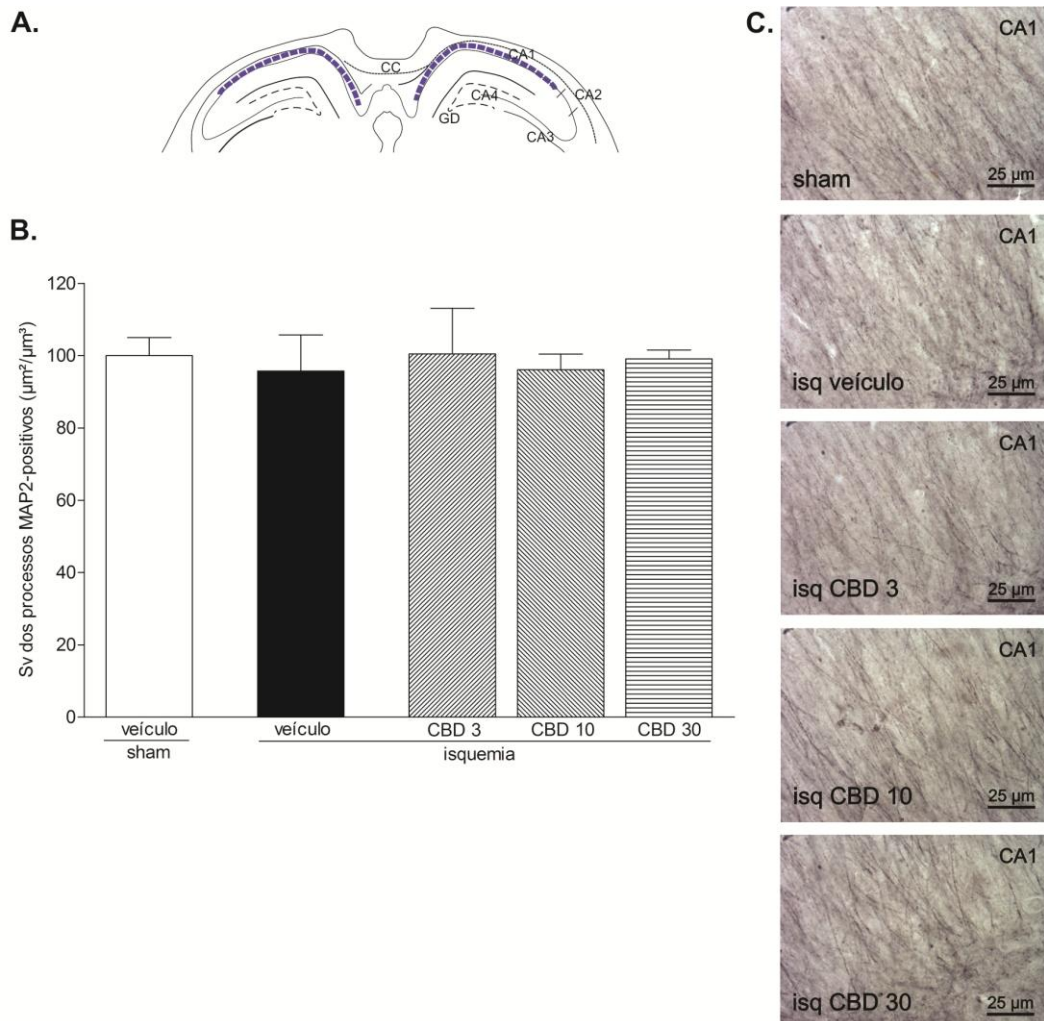


Figura 14: Efeito do CBD sobre os processos *microtubule-associated protein 2* (MAP2)-positivos após OBACC em camundongos. Os animais receberam administração *i.p.* de veículo ou CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg) 30 minutos antes, 3, 24 e 48 h após a OBACC. Logo após o LAM, no oitavo dia após a reperfusão, os animais tiveram seus cérebros adequadamente retirados e processados para a detecção imuno-histoquímica da MAP2 para análise da reestruturação dendrítica após OBACC. (A) Esquema representativo de uma secção coronal cerebral, correspondendo às coordenadas estereotáxicas entre -1,70 e -2,70 mm posteriores ao Bregma (Franklin and Paxinos, 1997). Em (B), as colunas representam a média \pm EPM da densidade de superfície dos processos MAP2-positivos no subcampo CA1 do hipocampo de camundongos submetidos à OBACC. Os dados foram normalizados para os valores médios do grupo sham. Em (C), fotomicrografias representativas da imuno-histoquímica para MAP2 confirmam, visualmente, que não houve alterações quantitativas na densidade de superfície dos processos MAP2-positivos dos diversos grupos experimentais (n=3-5). O detalhe, de azul, em (A), destaca o subcampo CA1 do hipocampo, onde foram quantificadas as densidades de superfície dos processos MAP2-positivos.

Tabela 3: Resumo dos resultados obtidos no capítulo 1.

Resultados comparados ao grupo sham – CBD em mg/Kg			ISQUÊMICOS			
			veículo	CBD 3	CBD 10	CBD 30
Comportamento	LAM	lat. blocos	aumenta	igual	igual	igual
		lat. total	aumenta	igual	igual	igual
		TQC	igual	igual	igual	igual
Histologia		Nissl	diminui	diminui	diminui	diminui
Histoquímica		FJC	diminui	diminui	diminui	diminui
Imuno-histoquímica		Ki-67	aumenta	aumenta	aumenta	diminui
		DCX	aumenta	diminui	aumenta	diminui
		GFAP	aumenta	aumenta	igual	igual
		MAP2	igual	igual	igual	igual

2.5. Discussão

Os resultados obtidos mostraram que o CBD diminui o prejuízo comportamental e a neurodegeneração hipocampal em resposta à isquemia cerebral em camundongos. O tratamento com CBD (3, 10 e 30 mg/Kg) 30 min antes, 3, 24 e 48 h após a OBACC, melhorou o desempenho de aprendizagem espacial em camundongos testados no LAM 7 dias após o insulto isquêmico. A coloração de Nissl mostrou um aumento na sobrevivência celular hipocampal em animais isquêmicos tratados com CBD, sugerindo um efeito neuroprotetor desta droga na morte neuronal induzida pela isquemia. Por outro lado, o número de células em vias de degeneração (FJC-positivas) mostrou-se reduzido nos grupos isquêmicos tratados com CBD. Quanto à proliferação celular, ficou claro que o tratamento com CBD, atuou, de forma dual, aumentando (3 e 10 mg/Kg) e diminuindo (30 mg/Kg) o número de células Ki-67-positivas na ZSG do GD hipocampal de animais isquêmicos. Ao considerar a neurogênese, observou-se que o tratamento com CBD resultou em curva dose-efeito em formato de “U” invertido, aumentando (10 mg/Kg) e diminuindo (3 e 30 mg/Kg) o número de neurônios DCX-positivos na ZSG do GD hipocampal de animais isquêmicos. As DOI para GFAP foram diminuídas em animais isquêmicos tratados com CBD (10 e 30 mg/Kg). O tratamento com CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg) não alterou as densidades de superfície dos processos MAP2-positivos no subcampo CA1 do hipocampo de camundongos isquêmicos. Esses resultados sugerem que os efeitos protetores do CBD sobre a sobrevivência de células do hipocampo e a recuperação funcional após OBACC pode estar envolvido com a inibição da astrogliose concomitante à indução da neurogênese.

Sabe-se que a OBACC induz prejuízos comportamentais em modelos de esquiva passiva e memória espacial em camundongos (Kumaran et al., 2008; Zhang et al., 2010; Bora et al., 2011; Soares et al., 2013). No presente estudo, camundongos isquêmicos demonstraram um aumento na latência para encontrar a plataforma no LAM, indicando um prejuízo na aprendizagem espacial. Esses prejuízos espaciais foram minimizados pela administração de CBD (3, 10 e 30 mg/Kg) 30 min antes, 3, 24 e 48 h após a OBACC.

Esses resultados estão consistentes com estudos anteriores que relataram efeitos protetores do CBD sobre a recuperação funcional após isquemia focal

(Hayakawa et al., 2009), isquemia induzida por hipóxia (IIH) (Pazos et al., 2012) e estende os efeitos do CBD sobre a isquemia cerebral global em camundongos.

CBD (10 e 30 mg/Kg) aumentou significativamente o número de células aparentemente intactas, coradas por Nissl e diminuiu o número de células FJC-positivas no hipocampo de animais isquêmicos. Estes resultados indicam que o CBD não só promoveu a recuperação funcional, como também diminuiu a perda de células do hipocampo e atenuou os processos neurodegenerativos induzidos pela isquemia cerebral global em camundongos. Apesar dos danos hipocampais observados, os animais tratados com o CBD (3 mg/Kg) foram capazes de aprender a tarefa e executá-la em nível semelhante aos animais controles. Essa descoberta sugere que o efeito do CBD, sobre a cognição, seja distinto do dano estrutural no hipocampo. Portanto, uma questão é como o CBD 3 mg/Kg pode ter facilitado o aprendizado, apesar de causar lesão do hipocampo? Particularmente, a disfunção de comportamentos complexos e a recuperação funcional podem refletir alterações nos níveis subcelular, sináptico ou eletrofisiológico, ou mesmo alterações morfológicas generalizadas que não estão restritas a uma única estrutura do cérebro, como o hipocampo (De La Tremblaye, Plamondon, 2011). Na verdade, os estudos existentes raramente avaliam os danos neuronais fora do hipocampo em relação a prejuízos comportamentais consequentes à isquemia global. Apenas alguns autores têm demonstrado alterações induzidas pela isquemia na atividade celular em regiões cerebrais fora do hipocampo, que poderiam ter um impacto significativo sobre a recuperação comportamental após isquemia. Como exemplo, Caruana e colaboradores (2008), relataram atividade de eletroencefalograma (EEG) epileptiforme nas regiões subcortical do subcampo CA1 hipocampal, no córtex perirrinal e no córtex pré-frontal após 15 minutos de isquemia global em ratos. Além disso, perdas significativas de neurônios positivos para o fator de liberação de corticotropina (CRF) foram demonstrados na amígdala seis semanas após IIH (Carty et al., 2010), um fenômeno associado com hiperatividade em resposta a uma nova exposição ao campo aberto em ratos isquêmicos. Em humanos, a redução do volume da amígdala tem sido correlacionada em pacientes que sofreram acidente vascular cerebral (AVC) e sobreviventes de paradas cardíacas, com deficiências cognitivas (Sachdev et al., 2007). Esses resultados sustentam a sugestão de que

outros fatores, além da lesão do hipocampo, podem influenciar o rendimento comportamental após a isquemia cerebral. No entanto, se o tratamento com CBD forneceria efeitos protetores temporários ou duradouros sobre os resultados neuro-histológicos resultantes da OBACC em camundongos, ainda permanece incerto. O grau de neuroproteção proporcionada por outras drogas, tais como o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropiônico, um antagonista de receptores AMPA, o NBQX, um bloqueador de canais de cálcio SNX e o antagonista não competitivo MK801 de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), tem-se demonstrado diminuído quando o tempo da análise pós-isquemia é estendido dos 7 aos 30 dias (Corbett, Crooks 1997; Corbett, Nurse, 1998).

O efeito protetor do CBD não se limitou aos neurônios, estendendo-se aos astrócitos. A administração de CBD 30 mg/Kg diminuiu a reatividade de astrócitos induzida por OBACC, sugerindo que eles podem estar envolvidos no efeito neuroprotector do CBD observado anteriormente. Os astrócitos são o tipo de células mais numerosas no cérebro e estão, dinamicamente, envolvidos na transmissão sináptica, na homeostase iônica e metabólica, na resposta anti-inflamatória, e na defesa antioxidante (Robel et al., 2011). Um aumento na expressão de astrócitos, caracterizado por um aumento da proliferação celular, da hipertrofia das células, e o aumento da expressão de filamentos intermediários GFAP e vimentina-positivos (Robel et al. 2011), tem sido demonstrado em quase todos os tipos de lesões do sistema nervoso central, incluindo isquemia cerebral focal (Cheung et al., 1999; Mao et al., 2011) e global e transitória (Kindy et al., 1992; Norenberg, 1996; Ridet et al., 1997). Os resultados desse estudo são consistentes com outros já relatados. Porém, os astrócitos podem exercer efeitos tanto benéficos como prejudiciais durante o reparo do tecido cerebral lesionado (Stoll et al., 1998; Robel et al., 2011). Os astrócitos secretam neurotrofinas e podem fornecer um substrato permissivo para apoiar a reorganização axonal durante a lesão. Porém, uma reatividade sustentada de astrócitos pode tornar-se um grande impedimento à regeneração e proteção axonal (Lee et al., 1996; Ridet et al., 1997). Por exemplo, quando os filamentos GFAP sofrem, geneticamente, ablação em camundongos, eles desenvolvem menos cicatrizes densas e mostram melhora na regeneração pós-traumática após hemiseção da medula espinal e aumentam a sobrevivência e a diferenciação das

células-tronco transplantadas (Pekny, Pkna, 2004; Pekny, Nilsson, 2005). Além disso, o aumento da imunorreatividade para GFAP, no subcampo CA1 hipocampal, após isquemia cerebral, tem sido associada à extensão da maturação e da necrose neuronal (Petito, Halaby, 1993; Stoll et al., 1998). Portanto, a diminuição de astrócitos em camundongos tratados com CBD pode ter influenciado a morte neuronal induzida pelo insulto isquêmico. No entanto, a inibição da astrogliose pelo CBD pode ser uma consequência, não a causa, da redução dos danos neuronais provocados pelo CBD. Experimentos adicionais que abordem o mecanismo de proteção e a sinalização do CDB precisam ser conduzidos.

Concomitante com a neurodegeneração e a inibição da astrogliose hipocampais significativas, sabe-se que o aumento da neurogênese aparece após isquemia cerebral global em ratos e gerbils (Nakatomi et al., 2002; Raber et al., 2004; Kawai et al., 2004; Bendel et al., 2005; Briones et al., 2006). Neste estudo, quando se considerou a proliferação celular, ficou claro que o tratamento com CBD, atuou, de forma dual, aumentando (3 e 10 mg/Kg) e diminuindo (30 mg/Kg) o número de células Ki-67-positivas na ZSG do GD hipocampal de animais isquêmicos. Esses resultados estão de acordo com a literatura, pois confirmam que a proliferação hipocampal é estimulada após um insulto isquêmico em roedores (Soares et al., 2013; Schiavon et al., 2010). Da mesma forma, ao olhar para a neurogênese, observou-se que o tratamento com CBD, aumentou (10 mg/Kg) e diminuiu (3 e 30 mg/Kg) o número de neurônios DCX-positivos na ZSG do GD hipocampal de animais isquêmicos. Estes resultados indicam que a administração de CBD também a nível molecular e não apenas comportamental, resulta em curvas dose-resposta em formato de "U" invertido (Zanelati et al., 2010; Campos et al., 2012). Serão necessários experimentos adicionais para se estudar os mecanismos envolvidos nestas respostas.

Em ratos, o modelo de ICGT resulta em uma diminuição na densidade de superfície dos processos MAP2-positivos (Briones et al., 2006). Neste estudo, não observamos efeitos da OBACC ou tratamento com CBD alteraram expressão da MAP2. É possível que os diferentes métodos experimentais, dose e espécies animais empregados contribuam para as discrepâncias observadas.

A neuroproteção mediada por CBD após isquemia cerebral experimental, geralmente, tem sido associada com a modulação da neurotoxicidade, da inflamação e do estresse oxidativo (Castillo et al., 2010; Pazos et al., 2012). Estudos farmacológicos demonstraram que os receptores 5HT_{1A} (serotoninérgicos), CB₂ (canabinoide), e os de adenosina também estão envolvidos no efeito neuroprotector do CBD no cérebro isquêmico imaturo (Castillo et al., 2010; Lafuente et al., 2011; Pazos et al., 2012). Recentemente, foi proposto que o CBD exerce seus efeitos, sobre a lesão cerebral, inibindo a diferenciação astrogliar de células-tronco neurais (Shinjyo, Di Marzo, 2013), um efeito que pode ser prejudicial para a neurogênese (Robel et al., 2011; Colangelo et al., 2012). O CBD diminuiu marcadamente a astrogliose pela ativação de receptores peroxissomas proliferativos seguido da neurotoxicidade da β -amilóide, que, por sua vez, resultou em neuroproteção (Esposito et al., 2011).

2.6. Conclusão

Os efeitos protetores do CBD sobre a morte das células do hipocampo, confirmada pelo número reduzido de células Nissl- e FJC-positivas em animais isquêmicos, e a recuperação funcional, observada pela melhora no desempenho de aprendizagem espacial no LAM, após OBACC podem envolver tanto a inibição da astrogliose, comprovada pela diminuição das DOI para GFAP em animais isquêmicos tratados com CBD (10 e 30 mg/Kg), como os efeitos sobre a proliferação celular, relatada pelo aumento no número de células Ki-67-positivas na ZSG do GD de animais isquêmicos tratados com CBD (3 e 10 mg/Kg) e a neurogênese, conforme observado pelo aumento no número de células DCX-positivas na ZSG do GD de animais isquêmicos tratados com CBD (10 mg/Kg). Por outro lado, o tratamento com CBD não alterou as densidades de superfície dos processos MAP2-positivos no subcampo CA1 do hipocampo de camundongos isquêmicos. Portanto, permanece a ser investigado se há outros mecanismos moleculares envolvidos na neuroproteção induzida pelo CBD após isquemia cerebral global.

