

**LUCAS DE OLIVEIRA MAIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA  
DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS FITOCANABINOIDES  
DELTA-9-TETRAHIDROCANABINOL E CANABIDIOL  
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo - Escola Paulista de Medicina,  
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO

2012

**LUCAS DE OLIVEIRA MAIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA  
DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS FITOCANABINOIDES  
DELTA-9-TETRAHIDROCANABINOL E CANABIDIOL  
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo - Escola Paulista de Medicina,  
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Elisaldo Luis de Araujo Carlini

Coorientadora: Profa. Dra. Deborah Suchecki

SÃO PAULO

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGIA**  
**DISCIPLINA DE PSICOFARMACOLOGIA**

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Maria Lucia Oliveira de Souza Formigoni

Coordenadora da Pós-Graduação: Profa. Dra. Vânia D'Almeida

**LUCAS DE OLIVEIRA MAIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE  
OS FITOCANABINOIDES DELTA-9-TETRAHIDROCANABINOL E  
CANABIDIOL EM CAMUNDONGOS**

**BANCA EXAMINADORA**

**Membros:**

Prof. Dr. Antonio Waldo Zuardi

Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

**Suplente:**

Prof. Dr. José Carlos Fernandes Galduróz

Dissertação homologada em: 28/11/2012

## **DEDICATÓRIA**

*À minha “mãe científica”, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Mazaro e Costa.*

*Pelo exemplo de dedicação, paciência, atenção, generosidade,  
companheirismo e talento.*

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais, Sarita Quadrado de Oliveira e Paulo Ernane Moura Maia, pelo incentivo e apoio incondicional.*

*À minha irmã, Paula de Oliveira Maia, e a toda minha família, por estar sempre torcendo por mim.*

*À minha primeira orientadora, Profa. Renata Mazaro e Costa, por ter contribuído para a minha entrada na Unifesp e me apoiado em todas as minhas decisões. Sem contar as diversas vezes que, em cima da hora, ela corrigiu gentilmente os meus projetos, relatórios, artigos, etc.*

*À Profa. Monica Andersen, por ter aberto as portas do Departamento de Psicobiologia para mim...*

*Ao Prof. Elisaldo Carlini, que me concedeu a satisfação e a honra de ser orientado por um verdadeiro Mestre.*

*À todos os membros do CEBRID, em especial ao grupo de Plantas Medicinais, pelo acolhimento e apoio de sempre.*

*À Profa. Deborah Suchecki, que, aos 45 do segundo tempo, aceitou gentilmente coorientar este projeto, tendo contribuído de forma significativa para a concepção do mesmo.*

*À FAPESP e à CAPES, pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.*

*Ao José Gilberto Barbosa de Carvalho (“Gilbertinho”), pela paciência e atenção quando precisei de ajuda para preparar as drogas utilizadas neste trabalho. Do mesmo modo que agradeço ao Vinícius Bunscheit, pela ajuda na realização dos experimentos.*

*À todos os membros do Coletivo Curare e do Projeto ResPire, que compartilham comigo um sonho, e que contribuíram significativamente para o meu amadurecimento científico e profissional. Juntos passamos bons momentos!*

*Ao meu grande amigo Luciano Dutra, com quem dividi um lar por todos estes anos; sempre companheiro.*

*Às minhas grandes amigas Maria Angélica Comis e Raquel Luna, sempre presentes, inclusive em momentos delicados dessa caminhada.*

*E, finalmente, à minha querida Ana Cristhina Sampaio Maluf (“Tina”), pela parceria, pela paciência e atenção nos momentos cruciais, e por me trazer tamanha alegria a cada dia.*