3. CAPÍTULO 2

Efeito do tratamento repetido com CBD sobre o comportamento emocional de camundongos: relação com a neurogênese hipocampal

3.1. Introdução

O termo neurogênese refere-se à proliferação e diferenciação de células-tronco ou células progenitoras em neurônios (Balu, Lucki, 2009). Em cérebro de mamíferos adultos, a neurogênese ocorre, preferencialmente, em áreas discretas, conhecidas como nichos neurogênicos, os quais são bem caracterizados na ZSG do GD do hipocampo, e na ZSV das paredes dos ventrículos laterais (Patrício et al., 2013). Em ambos os nichos, como em regiões não-neurogênicas do cérebro adulto, células astrogliais, em condições adequadas, podem agir como precursores neuronais (Seri et al., 2001). Neuroblastos que nascem na ZSV, migram através do FMR até o BO, onde se diferenciam, mais comumente, em interneurônios inibitórios (Lois, Alvarez-Buylla, 1993; Doetsch et al., 1999). Já as células precursoras presentes na ZSG do GD, migram para a CCG do hipocampo onde se maturam em células granulares excitatórias e se integram ao circuito hipocampal (Balu, Lucki, 2009). Em outras regiões cerebrais, como córtex, amígdala, hipotálamo e substância negra, a neurogênese também é observada, porém em menor extensão e, frequentemente, associada a condições não fisiológicas (Patrício et al., 2013).

A neurogênese no cérebro adulto é um processo altamente dinâmico que se inicia com a proliferação de células progenitoras que, então, maturam-se e se diferenciam em neurônios funcionais (Balu, Lucki, 2009). A neurogênese pode ser estimulada por ambientes enriquecidos, exercício e aprendizagem, mas também pode ser inibida pelo estresse e aumento da idade (envelhecimento). Do ponto de vista das doenças neuropsiquiátricas, enquanto que convulsões (Parent, 2003) ou isquemia cerebral (Kokaia et al., 2003; Parent, 2003), aumentam a proliferação celular nas ZSG e ZSV, a apresentação de estresse físico ou psicossocial, empregados, frequentemente, em modelos animais de depressão, diminui a proliferação celular na ZSG do hipocampo. Drogas psicotrópicas também regulam a neurogênese e, aparentemente, de forma diferencial em relação aos seus estágios (proliferação, diferenciação e sobrevivência) e nichos neurogênicos (ZSG e ZSV) (Duman et al., 2001). A administração crônica de ADs de diversas classes, incluindo os ADs tricíclicos, inibidores de recaptção da 5-HT e NA, os inibidores da monoaminoxidase e o lítio, aumentam a proliferação celular e a sobrevivência de neurônios na ZSG (Malberg et al., 2000; Chen et al., 2000). Por outro lado, outros

compostos psicotrópicos, como o antipsicótico haloperidol e o opóide morfina não alteram a neurogênese hipocampal e podem, até mesmo, diminuí-la (Dawirs et al., 1998; Eisch et al., 2000; Malberg et al., 2000). Entretanto, observou-se um aumento significativo da neurogênese na ZSV de ratos e apenas uma tendência para aumento na ZSG após tratamento crônico com antipsicóticos atípicos, como a risperidona e a olanzapina (Wakade et al., 2002). Em outro estudo, o efeito pró-neurogênico da clozapina foi observado apenas após a administração de baixas doses (0,5 mg/Kg, 14 dias), enquanto, em altas doses (20 mg/Kg), a clozapina não alterou a proliferação ou neurogênese hipocampais (Halim et al., 2004).

Inicialmente acreditado como isento de atividade psicoativa, o CBD, um dos principais componentes da *Cannabis sativa*, produziu inúmeros e variados efeitos sobre o SNC. Pesquisas realizadas em voluntários sadios mostraram que a administração oral de CBD reverteu os efeitos ansiogênicos induzidos pelo Δ^9 -THC (Zuardi et al., 1982) e diminuiu a ansiedade no teste de falar em público (Zuardi et al., 1993). Em animais de laboratório, o CBD apresentou propriedades tipo-ansiolítica em diversos modelos experimentais de ansiedade, como o teste de conflito de Vogel (Moreira et al., 2006) e o teste do medo condicionado ao contexto (Reestel et al., 2006). O CBD também diminuiu as respostas defensivas evocadas por ratos em exposição a um predador (Campos, Guimarães, 2008) e reduziu o comportamento de esconder esferas, um modelo que avalia o comportamento tipo transtorno obsessivo compulsivo em ratos (Casarotto et al., 2010).

Além de sua potencial atividade ansiolítica, evidências clínicas e experimentais indicam que o CBD apresenta um perfil comportamental e neuroquímico semelhante aos antipsicóticos atípicos. Em pacientes voluntários, o CBD atenuou sintomas de esquizofrenia sem causar efeitos extra-piramidais (Cunha et al., 1980; Moreira, Guimarães, 2005; Zuardi et al., 2006; Crippa et al., 2010; Leweke et al., 2012). De maneira similar, o CBD reduziu a estereotipia induzida por apomorfina ou anfetamina, porém não induziu catalepsia em roedores (Moreira, Guimarães, 2005; Long et al., 2010). Consistente com estes efeitos, o CBD aumenta a expressão da proteína Fos, um marcador de ativação neuronal, no córtex pré-frontal e no núcleo *accumbens* de ratos (Guimarães et al., 2004), um efeito atribuído especificamente a antipsicóticos atípicos (Robertson, Fibiger, 1992).

Embora os antipsicóticos atípicos apresentem efeitos positivos no tratamento da depressão e no transtorno bipolar, são poucos os estudos que avaliaram a possível atividade antidepressiva do CBD. Até o momento, nenhum estudo clínico controlado foi realizado para se avaliar uma possível atividade antidepressiva do CBD. No campo pré-clínico, os resultados são também escassos. A administração aguda de CBD resultou em redução do tempo de imobilidade de camundongos no TNF (El-Alfy et al., 2010; Zanelati et al., 2010), um efeito característico de compostos com atividade antidepressiva. Reestel e colaboradores (2009) demonstraram que o CBD atenuou os efeitos autonômicos e comportamentais de ratos submetidos ao estresse de restrição por 60 min. No entanto, nos testes acima descritos, os efeitos do CBD foram avaliados após administração aguda do composto. Apenas recentemente, Campos e colaboradores (2013) demonstraram que a administração repetida de CBD (30 mg/Kg, 14 dias) preveniu as consequências comportamentais, a saber, anedonia e comportamento tipo-ansioso, decorrentes da apresentação de estresse crônico e imprevisível em camundongos. Os autores mostraram, ainda, que os efeitos ansiolíticos do CBD nestes animais estressados, foram dependentes da neurogênese hipocampal. São também escassos os estudos que avaliam a atividade antidepressiva do CBD e sua relação com a neurogênese em animais não estressados.

3.2. Objetivos

3.2.1. Geral

Considerando as potenciais propriedades terapêuticas do CBD e que neurogênese hipocampal pode ser utilizada como marcador molecular da atividade antidepressiva de compostos (Malberg, 2004), o presente trabalho teve por objetivo investigar os efeitos da administração aguda ou repetida de CBD sobre o comportamento emocional de camundongos não estressados e sua relação com a neurogênese.

3.2.2. Específicos

- Investigar os efeitos da administração aguda (3, 10 e 30 mg/Kg) ou repetida (3 e 30 mg/Kg) de CBD, em camundongos, sobre parâmetros de ansiedade medidos no campo aberto (CA) e labirinto em cruz elevado (LCE);
- Investigar os efeitos da administração aguda ou repetida de CBD em camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC), um teste preditivo de atividade tipo-antidepressiva;
- Detectar se o tratamento repetido com CBD induz a proliferação celular na ZSG do GD hipocampal e na ZSV, utilizando a imuno-histoquímica para Ki-67 e BrdU;
- Avaliar a sobrevivência de células BrdU-positivas na ZSG do GD hipocampal e na ZSV, 11 ou 21 dias após a administração repetida de CBD;
- Analisar a neurogênese na ZSG do GD hipocampal e na ZSV de camundongos, 24 h, 11 ou 21 dias após o tratamento repetido com CBD, através da imuno-histoquímica para DCX;
- Analisar os efeitos do tratamento repetido com CBD sobre a resposta astrogliar no hipocampo de camundongos, 24 h ou 11 dias após o tratamento repetido com CBD, através da detecção imuno-histoquímica de GFAP.

3.3. Metodologia

3.3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos albinos, Swiss, pesando de 30 a 40 g. Os animais permaneceram em condições padrões de alojamento, com ciclo de luz claro/escuro (12 h), temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e suprimento de água e ração à vontade durante o desenvolvimento de todo o experimento.

Dessa forma, os procedimentos experimentais seguiram os “Princípios Básicos para a Utilização Animal”, conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (Parecer CEEA 042/2012).

3.3.2. Procedimento experimental

3.3.2.1. Experimento I – Efeito da administração aguda de CBD

Os camundongos receberam, por via *i.p.*, CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg; Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Alemanha) ou veículo (solução salina com 1 % de Tween 80), em dose aguda, uma hora antes dos testes comportamentais. O regime de tratamento e as doses de CBD foram baseados nos artigos de Campos e colaboradores (2012).

Os animais foram divididos em quatro grupos (n=8-11):

- (i) grupo veículo (controle)
- (ii) grupo tratado com CBD 3 mg/Kg – CBD 3
- (iv) grupo tratado com CBD 10 mg/Kg – CBD 10
- (v) grupo tratado com CBD 30 mg/Kg – CBD 30

Os animais foram submetidos aos testes do CA, LCE e TSC. Logo após os testes, os animais foram eutanasiados com *overdose* de tiopental (Thiopentax[®], Cristália, Itapira-SP, Brasil), conforme especificações sugeridas pelo comitê de ética local.

3.3.2.2. Experimento II – Efeito da administração repetida de CBD

Os camundongos receberam, por via *i.p.*, CBD (3 ou 30 mg/Kg) ou veículo durante 15 dias consecutivos. Estas doses foram escolhidas para o tratamento repetido, pois as doses 3 e 10 mg/Kg apresentaram o mesmo perfil de efeito tipo-antidepressivo no TSC, depois da administração aguda de CBD, quando comparadas ao grupo veículo. A última dose do experimento II foi administrada uma hora antes de serem submetidos aos modelos comportamentais do CA, do LCE e do TSC. Os animais foram divididos em três grupos (n=6-17):

- (i) grupo veículo (controle)
- (ii) grupo tratado com CBD 3 mg/Kg – CBD 3
- (iii) grupo tratado com CBD 30 mg/Kg – CBD 30

Após os testes comportamentais, os animais foram, aleatoriamente, distribuídos em 3 grupos destinados à imuno-histoquímica para verificação da proliferação, sobrevivência e neurogênese (Esquema 2).

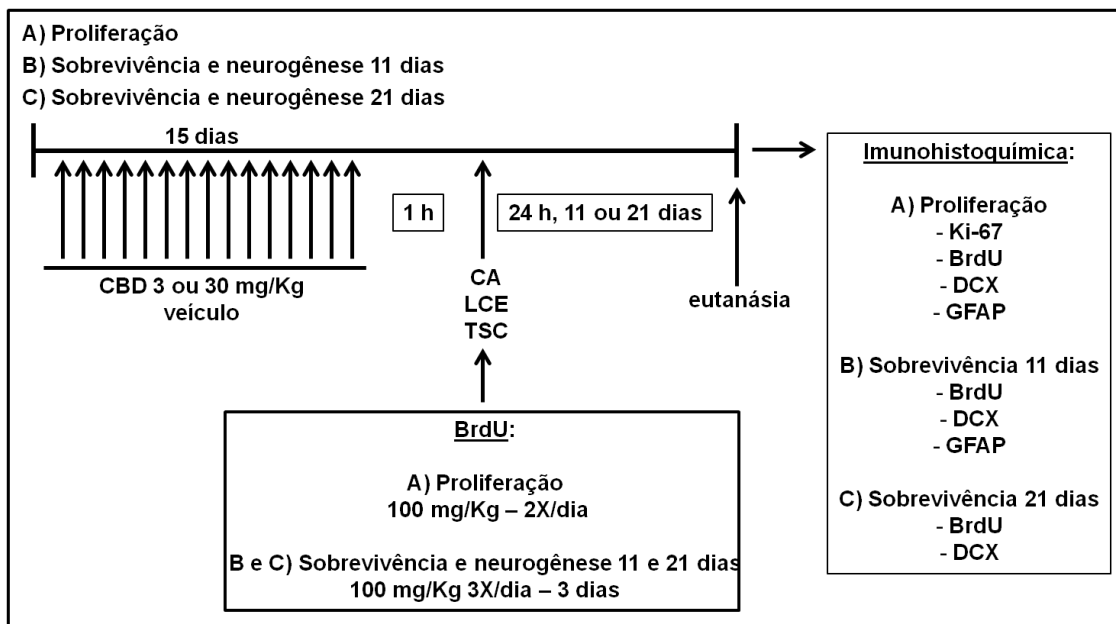
3.3.2.2.1. Avaliação da proliferação após término do tratamento repetido com CBD

Para determinar se o tratamento repetido com CBD (3 e 30 mg/Kg) alterava a proliferação celular na ZSG do GD hipocampal e na ZSV, os animais receberam BrdU em duas doses de 100 mg/Kg, *i.p.*, com duas horas de intervalo entre elas. Vinte e quatro horas após a última administração com BrdU, os animais foram eutanasiados e tiveram seus cérebros retirados para posteriores análises imuno-histoquímicas para Ki-67, BrdU, DCX e GFAP (Esquema 2).

3.3.2.2.2. Avaliação da sobrevivência e neurogênese 11 e 21 dias após o tratamento repetido com CBD

Para verificar se o tratamento repetido com CBD (3 e 30 mg/Kg) alterava a sobrevivência e a neurogênese na ZSG do GD hipocampal e na ZSV, os animais receberam BrdU em três doses de 100 mg/Kg, *i.p.*, com uma hora de intervalo entre elas, durante três dias consecutivos, a partir do fim dos testes comportamentais. Onze ou 21 dias (Esquema 2) após os testes comportamentais, os animais foram

eutanasiados e tiveram seus cérebros retirados para posteriores análises imunohistoquímicas para BrdU, DCX e GFAP.



Esquema 2: Delineamento experimental.

3.3.3. Avaliação comportamental

3.3.3.1. Campo aberto (CA)

O teste foi realizado de acordo com Zanelati e colaboradores (2010). Resumidamente, os animais foram colocados numa arena quadrangular (70 cm de lado e 40 cm de altura, feita de madeira, com fundo escuro, para dar contraste com os animais), onde a atividade exploratória foi filmada de uma sala adjacente à sala do teste (Figura 15).



Figura 15: Foto representativa da arena utilizada para o desenvolvimento do modelo experimental do campo aberto (CA).

Uma hora após a última administração de CBD, os camundongos foram submetidos ao CA durante 5 min, iniciando sempre o teste pelo mesmo canto, escolhido aleatoriamente pelo experimentador. O comportamento foi analisado com o auxílio do *software* Any-maze (versão 4.9; Stoelting, EUA). Este programa detecta a posição do animal na arena de CA e calcula a distância total percorrida (DTP) por cada camundongo durante os 5 min de teste, em metros. Além disso, com o auxílio do mesmo programa, uma zona central, hipotética, foi fixada a 15 cm do lado da arena. O número de entradas (EC) e o tempo (TC) que cada animal permaneceu no centro, que, quanto maiores, indicam efeito tipo-ansiolítico do CBD, foram calculados. O CA foi limpo com uma solução de etanol a 70% após cada tentativa.

3.3.3.2. Labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste de LCE é tido como um teste capaz de medir os níveis de ansiedade e prever possíveis efeitos, ansiolítico ou ansiogênico de determinados tratamentos em roedores (Pellow et al., 1986; Lister, 1987). O LCE consistiu de um aparelho de madeira com quatro braços de dimensões idênticas (57 cm X 8 cm). Dois destes braços foram fechados por paredes com 21 cm de altura e dispostos, perpendicularmente, aos dois braços abertos. O aparelho foi elevado 90 cm acima do chão. Para evitar quedas, os braços abertos foram cercados por uma aresta, feita de acrílico transparente, com 1 cm de altura (Figura 16).



Figura 16: Foto representativa do aparato utilizado para o desenvolvimento do modelo experimental do labirinto em cruz elevado (LCE).

A porcentagem de entradas nos braços abertos ($\% \text{EBA} = 100 \times \text{número de entrada nos braços abertos} / \text{total de entradas em ambos os braços}$), a porcentagem

de tempo gasto nos braços abertos ($\% TBA = 100 \times \text{tempo nos braços abertos} / \text{tempo nos braços abertos} + \text{tempo nos braços fechados}$), que, quanto maiores, indicam efeito tipo-ansiolítico do CBD, assim como o número de entrada nos braços fechados (EBF) e a distância total percorrida (DTP), em metros, no LCE, que indicam a possível influência do CBD na atividade locomotora dos animais, foram calculados. O labirinto foi limpo com uma solução de etanol a 70% após cada tentativa.

3.3.3.3. Teste de suspensão pela cauda (TSC)

Logo após o LCE, os animais foram, então, submetidos ao TSC. Neste teste, cada animal permaneceu pendurado, pela cauda, presa com fita adesiva (2 - 4 cm a partir da ponta da cauda) a uma barra de madeira ligada a um suporte de fundo escuro, como contraste. Durante o teste, foram mantidos suspensos 35 cm acima do solo (Figura 17).



Figura 17: Foto representativa do modelo experimental do teste em suspensão pela cauda (TSC).

O desempenho individual foi registrado com uma câmera de vídeo, posicionada no mesmo nível do camundongo, por um total de 6 min. A latência para apresentar o primeiro episódio de imobilidade que, quanto maior, indica efeito tipo-antidepressivo e o tempo de imobilidade durante os 4 últimos minutos do teste que, quanto menor, também indicam efeito tipo-antidepressivo, foram quantificados. A imobilidade foi definida, operacionalmente, quando os camundongos permaneciam pendurados sem se movimentarem (Steru et al., 1985).

3.3.4. Imuno-histoquímica para Ki-67, BrdU, DCX, e GFAP

Vinte e quatro horas, 11 ou 21 dias após a exposição aos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com *overdose* de tiopental (Thiopentax[®], Cristália, Itapira-SP, Brasil) para posterior perfusão transcardíaca com 30 mL de salina (0,9%) seguida de 50 mL de solução de PFA 4% (pH=7,4) em PB 0,2 M. Os cérebros foram removidos, pós-fixados em solução de PFA 4% em PB 0,2 M, por 2 h. Logo após, durante 72 h, os cérebros foram mantidos em solução de sacarose 30% em tampão fosfato salina PBS 0,1M a 4°C para crioproteção. Após congelamento adequado, mergulhando os cérebros em isopentano, sob refrigeração de nitrogênio líquido, estes foram seccionados com o auxílio de um micrótomo criostato (Criocut 1800, Reichert-Jung, Heidelberg, Alemanha). As secções coronais (30 µm), foram coletadas em seis tubos de ensaio de 5 mL, contendo PBS acrescido de 1% de azido sódico, que correspondiam a coordenadas estereotáxicas entre 1,34 mm, anterior ao Bregma, e -3,52 mm, posterior ao Bregma, de acordo com o atlas de Franklin e Paxinos (1997).

Para a imuno-histoquímica e detecção do BrdU, as secções foram incubadas em solução de glicina (Invitrogen[®], Carlsbad, EUA) 0,1 M em PBS 0,1 M por 5 min à temperatura ambiente, tiveram seu DNA desnaturado em solução de HCl (Synth[®], Diadema-SP, Brasil) 1 N em água destilada por 60 min a 40°C e, então, incubadas em solução de ácido bórico (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) 0,1 M em água destilada à temperatura ambiente por 10 min. Após sucessivas lavagens em PBS 0,1 M, as secções foram incubadas em solução contendo 2% de BSA (Santa Cruz Biotechnology) em PBS 0,1 M durante 60 min para o bloqueio de reações inespecíficas. As secções foram, então, incubadas com anticorpo *mouse* anti-BrdU (1:100, Santa Cruz Biotechnology) em solução de PBS 0,1 M acrescido de 0,3% Triton-X 100 (Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Alemanha), contendo 2% de BSA e foram mantidas sob agitação constante *overnight* a 4°C.

Para a detecção de Ki-67, DCX, e GFAP, as secções foram submetidas a sucessivas lavagens em PBS 0,1 M. Em seguida, foram incubadas em solução contendo 2% de BSA em PBS 0,1 M acrescido de Triton-X 100 0,3% durante 60 min para o bloqueio de reações inespecíficas. As secções foram, então, incubadas com anticorpo *rabbit* anti-Ki-67 (1:200, Acris Antibodies), *goat* anti-DCX (1:300, Santa

Cruz Biotechnology) ou *rabbit* anti-GFAP (1:500, Santa Cruz Biotechnology), em solução de PBS 0,1 M acrescido de Triton-X 100 0,3%, contendo 2% de BSA e foram mantidas *overnight*, sob agitação constante à 4°C.

Após incubação com os anticorpos primários, as secções foram lavadas com PBS 0,1 M e, então, incubadas com os anticorpos secundários específicos *goat* anti-*mouse*, *goat* anti-*rabbit* ou *rabbit* anti-*goat* (1:500, Santa Cruz Biotechnology), biotinilados, em uma solução idêntica à utilizada para o anticorpo primário, e foram mantidas, sob agitação constante, à 4° C, por 2 h. Posteriormente, foram incubadas com o complexo ABC (Kit, Vector Laboratories) em PBS 0,1 M, sob agitação constante, à temperatura ambiente, por mais 2 h. A revelação foi realizada usando uma solução a 0,025% de DAB (Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Alemanha) e 0,05% H₂O₂. Após estes procedimentos, as secções foram adequadamente lavadas em PBS 0,1 M e montadas em lâminas previamente gelatinizadas. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram cobertas com Permount[®] (Fisher Scientific, New Jersey, EUA) e lamínulas.

3.3.4.1. Análise quantitativa das células Ki-67-, BrdU- e DCX-positivas

As células positivas para Ki-67, BrdU e DCX foram contadas, manualmente, por toda a extensão da ZSG do GD hipocampal de ambos os hemisférios de 4 secções escolhidas aleatoriamente (Keith et al., 2008), correspondendo às coordenadas estereotáficas de -1,82 a -2,18 mm, posteriores ao Bregma (Franklin, Paxinos, 1997). Para quantificação das células positivas para Ki-67, BrdU, e DCX, na ZSV, foram contadas, manualmente, as células coradas presentes por toda extensão dessa região de ambos os hemisférios de duas secções escolhidas aleatoriamente. Estas, correspondendo às coordenadas estereotáficas 1,18 mm e 0,02 mm, anteriores ao Bregma, de acordo com o atlas de Franklin e Paxinos (1997), estando, a primeira, entre 1,18 mm e 0,62 mm e, a segunda, entre 0,50 mm e 0,02 mm, conforme descrito anteriormente por Suyama e colaboradores (2012). As quantificações foram realizadas em microscópio óptico comum (Olympus, BX41), com aumento de 400 X.

3.3.4.2. Análise quantitativa das células GFAP-positivas

A quantificação para células GFAP-positivas foi realizada em 4 secções por animal, escolhidas aleatoriamente (Schiavon et al., 2014), correspondendo às coordenadas estereotáxicas de -1,82 a -2,18 mm, posteriores ao Bregma (Franklin, Paxinos, 1997). Inicialmente, as imagens foram capturadas das lâminas usando câmara de vídeo (QColor, Olympus, America Inc.), acoplada ao microscópio comum (Olympus, BX41). O campo visualizado, correspondendo, sempre, à camada molecular *lacunosum*, foi enviado para o sistema de edição e transferência de imagem (Q Capture Pro 6.0) e para o monitor de vídeo (AOC[®] 15,6" LED Widescreen). Em cada imagem capturada, com o auxílio do programa Image J, foi calculada a densidade óptica integrada (DOI), que corresponde à soma dos valores de *pixels* da área selecionada e é equivalente ao produto desta "área selecionada" e da DOI. A DOI foi obtida em áreas que consistiam em seleções de aproximadamente 38 μm^2 .

3.3.5. Análise estatística

Os dados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias (EPM), quando considerados os parâmetros comportamentais. Para resultados das imunohistoquímicas, os dados foram expressos como logaritmo (*log*) das médias \pm EPM. Para todos os estudos, foi utilizada a análise de variância de um fator (*one-way* ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Tukey, admitindo $p < 0,05$ como critério para significância estatística.

3.4. Resultados

3.4.1. Experimento I – Efeito da administração aguda de CBD

3.4.1.1. Campo aberto

O desempenho dos animais no CA está demonstrado na Figura 18. A ANOVA revelou que o grupo tratado com CBD 10 mg/Kg teve o número de entradas na zona central significativamente aumentado, quando comparado ao grupo tratado com veículo ($F_{3,35}=4,10$, $p=0,01$). O grupo tratado com CBD 3 apresentou uma tendência estatística ($p=0,06$) em aumentar o número de entradas na zona central, quando comparado ao grupo tratado com veículo. Em relação ao tempo que cada animal permaneceu na zona central, ANOVA mostrou aumento nos grupos tratados com CBD (3 e 10 mg/Kg), quando comparado ao grupo tratado com veículo (Figura 18B; $F_{3,35}=3,42$, $p=0,02$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada para a distância total percorrida (Figura 18C, $F_{3,35}=1,18$, $p=0,33$). Estes resultados apontam para um efeito tipo-ansiolítico do CBD nas doses de 3 e 10 mg/Kg.

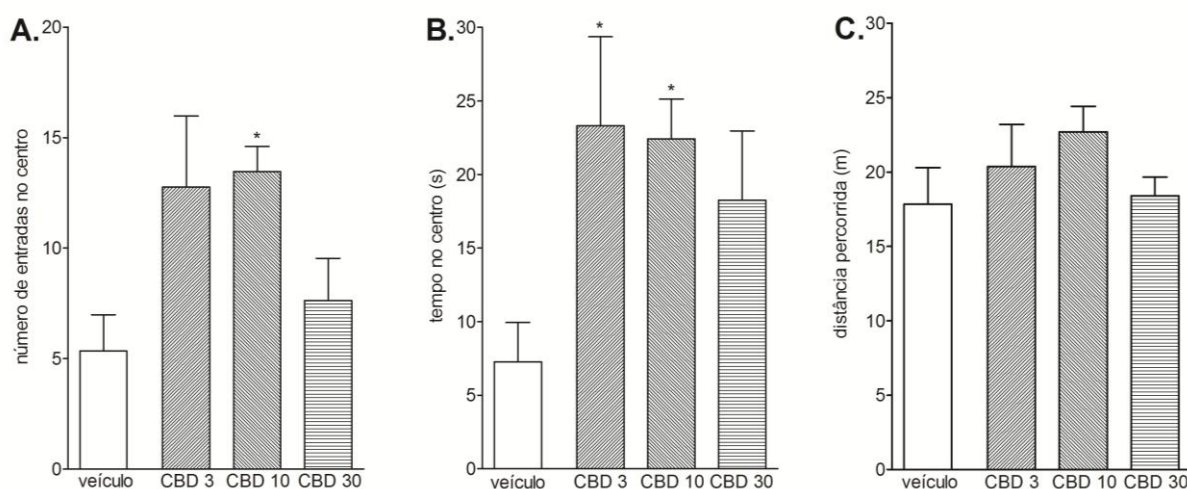


Figura 18: Efeito do tratamento agudo com CBD em camundongos submetidos ao campo aberto (CA). Os animais receberam injeções intraperitoneais (*i.p.*) de veículo ou CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg) uma hora antes dos testes comportamentais. Os camundongos foram submetidos ao CA por 5 min. As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMS dos grupos veículo ($n=9$), CBD 3 ($n=8$), CBD 10 ($n=11$) e CBD 30 ($n=8$). (A) Número de entradas na zona central do CA, (B) tempo na zona central do CA, (C) distância total percorrida no CA (m). * $p<0,05$, comparado ao grupo veículo (*one-way* ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

3.4.1.2. Labirinto em cruz elevado

Na Figura 19 estão demonstrados os resultados obtidos no LCE. A ANOVA demonstrou um aumento na %EBA no grupo CBD 3, quando comparado ao grupo veículo. Ao mesmo tempo, demonstrou uma diminuição no grupo CBD 10, quando comparado ao grupo CBD 3 (Figura 19A, $F_{3,35}=3,73$, $p=0,02$). A %TBA apresentou o mesmo perfil, ou seja, um aumento para o grupo CBD 3, quando comparado ao grupo veículo e uma diminuição no grupo CBD 10, quando comparado ao grupo CBD 3 (Figura 19B, $F_{3,35}=4,60$, $p=0,008$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada para o parâmetro entrada nos braços fechados (Figura 19C, $F_{3,35}=0,52$, $p=0,67$) ou para distância total percorrida no LCE (Figura 19D, $F_{3,35}=1,50$, $p=0,23$).

3.4.1.3. Teste de suspensão pela cauda

O desempenho dos animais no TSC está demonstrado na Figura 20. Apenas uma tendência estatística ($p=0,07$) em aumentar o parâmetro latência foi detectada para o grupo tratado com CBD 3, quando comparado ao grupo tratado com veículo. Já, para imobilidade durante os 4 últimos minutos, ANOVA demonstrou uma diminuição nos grupos CBD 3 e CBD 10, quando comparado ao grupo veículo ($F_{3,43}=4,85$, $p=0,005$), sugerindo um efeito tipo-antidepressivo do tratamento agudo com CBD.

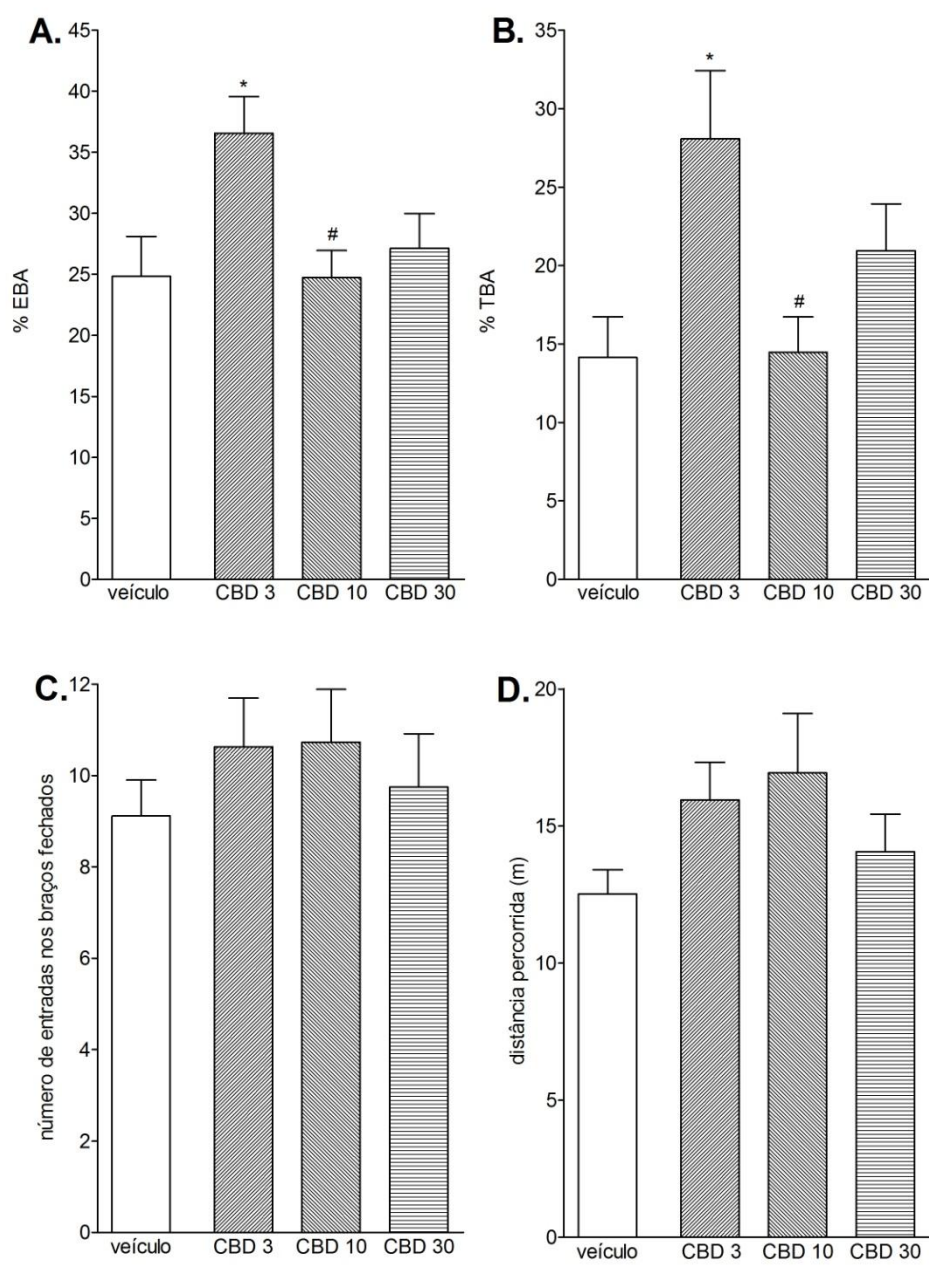


Figura 19: Efeito do tratamento agudo com CBD em camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Os animais receberam injeções *i.p.* de veículo ou CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg) uma hora antes dos testes comportamentais. Subsequentemente ao CA, os camundongos foram submetidos ao LCE por 5 min. As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMS dos grupos veículo (n=9), CBD 3 (n=8), CBD 10 (n=11) e CBD 30 (n=8). (A) Porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) do LCE, (B) Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA) do LCE, (C) número de entradas nos braços fechados do LCE e (D) distância total percorrida do LCE (m). * $p < 0,05$, comparado ao grupo veículo; # $p < 0,05$, comparado ao grupo CBD 3 (*one-way ANOVA* seguida do teste *post hoc* de Tukey).