*“Uma vida sem busca não é digna de ser vivida.”*

*Sócrates*



## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>xi</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>xii</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1. Depressão .....	1
1.2. <i>Cannabis sativa</i> e os canabinoides .....	7
1.3. O sistema endocanabinoide .....	8
1.4. Canabinoides como antidepressivos .....	12
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>17</b>
2.1. Objetivo geral .....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>19</b>
3.1. Animais.....	19
3.2. Drogas.....	20
3.3. Avaliação da atividade locomotora .....	21
3.4. Teste do nado forçado.....	21
3.5. Teste da suspensão pela cauda.....	23
3.6. Inibição da hipotermia induzida por apomorfina .....	23
3.7. Grupos experimentais e delineamento experimental .....	24
3.8. Análise estatística .....	25
<b>4. Resultados</b> .....	<b>28</b>
Atividade Locomotora: curva dose-resposta do $\Delta^9$ -THC .....	28
Teste do Nado Forçado: curva dose-resposta do $\Delta^9$ -THC .....	29

Teste do Nado Forçado: $\Delta^9$ -THC + CBD (5 mg/kg cada) .....	31
Teste do Nado Forçado: curva dose-resposta da imipramina .....	32
Teste de Suspensão pela Cauda: $\Delta^9$ -THC + CBD (5 mg/kg cada).....	33
Teste de Suspensão pela Cauda: $\Delta^9$ -THC 1,25 mg/kg + CBD 10 mg/kg .....	34
Inibição da Hipotermia induzida por Apomorfina: $\Delta^9$ -THC 2,5 mg/kg .....	35
Inibição da Hipotermia induzida por Apomorfina: $\Delta^9$ -THC + CBD (1 mg/kg) ..	37
<b>5. Discussão .....</b>	<b>39</b>
Efeitos do $\Delta^9$ -THC e do CBD nos modelos de desamparo comportamental ..	39
Efeitos da interação $\Delta^9$ -THC + CBD .....	45
Efeitos do $\Delta^9$ -THC sobre a atividade locomotora .....	47
Efeitos do $\Delta^9$ -THC sobre a hipotermia induzida por apomorfina .....	48
Considerações finais .....	49
Conclusões.....	49
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>50</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Desenho esquemático dos experimentos realizados .....	22
<b>Figura 2.</b> Efeitos do $\Delta^9$ -THC sobre a atividade locomotora.....	25
<b>Figura 3.</b> Efeitos do $\Delta^9$ -THC no teste do nado forçado .....	27
<b>Figura 4.</b> Efeitos da associação $\Delta^9$ -THC+CBD no teste do nado forçado .....	28
<b>Figura 5.</b> Efeitos da imipramina no teste do nado forçado .....	29
<b>Figura 6.</b> Efeitos da associação $\Delta^9$ -THC+CBD no teste de suspensão pela cauda .....	30
<b>Figura 7.</b> Efeitos do $\Delta^9$ -THC no teste de inibição da hipotermia induzida por apomorfina .....	33
<b>Figura 8.</b> Efeitos da associação $\Delta^9$ -THC+CBD no teste de inibição da hipotermia induzida por apomorfina .....	34

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Efeitos da associação $\Delta^9$ -THC+CBD (proporção de 1 : 8) no teste de suspensão pela cauda .....	32
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANOVA:** análise de variância