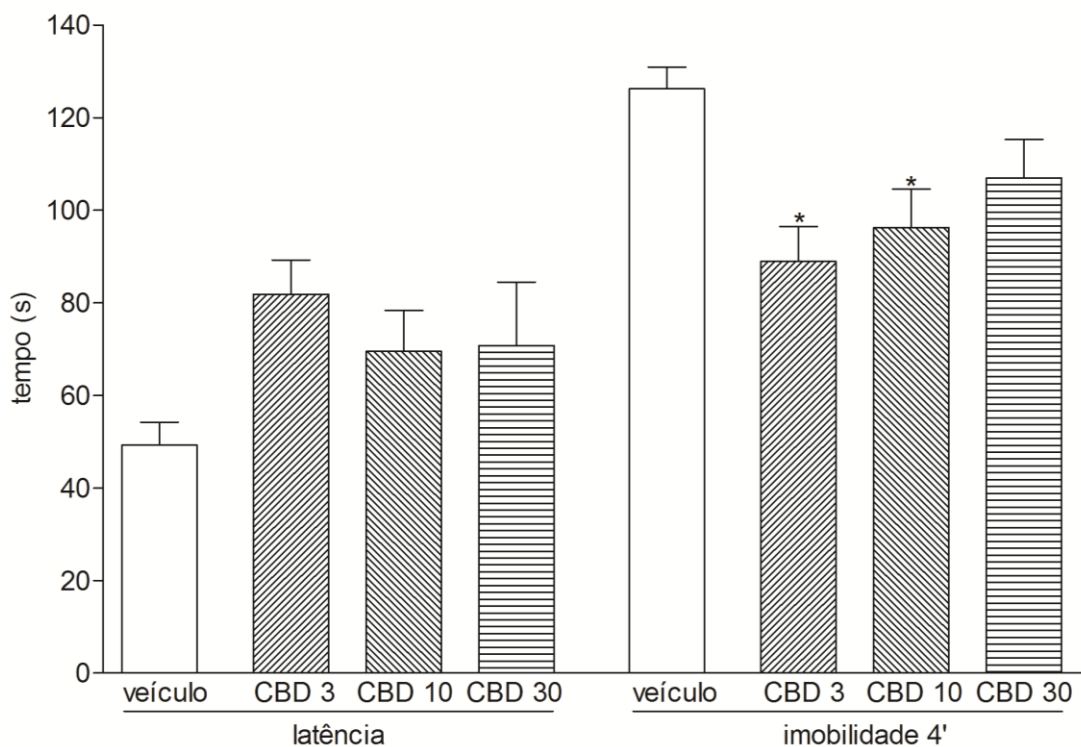


Figura 20: Efeito do tratamento agudo com CBD em camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC). Os animais receberam injeções *i.p.* de veículo ou CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg) uma hora antes de serem expostos, primeiramente ao CA, seguido do LCE e, então, ao TSC por 6 min. O tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade e o tempo de imobilidade nos últimos 4 min foram registrados em segundos (s). As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMS dos grupos veículo (n=9), CBD 3 (n=8), CBD 10 (n=11) e CBD 30 (n=8). *p<0,05, comparado ao grupo veículo (*one-way* ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

3.4.2. Experimento II – Efeito da administração repetida de CBD

3.4.2.1. Campo aberto

Após o término do tratamento repetido com CBD por 15 dias consecutivos, o desempenho dos animais no CA foi avaliado e está demonstrado na Figura 21. Apenas uma tendência estatística (Figura 21A, $F_{2,17}=3,77$, $p=0,04$) em diminuir o número de entradas na zona central do CA foi detectada para o grupo tratado com CBD 3, quando comparado ao grupo tratado com veículo. Nenhuma diferença significativa foi encontrada para o tempo que cada animal permaneceu na zona central do CA (Figura 21B, $F_{2,17}=1,82$, $p=0,19$) ou para a distância total percorrida no CA (Figura 21C, $F_{2,17}=0,68$, $p=0,52$).

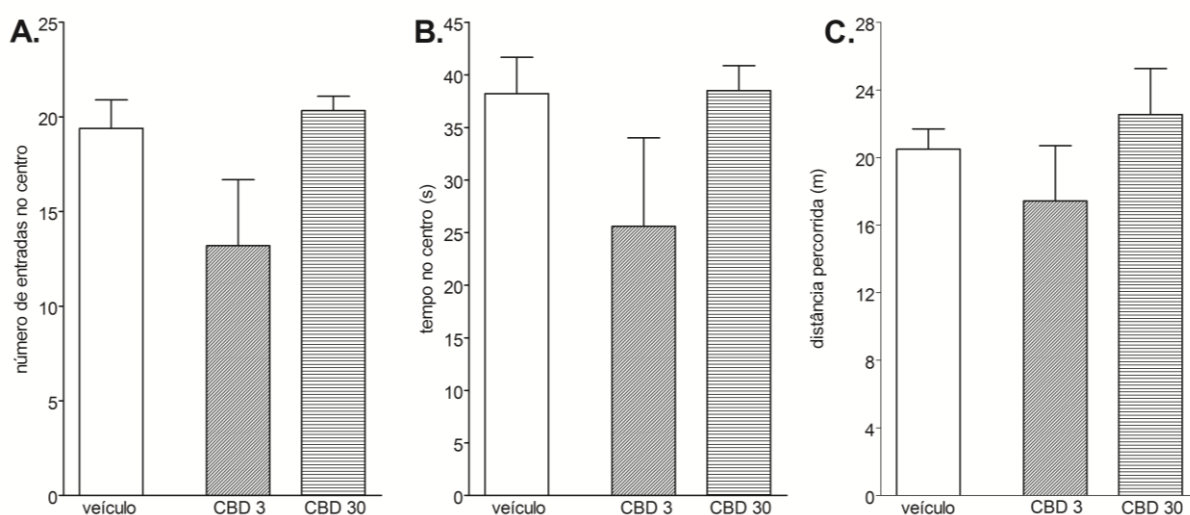


Figura 21: Efeito do tratamento repetido com CBD em camundongos submetidos ao CA. Os animais receberam injeções *i.p.* de veículo ou CBD (3 ou 30 mg/Kg) durante 15 dias consecutivos. Uma hora após a última administração, os camundongos foram submetidos ao CA por 5 min. As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMS dos grupos veículo (n=5), CBD 3 (n=5) e CBD 30 (n=6). (A) Número de entradas na zona central do CA, (B) tempo na zona central do CA, (C) distância total percorrida no CA (m). Para todos os parâmetros analisados, $p>0,05$ (*one-way* ANOVA).

3.4.2.2. Labirinto em cruz elevado

Subsequentemente ao CA, os animais foram submetidos ao LCE. A Figura 22 mostra os resultados obtidos neste teste. ANOVA demonstrou uma tendência estatística em diminuir a %EBA (Figura 22A, $F_{2,46}=3,07$, $p=0,056$), quando comparada ao grupo tratado com veículo. Porém, nenhuma diferença foi observada para a %TBA (Figura 22B, $F_{2,46}=2,18$, $p=0,12$), para o número de entradas nos braços fechados (Figura 22C, $F_{2,46}=1,05$, $p=0,35$) ou para a distância total percorrida (Figura 22D, $F_{2,46}=0,93$, $p=0,40$) entre os grupos.

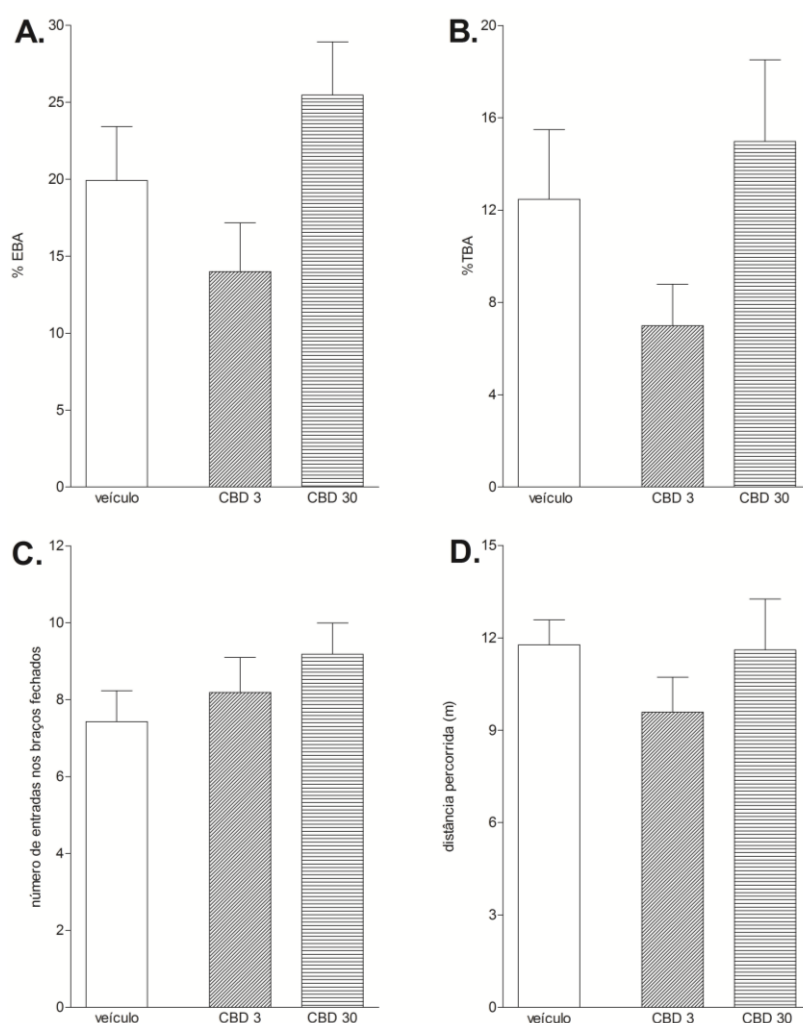


Figura 22: Efeito do tratamento repetido com CBD em camundongos submetidos ao LCE. Os animais receberam injeções *i.p.* de veículo ou CBD (3, ou 30 mg/Kg) durante 15 dias consecutivos. Uma hora após a última administração, os camundongos foram submetidos ao LCE. Subsequentemente ao CA, os camundongos foram submetidos ao LCE por 5 min. As colunas representam as médias e, as barras verticais, os EPMS dos grupos veículo (n=14), CBD 3 (n=17) e CBD 30 (n=16). (A) %EBA do LCE, (B) %TBA do LCE, (C) número de entradas nos braços fechados do LCE e (D) distância total percorrida no LCE (m). Para todos os parâmetros analisados, $p>0,05$ (*one-way ANOVA*).

3.4.2.3. Teste de suspensão pela cauda

Conforme observado na Figura 23, ANOVA demonstrou um aumento na latência dos grupos CBD 3 e CBD 30, quando comparados ao grupo veículo ($F_{2,46}=4,72$, $p=0,01$). Para a imobilidade durante os 4 últimos minutos, ANOVA demonstrou uma diminuição nos grupos CBD 3 e CBD 30, quando comparados ao grupo veículo ($F_{2,46}=6,99$, $p=0,002$), o que é indicativo de efeito tipo-antidepressivo do tratamento.

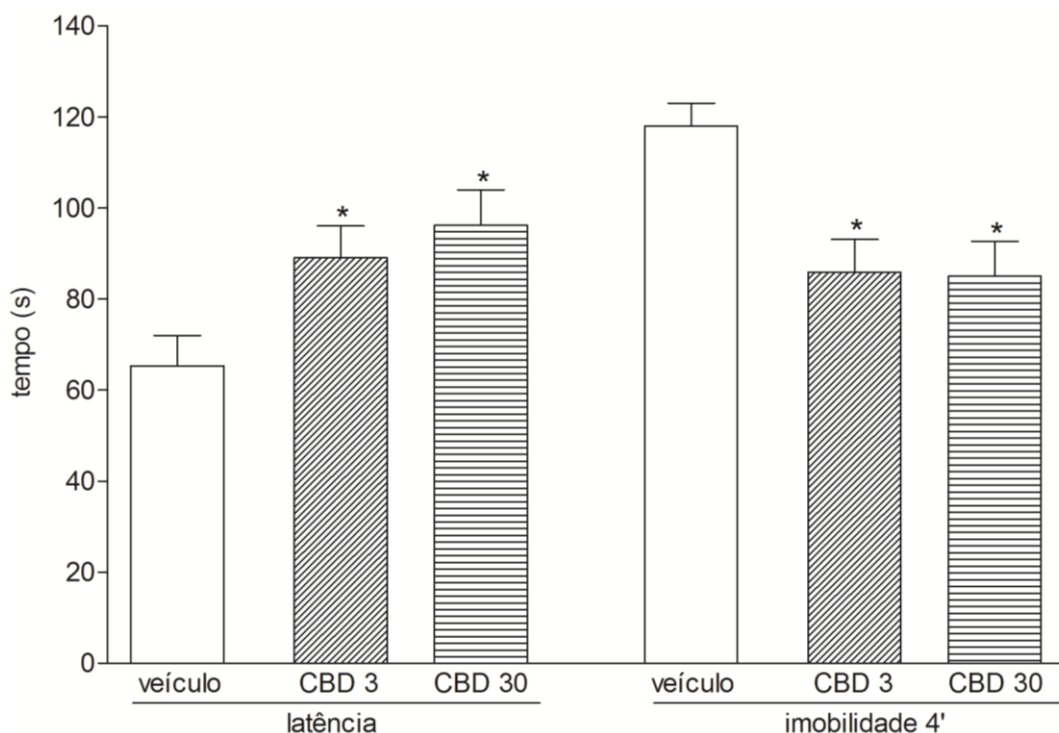


Figura 23: Efeito do tratamento repetido com CBD em camundongos submetidos ao TSC. Os animais receberam injeções *i.p.* de veículo ou CBD (3 ou 30 mg/Kg) durante 15 dias consecutivos. Uma hora após a última administração, os animais foram expostos, primeiramente ao CA, seguido do LCE e, então, ao TSC por 6 min. O tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade e o tempo de imobilidade nos últimos 4 min foram registrados em segundos (s). As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMS dos grupos veículo (n=14), CBD 3 (n=17), CBD 10 (n=16) e CBD 30 (n=8). * $p<0,05$, comparado ao grupo veículo (*one-way* ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

3.4.2.4. Imuno-histoquímica

3.4.2.4.1. Avaliação da proliferação após término do tratamento repetido com CBD

A análise imuno-histoquímica para quantificação da proliferação foi realizada vinte e quatro horas após o término do tratamento com CBD. Fotomicrografias representativas do GD hipocampal e da ZSV, contendo células Ki-67- e BrdU-positivas para cada grupo experimental, estão representadas da Figura 24. Conforme observado nesta figura, os núcleos corados das células Ki-67- e BrdU-positivas aparecem escuros e distribuídos uniformemente pela camada celular da ZSG do GD hipocampal e da ZSV, onde são tipicamente encontrados e, frequentemente, aparecem agrupados ou em *clusters*. Comparado com o grupo veículo, o tratamento repetido com CBD 3 causou aumento na proliferação de células Ki-67-positivas em ambas as regiões, ZSG (Figura 24A, $F_{2,14}=55,83$, $p<0,0001$) e ZSV (Figura 24B, $F_{2,14}=16,83$, $p=0,0003$). Em contraste, o tratamento repetido com CBD 30 causou uma diminuição da proliferação de células Ki-67-positivas em ambas as regiões analisadas, quando comparado ao grupo veículo e ao grupo CBD 3 ($p<0,05$). ANOVA mostrou uma diminuição significativa no número de células BrdU-positivas na ZSG para o grupo CBD 30, quando comparado ao grupo CBD 3 (Figura 24C, $F_{2,14}=7,41$, $p=0,008$). Ao observar a ZSV, ANOVA revelou que o tratamento repetido com CBD 3 aumentou a proliferação de células BrdU-positivas, quando comparado ao grupo veículo ($p<0,05$). Novamente, o tratamento repetido com CBD 30 diminuiu a proliferação celular dessas células (Figura 24D, $F_{2,14}=5,05$, $p=0,02$), quando comparado ao grupo CBD 3.

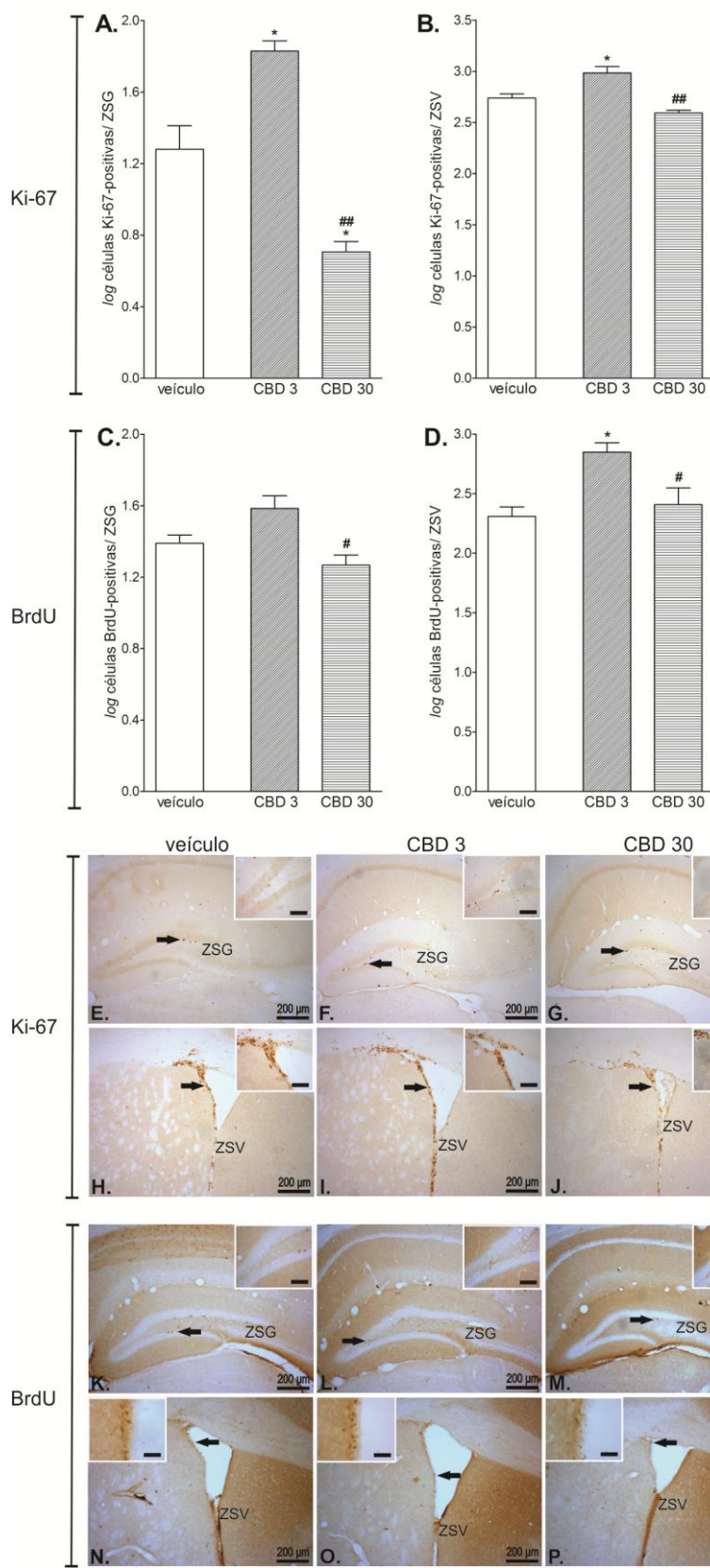


Figura 24: Efeito do tratamento repetido com CBD sobre a proliferação celular ZSG do GD do hipocampo e na ZSV de camundongos.

Os animais receberam administração *i.p.* de veículo ou CBD (3 ou 30 mg/Kg) durante 15 dias consecutivos. Após análise comportamental, os animais receberam 2 injeções *i.p.* de BrdU (100 mg/Kg) intervaladas por um período de 2 h. Vinte e quatro horas após a última administração de BrdU, os animais tiveram seus cérebros adequadamente retirados e processados para a detecção imunohistoquímica do Ki-67 e do BrdU para verificação da proliferação celular. Células positivas para Ki-67 e BrdU foram quantificadas por toda a extensão da ZSG e da ZSV. Os resultados são expressos como logaritmo (*log*) das médias e, as barras verticais, os EPMS dos grupos veículo (n=4), CBD 3 (n=6) e CBD 30 (n=5). (A e B: Ki-67; C e D: BrdU) * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,001$, comparado ao grupo CBD 3 (ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

Fotomicrografias representativas de células Ki-67 (E-J) e BrdU-positivas (K-P) na ZSG e na ZSV. Setas indicam as células Ki-67 e BrdU positivas nas fotomicrografias. Barras nas fotomicrografias = 200 μm ; barras nos detalhes: ZSG = 50 μm ; ZSV (Ki-67) = 50 μm , (BrdU) = 20 μm .

A expressão de neurônios DCX-positivos no GD foi utilizada para avaliar o efeito do tratamento repetido com CBD na geração de neuroblastos (neurogênese). ANOVA mostrou um aumento significativo na quantidade de neurônios DCX-positivos no GD do grupo CBD 3 ($F_{3,20}=7,41$, $p=0,002$), quando comparado ao grupo veículo, considerando a ZSG. No entanto, foi observada uma diminuição significativa no grupo CBD 30, quando comparado ao grupo CBD 3, também considerando a ZSG (Figura 25A, $F_{2,14}=6,81$, $p=0,01$). Ao observar a ZSV, ANOVA revelou que o tratamento repetido com CBD (3 ou 30 mg/Kg) não alterou o número de neurônios DCX-positivos em relação ao controle. Entretanto, quando comparado ao grupo CBD 3, foi observada uma diminuição significativa no grupo CBD 30 (Figura 25B, $F_{2,14}=5,05$, $p=0,02$). Fotomicrografias representativas de células GFAP-positivas para cada grupo experimental, estão representadas da Figura 25 (C-E).

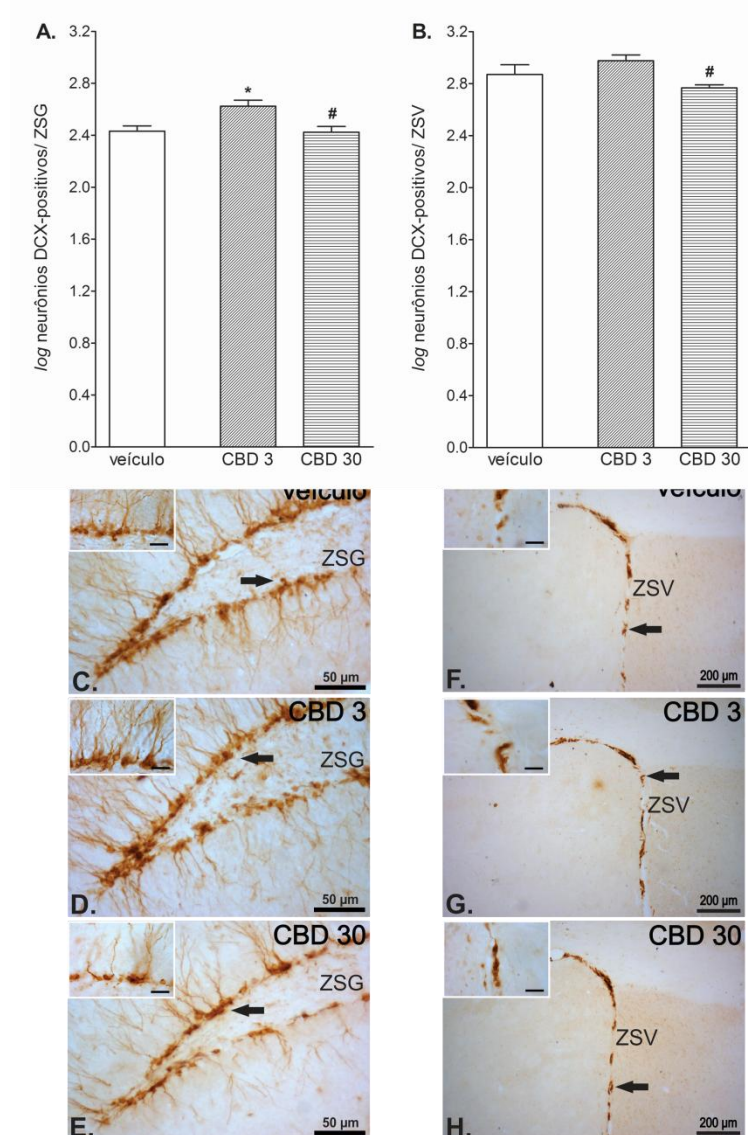


Figura 25: Efeito do tratamento repetido com CBD sobre o número de neurônios DCX-positivos na ZSG hipocampal e na ZSV de camundongos. Os animais receberam administração *i.p.* de veículo ou CBD (3 ou 30 mg/Kg) durante 15 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após análise comportamental, os animais tiveram seus cérebros adequadamente retirados e processados para a detecção imuno-histoquímica da DCX, um marcador de neuroblastos jovens, para verificação de neurogênese. Células positivas para DCX foram quantificadas por toda a extensão da ZSG e da ZSV. Os resultados são expressos como *log* das médias e, as barras verticais, os EPMs dos grupos veículo (n=4), CBD 3 (n=6) e CBD 30 (n=5) na ZSG hipocampal (A) e na ZSV (B). * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo CBD 3 (ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey). Fotomicrografias representativas de neurônios DCX-positivos na ZSG (C-E) e na ZSV (F-H) dos grupos analisados. As setas indicam neurônios DCX-positivos. Barras nas fotomicrografias: C-E= 50 µm, F-H = 200 µm e, nos detalhes = 25 µm.

Não foram detectadas diferenças significativas entre as DOIs dos grupos após tratamento repetido com CBD (3 ou 30 mg/Kg) (Figura 26B, $F_{2,14}=1,32$, $p=0,30$).

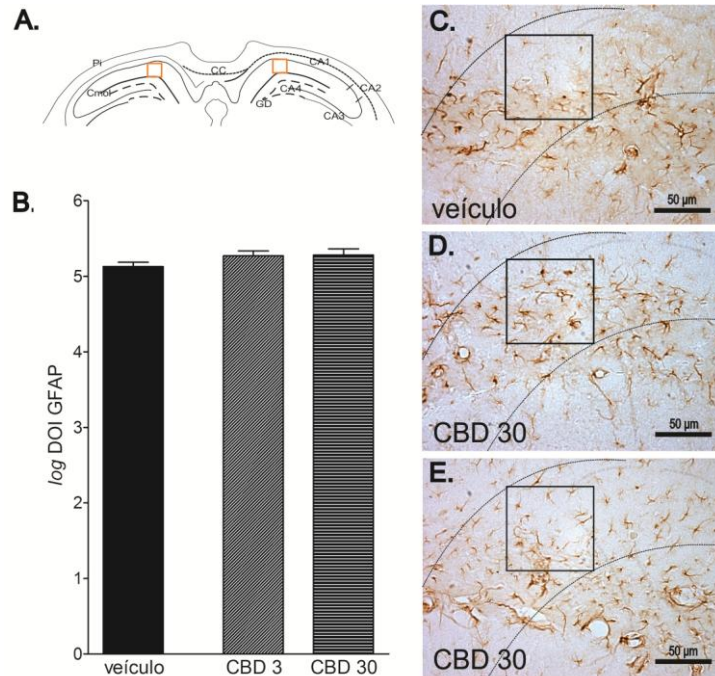


Figura 26: Efeito do tratamento repetido com CBD sobre a expressão de células GFAP-positivas em camundongos. Os animais receberam administração *i.p.* de veículo ou CBD (3 ou 30 mg/Kg) durante 15 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após análise comportamental, os animais tiveram seus cérebros adequadamente retirados e processados para a detecção imuno-histoquímica de GFAP. (A) Esquema representativo de uma secção coronal cerebral contendo o hipocampo com a área selecionada (em alaranjado), de onde foram obtidas as densidades ópticas integradas (DOI) para GFAP. (B) As colunas representam a média \pm EPM do *log* das DOI das células GFAP-positivas dos grupos veículo (n=4), CBD 3 (n=6) e CBD 30 (n=5). (C-E) Fotomicrografias representativas de células GFAP-positivas. Os detalhes em (A) e (C-E) mostram a área selecionada em que as DOI para GFAP foram obtidas. Pi: camada celular piramidal; CmOl: camada molecular *lacunosum*; GD: giro denteado. Barras nas fotomicrografias: C-E= 50 μ m.

3.4.2.4.2. Avaliação da sobrevivência e neurogênese 11 e 21 dias após o tratamento repetido com CBD

A análise imuno-histoquímica para quantificação da sobrevivência celular foi realizada, primeiramente, 11 dias após o término do tratamento repetido com CBD. No GD, as células progenitoras estão localizadas na ZSG. Essas células proliferam-se e migram para a CCG do GD, onde se maturam em células granulares excitatórias e, finalmente, se integram ao circuito hipocampal. Aqui, os núcleos corados das células BrdU-positivas ainda aparecem escuros e distribuídos uniformemente pela camada celular da ZSG do GD hipocampal, onde são tipicamente encontrados e já demonstram-se arredondados, como indicativo do início da maturação e migração para a CCG. O tratamento repetido com CBD 3 resultou em aumento na proliferação de células BrdU-positivas na ZSG, quando comparado com o grupo veículo. De forma oposta, o tratamento repetido com CBD 30 causou uma diminuição da proliferação de células BrdU-positivas, tanto na ZSG (Figura 27A, $F_{2,15}=5,47$, $p=0,01$), como na ZSV (Figura 27B, $F_{2,15}=4,41$, $p=0,03$), quando comparado ao grupo veículo e ao grupo CBD 3. Fotomicrografias representativas do GD hipocampal e da ZSV, contendo células BrdU-positivas para cada grupo experimental, estão representadas da Figura 27.

Quando procedeu-se a análise 21 dias após o término do tratamento com CBD, ANOVA revelou que não houve alteração significativa no número de células BrdU-positivas na ZSG (Figura 27C, $F_{2,15}=0,79$, $p=0,47$), nem na ZSV (Figura 27D, $F_{2,15}=1,16$, $p=0,34$) entre os grupos, 21 dias após o término do tratamento repetido com CBD (3 ou 30 mg/Kg). Fotomicrografias representativas do GD hipocampal e da ZSV, contendo células BrdU-(K-P) positivas para cada grupo experimental, estão representadas da Figura 27.

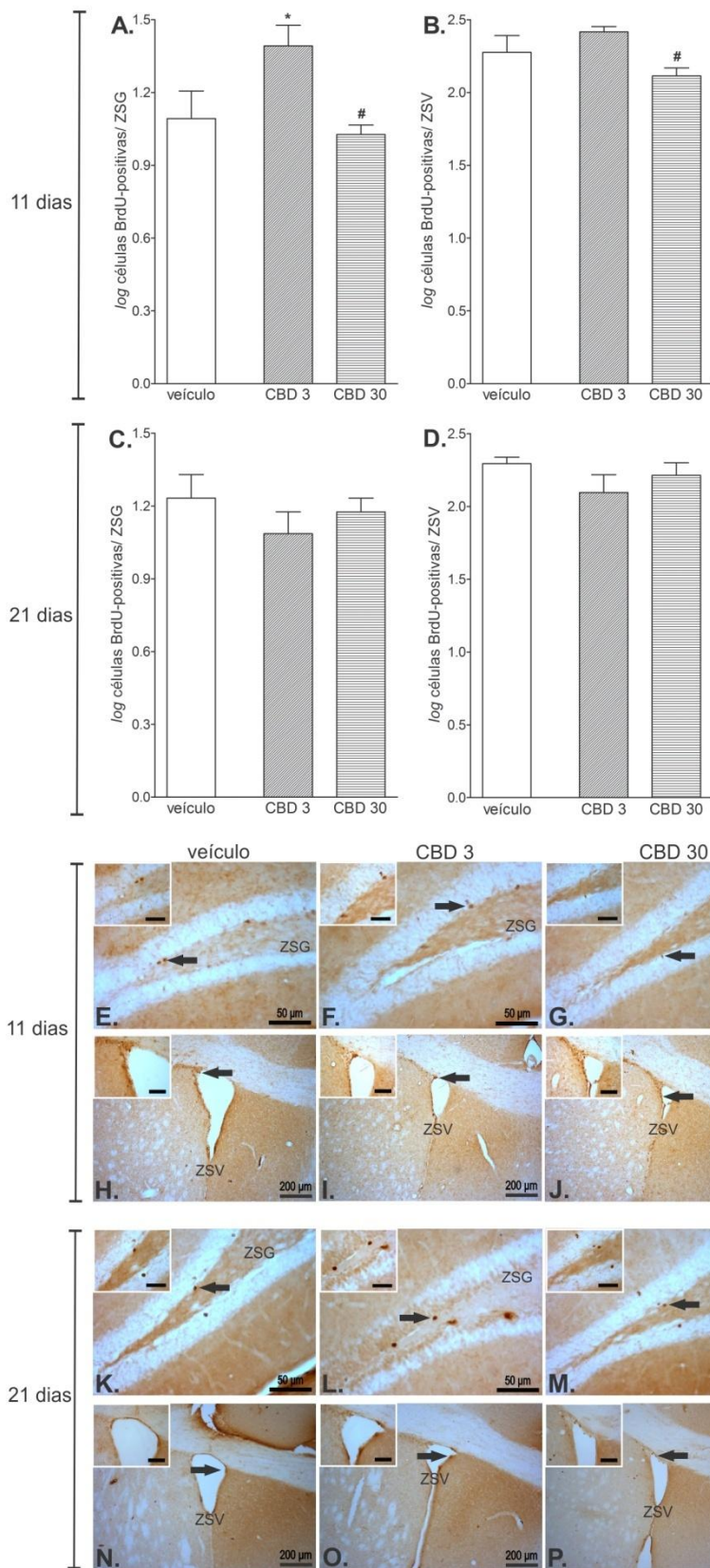


Figura 27: Avaliação da sobrevivência celular na ZSG hipocampal e na ZSV 11 ou 21 dias após o término do tratamento repetido com CBD em camundongos. Os animais receberam administração *i.p.* de veículo ou CBD (3 ou 30 mg/Kg) durante 15 dias. Após os testes comportamentais, os animais receberam 3 injeções *i.p.* de BrdU (100 mg/Kg) intervaladas por um período de 1 h, durante 3 dias consecutivos. Onze ou 21 dias após o fim do tratamento com veículo ou CBD, os animais tiveram seus cérebros adequadamente retirados e processados para a detecção imunohistoquímica do BrdU, para verificação celular. Células positivas para BrdU foram quantificadas por toda a extensão da ZSG e da ZSV. (A-D) Os resultados são expressos como \log das médias e, as barras verticais, os EPs dos grupos veículo (11 e 21 dias, n=5), CBD 3 (11 dias, n=6; 21 dias, n=5) e CBD 30 (11 dias, n=5; 21 dias, n=6). * $p < 0,05$ comparados ao grupo veículo; # $p < 0,05$ comparados ao grupo CBD 3 (ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey). (E-P) Fotomicrografias representativas de células BrdU-positivas na ZSG e na ZSV, (E-J) 11 dias e (K-P) 21 dias. Setas indicam as células BrdU positivas nas fotomicrografias. Barras das fotomicrografias: E-G e K-M= 50 μm , H-J e N-P = 200 μm ; dos detalhes: E-G e K-M = 20 μm , H-J e N-P = 50 μm .

ANOVA mostrou um aumento significativo na quantidade de neurônios DCX-positivos no GD do grupo CBD 3, quando comparado ao grupo veículo. Uma diminuição significativa na ZSG foi detectada no grupo CBD 30, quando comparado ao grupo veículo e ao grupo CBD 3 (Figura 28A, $F_{2,15}=42,84$, $p<0,0001$). Ao observar a ZSV, ANOVA demonstrou que o tratamento repetido com CBD 30 diminuiu, significativamente, o número de neurônios DCX-positivos (Figura 28B, $F_{2,15}=6,65$, $p=0,01$), quando comparado ao grupo CBD 3.

Vinte e um dias após o término do tratamento repetido com CBD, ANOVA demonstrou que não houve alteração significativa no número de neurônios DCX-positivos na ZSG (Figura 28C, $F_{2,15}=2,47$, $p=0,12$), nem na ZSV (Figura 28D, $F_{2,15}=0,04$, $p=0,95$) entre os grupos, após o tratamento repetido com CBD (3 ou 30 mg/Kg). Fotomicrografias representativas do GD hipocampal e da ZSV, contendo neurônios DCX-positivos para cada grupo experimental, estão representadas da Figura 28.