**$\Delta^9$ -THC:** (-)-*trans*- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol

**2-AG:** 2-araquidonoil-glicerol

**5-HT:** 5-hidroxitriptamina (serotonina)

**ADT:** antidepressivo(s) tricíclico(s)

**AMPc:** adenosina monofosfato cíclica

**BDNF:** fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain derived neurotrophic factor*)

**CBC:** canabicromeno

**CBD:** canabidiol

**CBG:** canabigerol

**CBN:** canabinol

**DA:** 3,4-dihidroxifenetilamina (dopamina)

**EP:** erro padrão da média

**FAAH:** hidrolase de amida de ácido graxo (*fatty acid amide hydrolase*)

**GABA:** ácido gama-aminobutírico

**IHA:** inibição da hipotermia induzida por apomorfina

**IMAO:** inibidor(es) da monoaminoxidase

**IRSN:** inibidor(es) da recaptção de serotonina e noradrenalina

**ISRD:** inibidor(es) seletivo(s) da recaptção de dopamina

**ISRN:** inibidor(es) seletivo(s) da recaptção de noradrenalina

**ISRS:** inibidor(es) seletivo(s) da recaptção de serotonina

## LISTA DE ABREVIATURAS

**NA:** noradrenalina

**NDR:** núcleo dorsal da rafe

**NGF:** fator de crescimento neuronal (*neuronal growth factor*)

**TDM:** transtorno depressivo maior

**TNF:** teste do nado forçado

**TSC:** teste de suspensão pela cauda

## RESUMO

As evidências obtidas em estudos pré-clínicos demonstram que as substâncias contidas na planta *Cannabis sativa* L., os fitocanabinoides, e outras drogas que atuam sobre o sistema endocanabinoide apresentam efeitos em modelos animais preditivos de atividade antidepressiva. Entretanto, os efeitos da interação entre os principais fitocanabinoides farmacologicamente ativos, o (-)-*trans*- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) e o canabidiol (CBD), são desconhecidos nestes modelos. Neste sentido, este estudo buscou avaliar os efeitos da interação entre o  $\Delta^9$ -THC e o CBD nos testes da natação forçada (TNF), suspensão pela cauda (TSC) e inibição da hipotermia induzida por apomorfina (IHA) em camundongos. Camundongos suíços machos adultos receberam uma administração aguda intraperitoneal (i.p.) de  $\Delta^9$ -THC (1, 1,25, 2,5 e 5 mg/kg), CBD (1, 5 e 10 mg/kg), a associação entre  $\Delta^9$ -THC e CBD (proporções de 1:1 e 1:8), imipramina (5, 15 e 30 mg/kg) ou veículo e foram submetidos aos testes trinta minutos após a administração das drogas. Os efeitos do  $\Delta^9$ -THC (0,625, 1,25, 2,5, 5 e 10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade locomotora dos camundongos também foram avaliados utilizando caixas de atividade locomotora. Os resultados mostraram que o  $\Delta^9$ -THC (5 mg/kg) induziu efeitos sugestivos de atividade antidepressiva no TNF e efeitos sugestivos de atividade depressiva no TSC. O CBD administrado isoladamente não alterou os parâmetros avaliados nas doses testadas. Contudo, o CBD (5 mg/kg) atenuou os efeitos do  $\Delta^9$ -THC (5 mg/kg) sobre a imobilidade no TNF e no TSC quando estes compostos foram administrados simultaneamente. Não houve efeito de ambos os compostos estudados sobre a hipotermia induzida por apomorfina (10 mg/kg). Estes resultados demonstram que o CBD interfere nos efeitos do  $\Delta^9$ -THC sobre a imobilidade em camundongos, evidenciando uma interação farmacológica entre estes fitocanabinoides sobre o desamparo comportamental.

# | INTRODUÇÃO



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Depressão

A Depressão é um dos transtornos mentais mais prevalentes e debilitantes. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a depressão está entre as três principais causas específicas de incapacitação e é hoje um problema de saúde pública de magnitude crescente, com consequências socioeconômicas significativas (Murray e Lopez, 1997; World Health Organization - WHO, 2001).

Atualmente, estima-se que a depressão afeta cerca de 350 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2012), e a prevalência global deste transtorno varia de 4,7 a 7,5% para as mulheres e de 3,2 a 4,5% para os homens (Ferrari *et al.*, 2012). Ainda, a depressão está associada a uma taxa de mortalidade elevada, com índices de suicídio que chegam a 15% (American Psychiatric Association - APA, 2002).

De acordo com a *Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde* (CID-10 - OMS, 1993) e o *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais* (DSM-IV-TR - APA, 2002), a depressão está inserida no conjunto dos transtornos do humor e compreende um diagnóstico heterogêneo subdividido em classes, dentre as quais se destaca o transtorno depressivo maior (TDM).