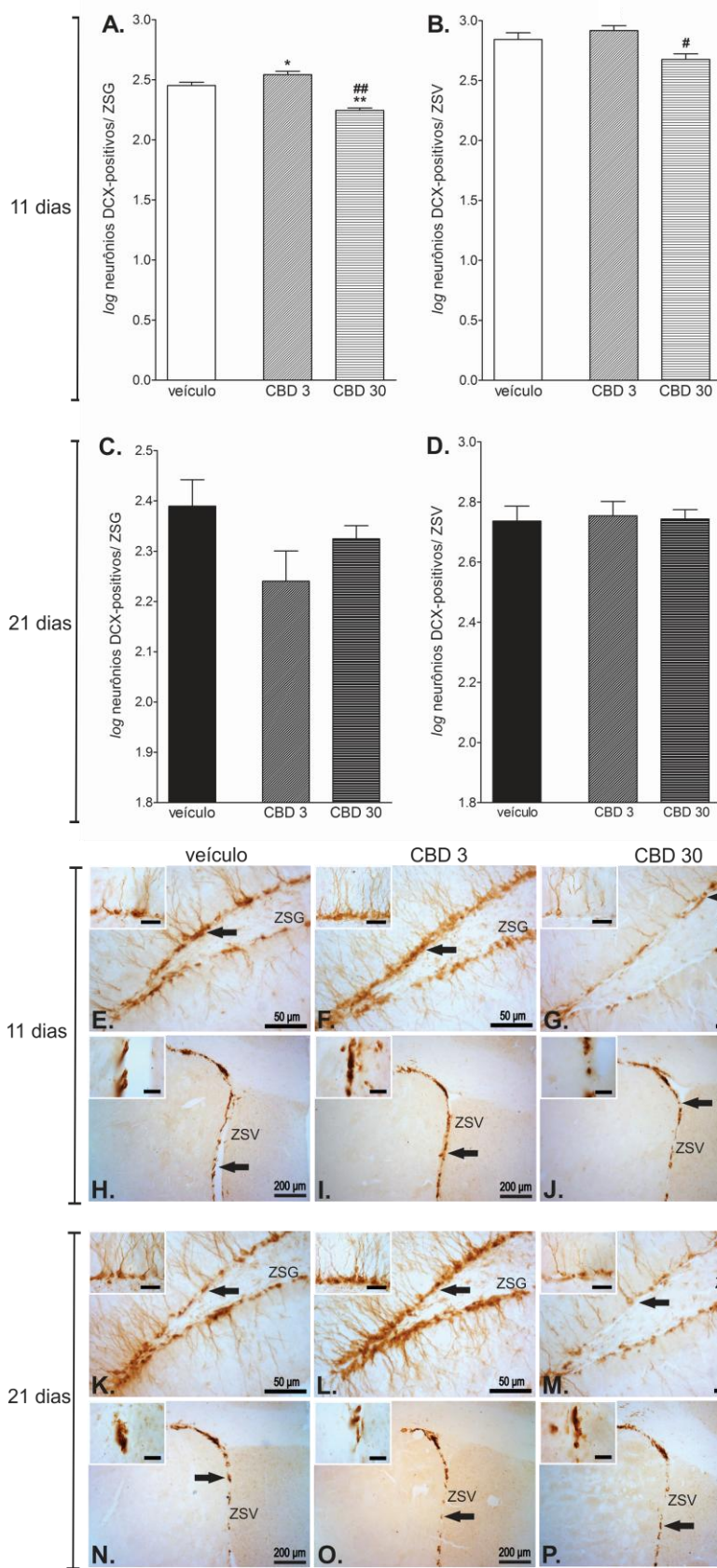


Figura 28: Efeito do CBD sobre o número de neurônios DCX-positivos na ZSG hipocampal e na ZSV 11 ou 21 dias após o término do tratamento repetido com CBD em camundongos. Os animais receberam administração *i.p.* de veículo ou CBD (3 ou 30 mg/ Kg) durante 15 dias consecutivos. Onze ou 21 dias após análise comportamental, os animais tiveram seus cérebros adequadamente retirados e processados para a detecção imunohistoquímica da DCX, um marcador de neuroblastos jovens, para verificação de neurogênese. Células positivas para DCX foram quantificadas por toda a extensão da ZSG e da ZSV. (A-D) Os resultados são expressos como *log* das médias e, as barras verticais, os EPMS dos grupos veículo (11 e 21 dias, n=5), CBD 3 (11 dias, n=6; 21 dias, n=5) e CBD 30 (11 dias, n=5; 21 dias, n=6). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$, comparado ao grupo veículo; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,001$, comparado ao grupo CBD 3 (ANOVA seguida do teste post hoc de Tukey). Fotomicrografias representativas de neurônios DCX-positivos na ZSG e na ZSV, (E-J) 11 dias e (K-P) 21 dias. Setas indicam os neurônios DCX-positivos nas fotomicrografias. Barras das fotomicrografias: E-G e K-M = 50 μm , H-J e N-P = 200 μm ; dos detalhes: E-G e K-M = 20 μm , H-J e N-P = 50 μm .

A expressão de células GFAP-positivas está demonstrada na Figura 29. ANOVA demonstrou que o tratamento repetido com CBD (3 ou 30 mg/Kg) não alterou as DOIs dos grupos analisados (Figura 29B, $F_{2,15}=0,86$, $p=0,45$). Fotomicrografias representativas de células GFAP-positivas para cada grupo experimental, estão representadas da Figura 29.

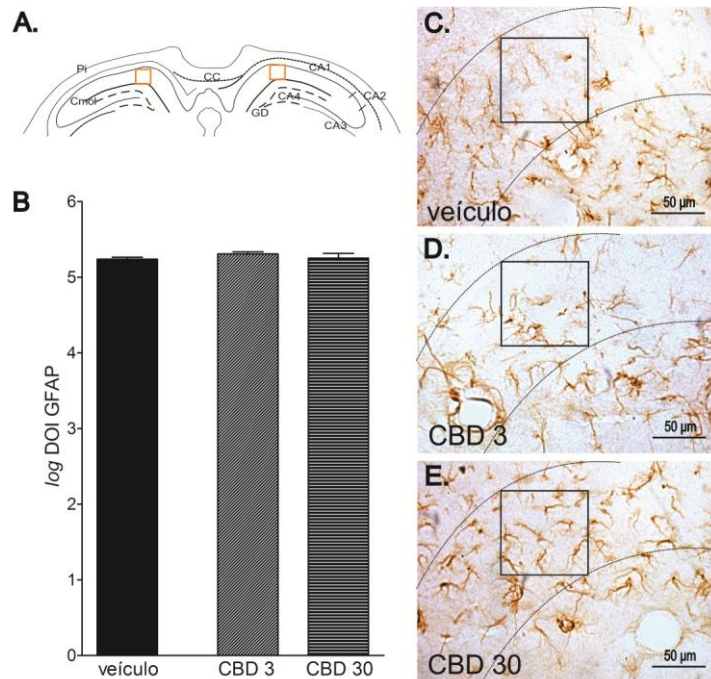


Figura 29: Efeito do CBD sobre a expressão de células GFAP-positivas no hipocampo de camundongos 11 dias após o término do tratamento repetido com CBD. Os animais receberam administração *i.p.* de veículo ou CBD (3 ou 30 mg/Kg) durante 15 dias consecutivos. Onze dias após análise comportamental, os animais tiveram seus cérebros adequadamente retirados e processados para a detecção imuno-histoquímica de GFAP. (A) Esquema representativo de uma secção coronal cerebral contendo o hipocampo com a área selecionada (em alaranjado), de onde foram obtidas as DOI para GFAP. (B) As colunas representam a média ± EPM do log das DOI das células GFAP-positivas dos grupos veículo (n=5), CBD 3 (n=6) e CBD 30 (n=5). (C-E) Fotomicrografias representativas de células GFAP-positivas. Os detalhes em (A) e (C-E) mostram a área selecionada em que as DOI para GFAP foram obtidas. Pi: camada celular piramidal; Cmol: camada molecular lacunosum; GD: giro denteado. Barras nas fotomicrografias: C-E= 50 µm.

Tabela 4: Resumo dos resultados obtidos no capítulo 2.

Resultados comparados ao grupo veículo – CBD em mg/Kg			Tratamento agudo com CBD			Tratamento repetido com CBD			
			3	10	30	3	30		
C O M P O R T A M E N T O	CA	EC	igual	aumenta	igual	igual	igual		
		TC	aumenta	aumenta	igual	igual	igual		
		DP	igual	igual	igual	igual	igual		
	LCE	%EBA	aumenta	igual	igual	igual	igual		
		%TBA	aumenta	igual	igual	igual	igual		
		EBF	igual	igual	igual	igual	igual		
		DP	igual	igual	igual	igual	igual		
	TSC	latência	igual	igual	igual	aumenta	aumenta		
		imobilidade 4 min	diminui	diminui	igual	diminui	diminui		
	I M U N O H I S T O R I C A	Ki-67	P R O L I F E R A Ç Ã O	ZSG	___	___	___	aumenta	diminui
ZSV				___	___	___	aumenta	igual	
BrdU		ZSG		___	___	___	igual	igual	
		ZSV		___	___	___	aumenta	igual	
DCX		ZSG		___	___	___	aumenta	igual	
		ZSV		___	___	___	igual	igual	
GFAP		ZSG		___	___	___	igual	igual	
		ZSV		___	___	___	igual	igual	
BrdU		Sob. 11 dias		ZSG	___	___	___	aumenta	igual
				ZSV	___	___	___	igual	igual
				ZSG	___	___	___	aumenta	diminui
				ZSV	___	___	___	igual	igual
GFAP		Sob. 21 dias		ZSG	___	___	___	igual	igual
				ZSV	___	___	___	igual	igual
BrdU		Sob. 21 dias		ZSG	___	___	___	igual	igual
				ZSV	___	___	___	igual	igual
DCX	Sob. 21 dias	ZSG	___	___	___	igual	igual		
		ZSV	___	___	___	igual	igual		

3.5. Discussão

O presente estudo foi designado para avaliar os efeitos da administração repetida de CBD sobre o comportamento emocional de camundongos adultos e sua relação com a neurogênese hipocampal. A administração aguda de CBD (3 e 10 mg/Kg) resultou em efeito tipo-ansiolítico no CA e no LCE, bem como efeito tipo-antidepressivo no TSC, sem que houvesse alteração na atividade locomotora geral dos animais. Com a administração repetida do CBD por 15 dias, no entanto, apenas o efeito tipo-antidepressivo se manteve. Vinte e quatro horas após o término do tratamento repetido com CBD (3 mg/Kg), observamos um aumento da proliferação celular nas ZSG e ZSV (Ki-67 e BrdU), enquanto que um aumento significativo de neurônios jovens (DCX) foram detectados apenas na ZSG. Com o objetivo de determinar os efeitos do CBD sobre a maturação e a sobrevivência, a expressão de Ki-67, BrdU, DCX e GFAP foram investigadas 11 e 21 dias após o término do tratamento com CBD. Onze dias após o término do tratamento com CBD (3 mg/Kg), um aumento significativo no número de células BrdU- e DCX-positivas foi detectado na ZSG do hipocampo. Neste local, a administração repetida de CBD 30 mg/Kg produziu um efeito supressor sobre neurogênese hipocampal (DCX). Nenhuma diferença significativa entre os grupos tratados com CBD ou salina foi observada sobre a sobrevivência (BrdU) ou neurogênese (DCX) 21 dias após o término do tratamento com CBD.

No presente trabalho, observamos que a administração aguda de CBD resultou em efeitos tipo-ansiolíticos no CA e LCE. Estes efeitos foram observados com a menor dose empregada, isto é, 3 mg/Kg, enquanto as doses maiores foram desprovidas de atividade. Estes resultados estão de acordo com a literatura que indica que a administração aguda de CBD resulta em curvas dose-resposta em formato de "U" invertido (Zanelati et al., 2010; Campos et al., 2012). Já com o tratamento repetido de CBD não observamos alterações significativas nos parâmetros de ansiedade avaliados no CA ou LCE. De acordo, Campos et al. (2013), demonstraram que a administração de CBD (30 mg/Kg) por 2 semanas não modificou o comportamento de animais estressados e testados no LCE e teste de supressão da alimentação pela novidade, embora o mesmo tratamento havia

revertido efeitos tipo-ansiolíticos decorrentes da apresentação de estresse crônico e incontrolável. Da mesma forma, Cheng e colaboradores (2014), não detectaram efeitos do CBD (20 mg/Kg) administrado por 3 semanas em camundongos submetidos ao LCE. Porém, resultados contraditórios têm sido descritos com a administração repetida de CBD. Efeitos tipo-ansiolíticos moderados foram observados em camundongos C57BL/6J tratados com CBD (1 mg/Kg, 21 dias) e submetidos ao teste do claro-escuro (Long et al., 2010), e efeitos ansiolíticos do CBD (10 mg/Kg, 14 dias) foram descritos para ratos testados em paradigma de resposta emocional condicionada (ElBatsh et al., 2012). As razões para os efeitos discrepantes nos testes de ansiedade após administração crônica do CBD é desconhecida. É possível que os diferentes métodos experimentais, dose e espécies animais empregados, tenham contribuído para os resultados observados. É provável ainda que alterações neuroquímicas e/ou moleculares ocorram após a administração repetida, possam, diferencial e temporalmente (tratamento agudo vs repetido), afetar a expressão do comportamento emocional. É importante relatar que nenhuma alteração da atividade locomotora geral dos camundongos foi observada após administração aguda ou repetida de CBD, indicando que este parâmetro não interferiu com os resultados dos testes de ansiedade empregados no presente experimento.

Evidências experimentais indicam que o CBD exerce seus efeitos tipo-ansiolíticos por ação direta em receptores de serotonina do subtipo 1A (5-HT_{1A}). Zanelatti et al. (2009) demonstraram que os efeitos tipo-antidepressivos agudos do CBD também foram dependentes da ativação dos receptores 5-HT_{1A}, os quais têm sido constantemente relacionados à neurobiologia da ansiedade e depressão bem como ao mecanismo de ação de drogas ansiolíticas e antidepressivas (Graeff et al., 1996; Joca et al., 2003; Savitz et al., 2009). No presente trabalho, a administração aguda de CBD resultou em efeito tipo-antidepressivo no TSC, o qual se manteve com a administração repetida por 15 dias. Embora não tenhamos investigado o mecanismo de ação do efeito tipo-antidepressivo do CBD, é possível que este envolva também a participação de receptores 5-HT_{1A}. Não podemos desconsiderar, entretanto, que o CBD possa interferir com outros sistemas de neurotransmissores. Embora o CBD tenha uma baixa afinidade por receptores canabinoides CB₁ e CB₂

(Petitet et al., 1998; Thomas et al., 1998), este composto pode estimular, indiretamente, o sistema endocanabinoide, bloqueando a recaptação e inibindo a hidrólise enzimática da AEA (Watanabe et al., 1998; Bisogno et al., 2001). O CBD pode também diminuir a neurotransmissão glutamatérgica (Hermann, Schneider, 2012), o que poderia contribuir para seus efeitos tipo-ansiolíticos e antidepressivos. Além disto, efeitos tipo-ansiolíticos após administração repetida do CBD têm sido associados a um estímulo da neurogênese hipocampal (Campos et al., 2013; Cheng et al., 2014).

No animal adulto, a neurogênese pode ser regulada em vários níveis, tais como a proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência. Dos marcadores disponíveis, os mais utilizados para o estudo da neurogênese experimental têm sido o Ki-67 e o BrdU. O Ki-67 é uma proteína nuclear, que é expressa em todas as células em divisão durante o processo de mitose (Scholzen, Gerdes, 2000). Portanto, a identificação de células Ki-67-positivas informa a taxa de proliferação celular. Já o BrdU, um análogo da deoxitimidina, tem a propriedade de integrar-se ao DNA da célula durante a fase S da mitose e permanecer retido nesta célula por toda a sua vida. Esta propriedade do BrdU, permite traçar a linhagem da célula (célula glial ou neurônio) e o tempo de sobrevivência das mesmas que o incorporaram (Kee et al., 2002). A DCX é uma proteína que é expressa em neuroblastos jovens de forma transitória, com pico de sua expressão em torno de 2 semanas. Após este período, a expressão de DCX é gradualmente substituída por marcadores de neurônios maduros, tais como calretinina e calbidina (Coulliard-Despres et al., 2005). No presente estudo, a administração repetida de CBD 3 mg/Kg resultou em aumento da proliferação celular (Ki-67 e BrdU), tanto na ZSG como na ZSV. Neurônios DCX-positivos apresentaram-se aumentados apenas na ZSG do hipocampo. Onze dias após o término do tratamento com CBD 3 mg/kg, células BrdU-positivas apareceram com formato mais arredondado e predominantemente na CCG do GD, indicando maturação e sobrevivência. De forma inesperada, entretanto, a administração de CBD na dose de 30 mg/Kg não alterou a proliferação celular (BrdU), porém, apresentou efeito supressor sobre a neurogênese (DCX) na ZSG do hipocampo. Nenhuma diferença significativa sobre a proliferação ou neurogênese foi observada 21 dias após o tratamento com CBD. Tomados juntos, estes resultados indicam que

o efeito do CBD sobre a proliferação e neurogênese é: i) dose-específico e ii) região-específico.

A típica curva dose-efeito dual observada frequentemente para os efeitos comportamentais do CBD, repetiu-se quando avaliamos o efeito de diferentes doses de CBD sobre a proliferação celular e a neurogênese. CBD 3 mg/kg estimulou a proliferação celular e a neurogênese, enquanto CBD 30 mg/kg apresentou efeito supressor sobre a neurogênese na ZSG. As razões para este efeito dual do CBD na neurogênese são desconhecidas. Os efeitos proliferativos e neurogênicos da administração repetida de CBD têm sido atribuídos a múltiplos mecanismos, sendo que a ativação de receptores CB₁ tem mostrado papel preponderante. Por exemplo, Wolf e colaboradores (2010) demonstraram ausência de neurogênese hipocampal em animais *knockout* para receptores CB₁. Um passo a frente, Campos e colaboradores (2013) demonstraram que o uso de antagonistas CB₁ e CB₂, impediam a proliferação celular induzida pelo CBD em cultura de células hipocampais HiB5. Os mesmos autores demonstraram que o efeito do CBD era devido à inibição do metabolismo da AEA pela FAAH. Estes resultados levaram os autores a sugerirem que os efeitos do CBD, em células progenitoras hipocampais, eram mediados por receptores CB₁ e CB₂, secundários a um aumento do tônus eCB.

Na verdade, a participação de receptores CB₁ na proliferação e neurogênese hipocampal é bastante complexo. Enquanto alguns estudos mostram que a estimulação de receptores CB₁ pode aumentar, outros estudos mostram que a ativação de CB₁ está ligada a diminuição da neurogênese. Por exemplo, em um estudo, o agonista CB₁ HU210 diminuiu o número de células progenitoras hipocampais (Mackowiak et al., 2007) mas em outro estudo o mesmo composto promoveu diferenciação neuronal no hipocampo de ratos (Jiang et al., 2005). A ativação de receptores CB₁ promoveu aumento de proliferação e geração de neuroesferas *ex vivo*, a qual foi inibida nas células desprovidas da presença de receptores CB₁. Ainda, camundongos *knockout* para a FAAH, apresentaram um aumento da proliferação hipocampal (Aguado et al., 2007). Por outro lado, Rueda et al. (2002) demonstraram que a AEA inibiu a proliferação e a neurogênese, enquanto o antagonismo dos receptores CB₁ por SR41716 resultou em aumento de proliferação e diferenciação celular *in vitro*. Para outras situações experimentais,

como nocicepção (Schuelert, McDougall, 2011), epilepsia (Lutz, 2004) e ansiedade (Guimarães et al., 2005), os efeitos duais do CBD podem depender da dose empregada. De acordo com Pertwee (2005), mostraram que eCBs podem agir estimulando o receptor CB1 ou o inibindo por agirem, neste caso, como agonistas inversos. Não podemos desconsiderar, entretanto, que outros sítios de ação do CBD, tais como receptores PPAR γ e receptores vaniloides TRPV1 também podem estar envolvidos no controle da proliferação celular e na neurogênese. Esposito e colaboradores (2011) observaram que a administração de CBD em camundongos sujeitos a um modelo animal de doença de Alzheimer, resultou não só em atividade anti-inflamatória, mas também em aumento de neurônios DCX-positivos por um mecanismo envolvendo a ativação de PPAR γ .

Finalmente, observamos uma dissociação entre os efeitos funcionais (efeitos tipo-antidepressivos) e os efeitos celulares (diminuição da neurogênese) após administração repetida de CBD 30 mg Kg. Embora não usual, algumas drogas com atividade tipo-antidepressivas, como a nicotina, não aumentam a neurogênese hipocampal (Abrous et al., 2002, Mahar et al., 2012, Mudo et al., 2007; Vazquez-Palacios et al., 2005). Além disto, alguns estudos falham em mostrar efeitos neurogênicos da administração repetida de ADs, sugerindo que o efeito crônico dos ADs possam ser independentes da neurogênese (Holick et al., 2008). Considerando que ao CBD tem sido atribuído um perfil de ação farmacológica de antipsicótico atípico, Halim e colaboradores (2004) mostraram que a clozapina, não promove a sobrevivência de neurônios recém-gerados.

3.6. Conclusão

O tratamento agudo com CBD (3 e 10 mg/Kg) resultou em efeito tipo-ansiolítico no CA e no LCE e efeito tipo-antidepressivo no TSC, sem que houvesse alteração na atividade locomotora geral. Apenas o efeito tipo-antidepressivo, em animais não estressados, mantém-se após a administração repetida de CBD (3 e 30 mg/Kg) por 15 dias. A administração repetida de CBD (3 mg/Kg) aumenta a proliferação celular e a neurogênese, particularmente, na ZSG do hipocampo, uma região envolvida na resposta ao estresse e ansiedade.

**4. CONSIDERAÇÕES
FINAIS**

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

4. Considerações finais

Essa série de evidências experimentais, como os efeitos protetores do CBD sobre a morte das células do hipocampo e seus efeitos tipo-ansiolítico e tipo-antidepressivo em modelos animais, que se estendem a voluntários humanos (Zuardi et al., 1993, 1995, 2006), sugerem que o CBD apresente uma ampla gama de potencial terapêutico. Somados ao seu perfil farmacológico, esses resultados mostram que o CBD apresenta um potencial terapêutico seguro.

Embora os efeitos farmacológicos do CBD, em diferentes sistemas biológicos, venham sendo amplamente estudados, tanto por estudos *in vitro*, como *in vivo*, os mecanismos responsáveis por seu potencial terapêutico ainda não são totalmente claros. Portanto, permanece a ser investigado outros mecanismos celulares e/ou moleculares envolvidos na ampla gama terapêutica do CBD, a fim de garantir sua indicação clínica, com eficácia.

5. Referências

Abrous DN, Adriani W, Montaron MF, Aurousseau C, Rougon G, Le Moal M, Piazza PV. Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J Neurosci*. 2002;22(9):3656-3662.

Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, et al. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J*. 2005;19(12):1704-1706.

Anderson CA, Arciniegas DB. Cognitive sequelae of hypoxicischemic brain injury: a review. *Neurorehabilitation*. 2010;26(1):47–63.

Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci*. 2001;14:10-18.

Auriel E, Bornstein NM. Neuroprotection in acute ischemic stroke-current status. *J Cell Mol Med*. 2010;4(9):2200–2202.

Bachevalier J, Meunier M. Cerebral ischemia: are the memory prejuízos associated with hippocampal cell loss? *Hippocampus*. 1996;6(5):553–560.

Baddeley AJ, Gundersen HJG, Cruz-Orvie LM. Estimation of surface area from vertical sections. *J Neurosci Meth*. 1986;48:141–148.

Baimbridge KG. Calcium-binding proteins in the dentate gyrus. *Epilepsy Res Suppl*. 1992;7:211–220.

Balu DT, Lucki I. Adult hippocampal neurogenesis: Regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav*. 2009;33(3):232-52.

Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ. Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci*. 23:10411–10418.

Bendel O, Bueters T, Von Euler M, Oveogren S, Sandin J, Von Euler G. Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2005;25(12):1586–1595.

Bergamaschi MM, Queiroz RH, Chagas MH, de Oliveira DC, De Martinis BS, Kapczinski F, et al. Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naive social phobia patients. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36:1219–1226.

Bhattacharyya S, Morrison PD, Fusar-Poli P, Martin-Santos R, Borgwardt S, Winton-Brown T, et al. Opposite effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on

human brain function and psychopathology. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35:764–774.

Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol*. 2001;134:845–852.

Blum S, Luchsinger JA, Manly JJ, Schupf N, Stern Y, Brown TR, et al. Memory after silent stroke: hippocampus and infarcts both matter. *Neurology*. 2012;78(1):38–46.

Bora KS, Arora S, Shri R. Role of *Ocimum basilicum* L. in prevention of ischemia and reperfusion-induced cerebral damage, and motor dysfunctions in mice brain. *J Ethnopharmacol*. 2011;137(3):1360–1365.

Braida D, Pegorini S, Arcidiacono MV, Consalez GG, Croci L, Sala M. Post-ischemic treatment with cannabidiol prevents electroencephalographic flattening, hyperlocomotion and neuronal injury in gerbils. *Neurosci Lett*. 2003;346(1–2):61–64.

Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, et al. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci*. 2003;24:603–613.

Briones TL, Woods J, Wadowska M, Rogozinska M. Amelioration of cognitive impairment and changes in microtubule-associated protein 2 after transient global cerebral ischemia are influenced by complex environment experience. *Behavioural Brain Research*. 2006;168(2):261–271.

Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, et al. Enriched environment and physical activity stimulate Hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2003;17:2042–2046.

Campos AC, Guimarães FS. Activation of 5-HT_{1A} receptors mediates the anxiolytic effects of cannabidiol in a PTSD model. *Behav Pharmacol*. 2009;20:S54.

Campos AC, Guimarães FS. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008;199(2):223-230

Campos AC, Moreira FA, Gomes FV, Del Bel EA, Guimarães FS. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Phil Trans R Soc B*. 2012;367:3364–3378.

Campos AC, Ortega Z, Palazuelos J, Fogaça MV, Aguiar DC, Díaz-Alonso J, Ortega-Gutiérrez S, Vázquez-Villa H, Moreira FA, Guzmán M, Galve-Roperh I, Guimarães FS. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on

hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013;16(6):1407–1419.

Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience.* 1993;56:337–344.

Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci.* 2003;6:507–18

Carlini EA. The good and bad effects of (-)-trans-delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) on humans. *Toxicol.* 2004;44:461-467.

Carty ML, Wixey JA, Kesby J, Reinebrant HE, Colditz PB, Gobe G. Long-term losses of amygdala corticotropin-releasing factor neurons are associated with behavioural outcomes following neonatal hypoxia–ischemia. *Behav Brain Res.* 2010;208:609–618.

Caruana DA, Nesbitt C, Mumby DG, Chapman CA. Seizure activity in the rat hippocampus, perirhinal and prefrontal cortex associated with transient global cerebral ischemia. *J Neural Transm.* 2008;115(3):401–411.

Casarotto PC, Gomes FV, Resstel LB, Guimarães FS. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. *Behav Pharmacol.* 2010;21(4): 353-358.

Castillo A, Tolón MR, Fernández-Ruiz J, Romero J, Martínez-Orgado J. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB₂ and adenosine receptors. *Neurobiol Dis.* 2010;37(2):434–440.

Cengiz P, Kleman N, Uluc K, Kendigelen P, Hagemann T, Akture E, et al. Inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 is neuroprotective in neonatal hypoxic ischemic brain injury. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2011;14(10):1803-1813.

Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK 2000. Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *J Neurochem.* 2000;75(4):1729-1734.

Cheng D1, Low JK, Logge W, Garner B, Karl T. Chronic cannabidiol treatment improves social and object recognition in double transgenic APP_{swe}/PS1 Δ E9 mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2014; *in press*

Cheung WM, Wang CK, Kuo JS, Lin TN. Changes in the level of glial fibrillary acidic protein (GFAP) after mild and severe focal cerebral ischemia. *Chin J Physiol.* 1999;42(4):227–235.

Colangelo AM, Cirillo G, Lavitrano ML, Alberghina L, Papa M. Targeting reactive astrogliosis by novel biotechnological strategies. *Biotechnol Adv.* 2012;30(1):261–271.

Corbett D, Crooks P. Ischemic preconditioning: a long term survival study using behavioural and histological endpoints. *Brain Res.* 1997;760(1–2):129–136.

Corbett D, Nurse S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol.* 1998;54(5):531–548.

Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, et al. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 2005;21(1):1-14.

Crippa JA, Zuardi AW, Hallak JE. Therapeutical use of the cannabinoids in psychiatry. *Rev Bras Psiquiatr.* 2010;32 Suppl 1:S56-66.

Crippa JA, Zuardi AW, Garrido GE, Wichert-Ana L, Guarnieri R, Ferrari L, et al. Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. *Neuropsychopharmacology.* 2004;29,417–426.

Cummings JL, Tomiyasu U, Read S, Benson DF. Amnesia with hippocampal lesions after cardiopulmonary arrest. *Neurology.* 1984;34:679-81.

Cunha JM, Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimentel C, Gagliardi R, et al. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology.* 1980;21(3):175-185.

Dawirs RR, Hildebrandt K, Teuchert-Noodt G. Adult treatment with haloperidol increases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus. *J Neural Transm.* 1998;105(2-3):317-327.

Day HE, Kryskow EM, Nyhuis TJ, Herlihy L, Campeau S. Conditioned fear inhibits c-fos mRNA expression in the central extended amygdala. *Brain Res.* 2008;1229:137-146.

De La Tremblaye PB, Plamondon H. Impaired conditioned emotional response and object recognition are concomitant to neuronal damage in the amygdala and perirhinal cortex in middle-aged ischemic rats. *Behav Brain Res.* 2011;219(2):227–233.

De Petrocellis L, Di Marzo V. An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(1):1-15.

Devane WA, Dysarz 3rd FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988;34(5):605-613.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992;258(5090):1946-1949.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 1994;372:686-691.

Doetsch F. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2003;13(5):543-550.

Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 1999;97(6):703-716.

Dragunow M, Butterworth N, Waldvogel H, Faull RL, Nicholson LF. Prolonged expression of Fos-related antigens, Jun B and TrkB in dopamine-denervated striatal neurons. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995 Jun;30(2):393-6.

Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry*. 1997;54:597-606.

Duman RS, Malberg J, Nakagawa S. Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299(2):401-407.

Duan YL, Wang SY, Zeng QW, Su DS, Li W, Wang XR, et al. Astroglial reaction to delta opioid peptide [D-Ala², D-Leu⁵] enkephalin confers neuroprotection against global ischemia in the adult rat hippocampus. *Neuroscience*. 2011;192:81–90.

Eckenhoff MF, Rakic P. Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: a Golgi, ultrastructural, and immunocytochemical analysis in the developing rhesus monkey. *J Comp Neurol*. 1984;223:1–21.

Egertová M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB₁ receptor in rat brain. *Proc Biol Sci*. 1998;265(1410):2081-2085.

El-Alfy AT, Ivey K, Robinson K, Ahmed S, Radwan M, Slade D, et al. Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol Biochem Beha*. 2010;95(4):434-442.

EIBatsh MM, Assareh N, Marsden CA, Kendall DA. Anxiogenic-like effects of chronic cannabidiol administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012;221(2):239-247.

Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(13):7579-7584.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998;4:1313-1317.

Esposito G, De Filippis D, Maiuri MC, De Stefano D, Carnuccio R, Iuvone T. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement. *Neurosci Lett.* 2006;399(1-2):91-95.

Esposito G, Scuderi C, Valenza M, Togna GI, Latina V, De Filippis D, et al. Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. *PLoS One.* 2011;6(12):e28668.

Fernandes JS, Mori MA, Ekuni R, Oliveira RM, Milani H. Long-term treatment with fish oil prevents memory impairments but not hippocampal damage in rats subjected to transient, global cerebral ischemia. *Nutr Res.* 2008;28(11):798-808.

Fernández-Ruiz J, Sagredo O, Pazos MR, García C, Pertwee R, Mechoulam R, et al. Cannabidiol for neurodegenerative disorders: important new clinical applications for this phytocannabinoid? *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75(2):323–333.

Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, et al. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 2003;23:373–382.

Franklin KBJ, Paxinos G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* 2.ed. San Diego: Editora Academic Press; 1997.

Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci.* 2003;23:9357–9366.

Garcia C, Palomo-Garo C, Garcia-Arencibia M, Ramos J, Pertwee R, Fernández-Ruiz J. Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid Δ^9 -THC in animal models of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol.* 2011;164(7):1495–1506.

Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron.* 1999;23(2):257-271.

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

Gray JA. *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System.* Editora Oxford University Press, Britain. 1982; 53-64.

Guimarães FS, Chiaretti TM, Graeff FG, Zuardi AW. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*. 1990;100:558–559.

Guimarães VM, Zuardi AW, Del Bel EA, Guimarães FS. Cannabidiol increases Fos expression in the nucleus accumbens but not in the dorsal striatum. *Life Sci*. 2004;75(5):633-638.

Halim ND, Weickert CS, McClintock BW, Weinberger DR, Lipska BK. Effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29(6):1063-1069.

Hartfuss E, Galli R, Heins N, Gotz M. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol*. 2001;229:15–30.

Harvey BS, Ohlsson KS, Mååg JL, Musgrave IF, Smid SD. Contrasting protective effects of cannabinoids against oxidative stress and amyloid- β evoked neurotoxicity in vitro. *Neurotoxicology*. 2012;33(1):138–146.

Hayakawa K, Mishima K, Irie K, Hazekawa M, Mishima S, Fujioka M, et al. Cannabidiol prevents a post-ischemic injury progressively induced by cerebral ischemia via a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Neuropharmacology*. 2008;55(8):1280–1286.

Hayakawa K, Irie K, Sano K, Watanabe T, Higuchi S, Enoki M, et al. Therapeutic time window of cannabidiol treatment on delayed ischemic damage via high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(9):1538–1544.

Hermann D, Schneider M. Potential protective effects of cannabidiol on neuroanatomical alterations in cannabis users and psychosis: a critical review. *Curr Pharm Des*. 2012;18(32):4897-4905.

Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*. 2009;8(4):382-397.

Holick KA, Lee DC, Hen R, Dulawa SC. Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33:406–417.

Howlett AC, Fleming RM. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol*. 1984;26:532-538.

Hu H, Tomasiwicz H, Magnuson T, Rutishauser U. The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 1996;16:735–743.

Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from Cannabis

sativa, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J. Neurochem.* 2004;89(1):134–141.

Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, Zhang X. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest.* 2005;115(11):3104-3116.

Jin K, Sun Y, Xie L, Batteur S, Mao XO, Smelick C, et al. Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell.* 2003;2(3):175-183.

Joca SR, Padovan CM, Guimarães FS. Activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. *Brain Res.* 2003;978(1–2):177–184.

Karniol IG, Shirakawa I, Kasinski N, Pfeferman A, Carlini EA. Cannabidiol interferes with the effects of delta9-tetrahydrocannabinol in man. *Eur J Pharmacol.* 1974;28:172–177.

Kartsounis LD, Rudge P, Stevens JM. Bilateral lesions of CA1 and CA2 fields of the hippocampus are sufficient to cause a severe amnesic syndrome in humans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1995;59(1):95–98.

Kawai T, Takagi N, Miyake-Takagi K, Okuyama N, Mochizuki N, Takeo S. Characterization of BrdU-positive neurons induced by transient global ischemia in adult hippocampus. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2004; 24(5):548–555.

Kee NJ, Preston E, Wojtowicz JM. Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat. *Exp Brain Res.* 2001;136:313-320.

Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods.* 2002;115(1):97-105.

Keith JR, Priester C, Ferguson M, Salling M, Hancock A. Persistent increases in the pool of doublecortin-expressing neurons in the hippocampus following spatial navigation training. *Behav Brain Res.* 2008;188(2):391-397.

Kempermann G, Fabel K, Ehninger D, Babu H, Leal-Galicia P, Garthe A, et al. Why and how physical activity promotes experience-induced brain plasticity. *Front Neurosci.* 2010;4:189.