O TDM compreende alterações em quatro campos do funcionamento humano: afetivo, cognitivo, comportamental e fisiológico. No aspecto afetivo, a depressão caracteriza-se principalmente por sentimentos de ansiedade,

angústia, medo, desânimo, culpa, inferioridade, perda de interesse por atividades normalmente prazerosas (anedonia) e ideação suicida. O aspecto cognitivo inclui prejuízos na memória, aprendizagem, raciocínio, atenção e orientação. No aspecto comportamental, observam-se alterações na esfera sexual, no apetite e no sono, tendência ao isolamento, crises de choro e redução da volição. Diferentes sintomas somáticos também podem ocorrer, como dores pelo corpo, cansaço e cefaleia (OMS, 1993; APA, 2002; Almeida *et al.*, 2011).

A base causal para a patologia depressiva é desconhecida. Segundo Akiskal e McKinney (1975), a causa da depressão integra aspectos de origem psicoanalítica, comportamental, sociológica, existencial e biológica. Em relação à perspectiva biológica, diversos estudos têm sugerido que a neurobiologia desse transtorno é complexa e envolve múltiplos sistemas. Os mecanismos implicados em sua fisiopatologia englobam desde fatores genéticos, que conferem suscetibilidade, alterações neuroquímicas, disfunções em circuitos cerebrais e desregulação no processamento de informações, até fatores ambientais precipitantes, como o estresse crônico (Caspi *et al.*, 2003; Fries *et al.*, 2011).

No aspecto neuroquímico, a teoria clássica para explicar a origem do transtorno depressivo é a hipótese monoaminérgica. Ela propõe que a depressão está relacionada a um déficit de monoaminas, especialmente serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA), em determinadas regiões cerebrais (Schildkraut e Kety, 1967). Inicialmente, a teoria monoaminérgica se baseou na observação de que pacientes hipertensivos tratados por longos períodos com a reserpina, um alcaloide extraído da planta *Rauwolfia serpentina*, desenvolviam

uma síndrome depressiva (Freis, 1954). Estudos posteriores verificaram que a reserpina causa depleção dos estoques de monoaminas quando administrada cronicamente (Carlsson *et al.*, 1957; Mirkin, 1958). Isto ocorre porque essa substância bloqueia o transporte das monoaminas para as vesículas sinápticas, o que acarreta na metabolização desses neurotransmissores pela monoaminoxidase (MAO) (McQueen *et al.*, 1954; Henry e Scherman, 1989).

A seguir, estudos com o uso de drogas inibidoras da MAO (IMAO) revelaram que estas substâncias revertem a depleção de monoaminas induzida pela reserpina (Canal e Maffei-Faccioli, 1959). Desta forma, a inibição da MAO impede que as monoaminas sejam metabolizadas no citoplasma pré-sináptico e, conseqüentemente, leva a um aumento das concentrações intracelulares dessas moléculas. De forma semelhante, foi descoberto que a imipramina e outros antidepressivos tricíclicos inibem a recaptação NA e 5-HT, o que levou à conclusão de que a ação dessas medicações se dava pelo aumento da quantidade desses neurotransmissores nas sinapses (Klerman e Cole, 1965).

Estes achados levaram a uma hipótese simples: a depressão resulta de transmissões sinápticas disfuncionais e antidepressivos clinicamente eficazes exercem seus efeitos por aumentar as concentrações das monoaminas. No entanto, esta hipótese não explica o fato de que são necessárias semanas de tratamento para que a eficácia clínica dos antidepressivos se torne aparente, embora estas drogas exerçam suas ações farmacológicas de modo imediato. Esse atraso do efeito terapêutico levou a investigações sobre adaptações em longo prazo no funcionamento cerebral sob ação dos antidepressivos (Fries *et al.*, 2011).