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 2004;27:447–452.

Kindy MS, Bhat AN, Bhat NR. Transient ischemia stimulates glial fibrillary acid protein and vimentin gene expression in the gerbil neocortex, striatum and hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1992;13(3):199–206.

Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol*. 2003;13(1):127-132.

Komitova M, Perfilieva E, Mattsson B, Eriksson PS, Johansson BB. Effects of cortical ischemia and postischemic environmental enrichment on hippocampal cell genesis and differentiation in the adult rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22:852-860.

Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt Md, Jessberger S, Yamaguchi M, et al. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol*. 2003;467:455–463.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*. 1996;16:2027–2033.

Kumaran D, Udayabanu M, Kumar M, Aneja R, Katyal A. Involvement of angiotensin converting enzyme in cerebral hypoperfusion induced anterograde memory impairment and cholinergic dysfunction in rats. *Neuroscience*. 2008;155(3):626–639.

Lafuente H, Alvarez FJ, Pazos MR, Alvarez A, Rey-Santano MC, Mielgo V, et al. Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery after acute hypoxia–ischemia in newborn pigs. *Pediatr Res*. 2011;70(3):272–277.

Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2005;19(1-2):96-107.

Lee TH, Kato H, Kogure K, Itoyama Y. Temporal profile of nerve growth factor like immunoreactivity after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 1996;713:199–210.

Levitt P, Rakic P. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol*. 1980;193:815–840.

Leweke FM, Piomelli D, Pahlisch F, Muhl D, Gerth CW, Hoyer C et al. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2012;2:e94.

Llorens-Martin M, Torres-Aleman I, Trejo JL. Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons. *Hippocampus*. 2006;16:480–490.

Long LE, Chesworth R, Huang XF, McGregor IS, Arnold JC, Karl T. A behavioural comparison of acute and chronic delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in C57BL/6JArc mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2010;13(7): 861-876.

Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(5):2074-2077.

Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Chain migration of neuronal precursors. *Science*. 1996;271:978–981.

Liput DJ, Hammell DC, Stinchcomb AL, Nixon K. Transdermal delivery of cannabidiol attenuates binge alcohol-induced neurodegeneration in a rodent model of an alcohol use disorder. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013;111:120-127.

Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci*. 1998;18:7768-7778.

Lucassen PJ, Meerlo P, Naylor AS, van Dam AM, Dayer AG, Fuchs E, Oomen CA, Czéh B. Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2010;20(1):1-17.

Lutz B. On-demand activation of the endocannabinoid system in the control of neuronal excitability and epileptiform seizures. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(9):1691-1698.

Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingstrom A. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry*. 2000;47:1043–1049.

Maćkowiak M1, Chocyk A, Markowicz-Kula K, Wedzony K. Acute activation of CB1 cannabinoid receptors transiently decreases PSA-NCAM expression in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Brain Res*. 2007;1148:43-52.

Mahar I, Bagot RC, Davoli MA, Miksys S, Tyndale RF, Walker CD, et al. Developmental hippocampal neuroplasticity in a model of nicotine replacement therapy during pregnancy and breastfeeding. *PLoS One*. 2012;7(5):e37219.

Malberg JE 2004. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *J Psychiatry Neurosci*. 2004;29(3):196-205.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 2000;20(24):9104-9110.

Maldonado R, Valverde O, Berrendero F. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *TRENDS in Neurosciences*. 2006;29(4):225-232.

Mao X, Yin W, Liu M, Ye M, Liu P, Liu J, et al. Osthole, a natural coumarin, improves neurobehavioral functions and reduces infarct volume and matrix metalloproteinase-9 activity after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2011;1385:275–280.

Mateen FJ, Josephs KA, Trenerry MR, Felmlee-Devine MD, Weaver AL, Carone M, et al. Long-term cognitive outcomes following out-of-hospital cardiac arrest: a population-based study. *Neurology.* 2011;77(15):1438–1445.

McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 1999;22:105-122.

Mecha M, Feliú A, Iñigo PM, Mestre L, Carrillo-Salinas FJ, Guaza C. Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: a role for A_{2A} receptors. *Neurobiol Dis.* 2013;59:141-150.

Mechoulam R, Shohami E. Endocannabinoids and traumatic brain injury. *Mol Neurobiol.* 2007;36(1):68–74.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski Ne, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1995;50(1):83-90.

Mechoulam R, Parker LA, Gallily R. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol.* 2002;42:11S-19S.

Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2005;28:223-250.

Moreira FA. O Sistema Canabinoide. In: Zuardi AW, editor. *Cannabis e Saúde Mental – Uma revisão sobre a droga de abuso e o medicamento.* 1.ed. São Paulo-SP: FUNPEC Editora. 2008;35-49.

Moreira FA, Aguiar DC, Guimarães FS 2006. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2006;30(8):1466-1471.

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

Moulaert Vr, Wachelder Em, Verbunt Ja, Wade Dt, Van Heugten CM. Determinants of quality of life in survivors of cardiac arrest. *J Rehabil Med.* 2010;42(6):553–558.

Mudò G, Belluardo N, Mauro A, Fuxe K. Acute intermittent nicotine treatment induces fibroblast growth factor-2 in the subventricular zone of the adult rat brain and enhances neuronal precursor cell proliferation. *Neuroscience.* 2007;145(2):470-483.

Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*. 2002;110(4):429–441.

Navailles S, Hof PR, Schmauss C. Antidepressant drug-induced stimulation of mouse hippocampal neurogenesis is age-dependent and altered by early life stress. *J Comp Neurol*. 2008;509(4):372–381.

Neumann JT, Cohan CH, Dave KR, Wright CB, Perez-Pinzon MA. Global cerebral ischemia: synaptic and cognitive dysfunction. *Curr Drug Targets*. 2013;14(1):20–35.

Nikonenko AG, Radenovic L, Andjus PR, Skibo GG. Structural features of ischemic damage in the hippocampus. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009;292(12):1914–1921.

Norenberg MD. Astrocytic-ammonia interactions in hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis*. 1996;16(3):245–253.

Parent JM. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neuroscientist*. 2003;9:261–272.

Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 1997;17:3727–3738.

Patrício P, Mateus-Pinheiro A, Sousa N, Pinto L. Re-cycling Paradigms: cell cycle regulation in adult hippocampal neurogenesis and implications for depression. *Mol Neurobiol*. 2013;48:84–96.

Pazos MR, Cinquina V, Gómez A, Layunta R, Santos M, Fernández-Ruiz J, et al. Cannabidiol administration after hypoxia-ischemia to newborn rats reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function. *Neuropharmacology*. 2012;63(5):776–783.

Pazos MR, Mohammed N, Lafuente H, Santos M, Martínez-Pinilla E, Moreno E, et al. Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic newborn pigs: role of 5HT_{1A} and CB2 receptors. *Neuropharmacology*. 2013;71:282–291.

Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 2005;50(4):427–434.

Pekny M, Pekna M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol*. 2004; 204(4):428–437.

Perez M, Benitez SU, Cartarozzi LP, Del Bel E, Guimarães FS, Oliveira AL. Neuroprotection and reduction of glial reaction by cannabidiol treatment after sciatic nerve transection in neonatal rats. *Eur J Neurosci*. 2013;38(10):3424–3434.

Pertwee RG. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci.* 2005;76(12):1307-1324.

Peskine A, Picq C, Pradat-Diehl P. Neurological sequelae after cerebral anoxia. *Brain Inj.* 2010;24(5):755–761.

Petitot F, Jeantaud B, Reibaud M, Imperato A, Dubroeuq MC. Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. *Life Sci.* 1998;63:PL1–PL6.

Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F. Delayed Hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology.* 1987;37:1281-1286.

Petito CK, Halaby IA. Relationship between ischemia and ischemic neuronal necrosis to astrocyte expression of glial fibrillary acidic protein. *Int J Dev Neurosci.* 1993;11(2):239–247.

Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(11):873-884.

Post RM. Transduction of psychological stress into neurobiology of recurrent affective disorder. *American J Psychiatry.* 1992;149:999-1010.

Potter DJ, Clark P, Brown MB. Potency of delta9-THC and other cannabinoids in cannabis in England in 2005: implications for psychoactivity and pharmacology. *J Forensic Sci.* 2008;53:90–94.

Prediger RD, Fernandes MS, Rial D, Wopereis S, Pereira VS, Bosse TS, et al. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *J Ethnopharmacol.* 2008;120(3):465–473.

Prickaerts J, Koopmans G, Blokland A, Scheepens A. Learning and adult neurogenesis. Survival with or without proliferation. *Neurobiol Learn Mem.* 2004;81:1–11.

Raber J, Fan Y, Matsumori Y, Liu Z, Weinstein PR, Fike JR, et al. Irradiation attenuates neurogenesis and exacerbates ischemia-induced preújizos. *Annals of Neurology.* 2004;55(3):381–389.

Rami A, Brehier A, Thomasset M, Rabie A. Cholecalciferol (28-kDa calcium-binding protein) in the rat hippocampus: development in normal animals and in altered thyroid states. An immunocytochemical study. *Dev Biol.* 1987;124:228–238.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Farmacologia.* 7.ed. Rio de Janeiro-RJ: Elsevier Editora. 2011;221-227.

Resstel LB, Joca SR, Moreira FA, Corrêa FM, Guimarães FS. Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res*. 2006;172(2):294-298.

Resstel LB, Tavares RF, Lisboa SF, Joca SR, Corrêa FM, Guimarães FS. 5-HT_{1A} receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol*. 2009;156(1):181-188.

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci*. 1997;20(12):570-577.

Riquelme PA, Drapeau E, Doetsch F. Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008;363(1489):123-137.

Robel S, Berninger B, Götz M. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(2):88-104.

Robertson GS, Fibiger HC. Neuroleptics increase c-fos expression in the forebrain: contrasting effects of haloperidol and clozapine. *Neuroscience*. 1992;46(2):315-328.

Rueda D, Navarro B, Martinez-Serrano A, Guzman M, Galve-Roperh I. The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway. *J Biol Chem*. 2002;277(48):46645-46650.

Sachdev PS, Chen X, Joscelyne A, Wen W, Brodaty H. Amygdala in stroke/transient ischemic attack patients and its relationship to cognitive impairment and psychopathology: the Sydney stroke study. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2007;15:487-496.

Sagredo O, Pazos MR, Satta V, Ramos JA, Pertwee RG, Fernández-Ruiz J. Neuroprotective effects of phytocannabinoid-based medicines in experimental models of Huntington's disease. *J Neurosci Res*. 2011;89(9):1509-1518.

Sairanen M, O'leary OF, Knuutila JE, Castrén E. Chronic antidepressant treatment selectively increases expression of plasticity-related proteins in the hippocampus and medial prefrontal cortex of the rat. *Neuroscience*. 2007;144:368-374.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 2003;301:805-809.

Saito VM, Wotjak CT, Moreira FA. Pharmacological exploitation of the endocannabinoid system: new perspectives for the treatment of depression and anxiety disorders? *Rev Bras de Psiqu*. 2010;32(1):S7-S14.

Sapolsky RM. Cortisol concentrations and the social significance of rank instability among wild baboons. *Psychoneuroendocrinology*. 1992;17:701-709.

Savitz J, Lucki I, Drevets WC. 5-HT_{1A} receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol*. 2009;88:17–31.

Schiavon AP, Milani H, Romanini CV, Foresti ML, Castro OW, Garcia-Cairasco N, et al. Imipramine enhances cell proliferation and decreases neurodegeneration in the hippocampus after transient global cerebral ischemia in rats. *Neurosc Letters*. 2010;470:43-48.

Schiavon AP, Soares LM, Bonato JM, Guimarães FS, Milani H, Oliveira RMMW. Protective effects of cannabidiol against hippocampal cell death and cognitive impairment induced by bilateral common carotid artery occlusion in mice. *Neurotoxicity Research*. 2014; *in press*.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-322.

Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res*. 2005;1035(1):24–31.

Schuelert N, McDougall JJ. The abnormal cannabidiol analogue O-1602 reduces nociception in a rat model of acute arthritis via the putative cannabinoid receptor GPR55. *Neurosci Lett*. 2011;500(1):72-76.

Scott BW, Chan KF, Wong G, Ahmed M, Chieverton L, Liu RR, et al. Cytogenesis in the adult rat dentate gyrus is increased following kindled seizures but is unaltered in pharmacological models of absence seizures. *Epilepsy Behav*. 2010;18(3):179-185.

Seri B, García-Verdugo JM, Mcewen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*. 2001;21(18):7153–7160.

Shah PJ, Ebmeier KP, Glabus MF, Goodwin GM. Cortical grey matter reductions associated with treatment-resistant chronic unipolar depression. Controlled magnetic resonance imaging study. *Br J Psychiatry*. 1998;172:527-532.

Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:3908-3913.

Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci*. 2001;21(24):9733-9743.

Shinjyo N, Di Marzo V. The effect cannabichromene on adult neural stem/progenitor cells. *Neurochem*. 2013;63(5):432–437.

Shors TJ, Anderson ML, Curlik 2nd DM, Nokia MS. Use it or lose it: how neurogenesis keeps the brain fit for learning. *Behav Brain Res.* 2012;227(2):450–458.

Soares LM, Schiavon AP, Milani H, De Oliveira RM. Cognitive impairment and persistent anxiety-related responses following bilateral common carotid artery occlusion in mice. *Behav Brain Res.* 2013;249:28–37.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P, Porsolt R. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology.* 1985;85:367–370.

Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol.* 1998;56(2):149–171.

Sudo Y, Takahara Y, Nakajima N. Pulsatile cardiopulmonary bypass failed to prevent neuropsychological dysfunction. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;7(2):89-93.

Suyama S, Sunabori T, Kanki H, Sawamoto K, Gachet C, Koizumi S, et al. Purinergic signaling promotes proliferation of adult mouse subventricular zone cells. *J Neurosci.* 2012;32(27):9238-9247.

Szydlowska K, Gozdz A, Dabrowski M, Zawadzka M, Kaminska B. Prolonged activation of ERK triggers glutamate-induced apoptosis of astrocytes: neuroprotective effect of FK506. *J Neurochem.* 2010;113(4):904–918.

Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, Yodoi J, Ishikawa M, Hashimoto N. Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. *Brain Res.* 1999;831:283-287.

Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2004;72(2):111–127.

Tanapat P, Galea LA, Gould E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci.* 1998;16(3-4):235-239.

Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, Gould E. Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol.* 2001;437(4):496-504.

Thomas BF, Gilliam AF, Burch DF, Roche MJ, Seltzman HH. Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;285:285–292.

Valdeolivas S, Satta V, Pertwee Rg, Fernández-Ruiz J, Sagredo O. Sativex-like combination of phytocannabinoids is neuroprotective in malonate-lesioned rats, an

- inflammatory model of Huntington's disease: role of CB1 and CB2 receptors. *ACS Chem Neurosci*. 2012;3(5):400–406.
- Van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*. 2002;415:1030–1034.
- Vázquez-Palacios G, Bonilla-Jaime H, Velázquez-Moctezuma J. Antidepressant effects of nicotine and fluoxetine in an animal model of depression induced by neonatal treatment with clomipramine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005;29(1):39-46.
- Von Bohlen, Halbach O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*. 2011;345(1):1–19.
- Von Bohlen, Halbach O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res*. 2007;329(3):409-420.
- Wakade CG, Mahadik SP, Waller JL, Chiu FC. Atypical neuroleptics stimulate neurogenesis in adult rat brain. *J Neurosci Res*. 2002;69(1):72-79.
- Watanabe K, Ogi H, Nakamura S, Kayano Y, Matsunaga T, Yoshimura H, et al. Distribution and characterization of anandamide amidohydrolase in mouse brain and liver. *Life Sci*. 1998;62(14):1223–1229.
- Wolf SA, Bick-Sander A, Fabel K, Leal-Galicia P, Tauber S, Ramirez-Rodriguez G, et al. Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis. *Cell Commun Signal*. 2010;8:12.
- Wong ML, Licinio J. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2:343-351.
- Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa K, Miyata T, Okano H, et al. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke*. 2001;32:1890-1896.
- Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimarães FS, Joca SR. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. *Br J Pharmacol*. 2010;159(1):122-128.
- Zhang L, Fu F, Zhang X, Zhu M, Wang T, Fan H. Escin attenuates cognitive prejuízos and hippocampal injury after transient global cerebral ischemia in mice via regulating certain inflammatory genes. *Neurochem Int*. 2010;57(2):119–127.
- Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the Hippocampus. *J Neurosci*. 1986;6(10):2950–2967.

Zuardi AW. Aspectos Históricos da *Cannabis* na Medicina e em Saúde Mental. In: Zuardi AW, editor. *Cannabis e Saúde Mental – Uma revisão sobre a droga de abuso e o medicamento*. 1.ed. São Paulo-SP: FUNPEC Editora. 2008;3-16.

Zuardi AW, Cosme RA, Graeff FG, Guimarães FS. Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. *J Psychopharmacol*. 1993;7(1 Suppl):82-88.

Zuardi AW, Hallak JE, Dursun SM, Morais SL, Sanches RF, Musty RE, Crippa JA. Cannabidiol monotherapy for treatment-resistant schizophrenia. *J Psychopharmacol*. 2006;20(5):683-686.

Zuardi AW, Karniol IG. Changes in the conditioned emotional response of rats induced by Δ^9 -THC, CBD and mixture of the two cannabinoids. *Braz Arch Biol Technol*. 1983;26:391–397.

Zuardi AW, Morais SL, Guimarães FS, Mechoulam R. Antipsychotic effect of cannabidiol. *J Clin Psychiatry*. 1995;56(10):485-486.

Zuardi AW, Rodrigues JA, Cunha JM. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 1991;104(2):260-264.

Zuardi AW, Shirakawa I, Finkelfarb E, Karniol IG 1982. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by Δ^9 -THC in normal subjects. *Psychopharmacology (Berl)*. 1982;76(3):245-250.