Atualmente, tem se destacado a hipótese de que o aumento das concentrações de monoaminas induz mudanças adaptativas na neurotransmissão monoaminérgica, que ocorrem por alterações de vias de sinalização intracelular. Esta teoria postula que os responsáveis pelos efeitos terapêuticos finais são os processos intracelulares que levam, em última instância, ao aumento na expressão gênica de fatores neurotróficos (ou neurotrofinas), moléculas que promovem o desenvolvimento, a sobrevivência e a função de neurônios (Chao, 2003; Fries *et al.*, 2011).

Nesse sentido, destaca-se o fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain Derived Neurotrophic Factor - BDNF*). Diversos estudos demonstram diminuição nas concentrações plasmáticas e séricas de BDNF em pacientes depressivos, assim como uma correlação entre a concentração dessa neurotrofina e a gravidade da doença (Cunha *et al.*, 2006; Dell'Osso *et al.*, 2010). Além disso, drogas antidepressivas aumentam as concentrações de BDNF *in vitro* e *in vivo*, e observações experimentais demonstram que a deficiência de BDNF contribui para a fisiopatologia da doença (Deltheil *et al.*, 2008; Castren e Rantamaki, 2010).

Contudo, a teoria das neurotrofinas também apresenta controvérsias. Estudos com o uso de animais transgênicos que não expressam BDNF revelaram que, apesar da ausência deste fator neurotrófico, estes animais não são mais propensos a apresentar comportamentos sugestivos de sintomas depressivos (MacQueen *et al.*, 2001). Além disso, o efeito antidepressivo de drogas como a imipramina pode ocorrer mesmo sem alterar as concentrações de BDNF (Zanelati *et al.*, 2010). No entanto, mesmo quando as concentrações

dessa neurotrofina estão normais, o efeito antidepressivo depende da integridade do sistema serotoninérgico (Hamani *et al.*, 2012).

Não obstante, outros neurotransmissores também parecem estar envolvidos na fisiopatologia da depressão, como a dopamina (DA) (Harro e Oreland, 2001), o ácido gama-aminobutírico (GABA) (Shiah e Yatham, 1998), e a acetilcolina (Dilsaver, 1986). Além disso, alguns neuropeptídeos parecem participar de forma regulatória na neurobiologia da doença, como é o caso do hormônio liberador de corticotrofina, o neuropeptídeo Y e a anandamida (Graeff e Guimarães, 2001; Harro e Oreland, 2001; Schloss e Henn, 2004; Serra e Fratta, 2007).

Tomados em conjunto, estes dados corroboram a ideia de que diferentes circuitos, envolvendo diferentes neurotransmissores, neuromoduladores e fatores de crescimento neuronal podem estar alterados na depressão. Contudo, a capacidade das principais drogas antidepressivas em reduzir ou eliminar os sintomas da doença está intimamente relacionada ao aumento da neurotransmissão nas vias monoaminérgicas, o que mantém em foco a teoria clássica das monoaminas (Barros *et al.*, 2002; Stahl, 2003).

O tratamento da depressão pode ser realizado por meio de terapia farmacológica, psicoterapia, eletroconvulsoterapia ou associações de mais de uma modalidade terapêutica. Na abordagem farmacológica, os antidepressivos podem ser classificados de acordo com as suas propriedades, tais como: inibidores não seletivos da recaptura de monoaminas, também conhecidos como antidepressivos tricíclicos (ex. imipramina e amitriptilina), IMAO (ex. fenelzina e moclobemida), inibidores seletivos da recaptura de 5-HT (ISRS; ex. fluoxetina e sertralina), inibidores seletivos da recaptura de NA (ISRN; ex.

reboxetina), inibidores da recaptção de 5-HT e NA (IRSN; venlafaxina e duloxetina); e inibidores seletivos da recaptção de DA (ISRD; bupropiona) (Moreno *et al.*, 1999; Graeff e Guimarães, 2001).

Desta forma, percebe-se que o número de opções para o tratamento farmacológico da depressão é expressivo. No entanto, todas apresentam limitações significativas. Conforme mencionado anteriormente, uma característica comum a todos os antidepressivos é o início tardio da ação terapêutica, que requer um período médio de 2 a 4 semanas. Além do mais, cerca de um terço dos pacientes depressivos não respondem aos medicamentos disponíveis ou apresentam crises recorrentes (Stahl, 1996; Souza e Ceará, 1999; McKim, 2000; Schatzberg *et al.*, 2003; Bambico e Gobbi, 2008; Zisook *et al.*, 2008). Segundo Gumnick e Nemeroff (2000), um antidepressivo ideal deveria ter eficácia alta, agir rapidamente, ser seguro, simples de administrar e sem efeitos adversos importantes. Portanto, apesar da vasta gama de drogas disponíveis, a psicofarmacologia carece de um antidepressivo ideal ou próximo disso, principalmente devido ao tempo para observação de melhora clínica e a baixa incidência de efeitos adversos.

Esses fatos têm justificado a realização de estudos com o intuito de desenvolver novas drogas antidepressivas que sejam eficazes e não apresentem efeitos adversos significativos. Nesse contexto, os modelos animais são ferramentas fundamentais para a obtenção de evidências científicas que subsidiem a investigação clínica de novos fármacos. O uso de modelos animais na pesquisa sobre transtornos psiquiátricos é orientado por dois objetivos principais: elucidar os mecanismos neurais envolvidos na fisiopatologia de um determinado transtorno; e avaliar novas alternativas

terapêuticas, incluindo manipulações farmacológicas e não farmacológicas. Nesse sentido, os modelos animais fornecem um conhecimento aprofundado a respeito dos mecanismos cerebrais envolvidos nos transtornos mentais e proporcionam a descoberta de novas opções terapêuticas para o tratamento dos pacientes psiquiátricos (Vázquez et al., 2010).

## 1.2. *Cannabis sativa* e os canabinoides

A *Cannabis sativa* L. (Canabaceae) é uma planta utilizada para fins medicinais e hedonísticos há milênios. O potencial terapêutico desta planta vem sendo avaliado cientificamente desde o século XIX (ver revisões Mechoulam e Carlini, 1978; Zuardi, 2006). Entretanto, a partir da década de 60, as pesquisas sobre os efeitos da *Cannabis* cresceram significativamente devido à elucidação das estruturas químicas dos principais constituintes farmacologicamente ativos da planta, os fitocanabinoides (Mechoulam e Shvo, 1963; Gaoni e Mechoulam, 1964).

Hoje, já foram identificados mais de 500 constituintes da *Cannabis*, sendo cerca de 100 deles encontrados unicamente neste gênero. Os fitocanabinoides mais abundantes incluem: o (-)-*trans*- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), o canabidiol (CBD), o canabinol (CBN), o canabigerol (CBG) e o canabicromeno (CBC) (ver revisões Mechoulam e Hanus, 2000; Hill *et al.*, 2012).

Os primeiros testes com fitocanabinoides isolados evidenciaram que os efeitos conhecidos da *Cannabis* podiam ser atribuídos ao  $\Delta^9$ -THC. Os estudos da época demonstraram que outros fitocanabinoides, entre eles o CBD, não

mimetizavam os efeitos da planta, o que levou a considerá-los como inativos (Carlini, 1969; Mechoulam, 1970). Essa opinião começou a mudar no início da década de 70, quando um grupo de pesquisadores brasileiros realizou diversos estudos demonstrando que os efeitos da *Cannabis* não podiam ser totalmente explicados pelo conteúdo de  $\Delta^9$ -THC na planta e revelaram que o CBD interfere nos efeitos do  $\Delta^9$ -THC, tanto em animais como em humanos (Carlini *et al.*, 1970, 1974; Karniol e Carlini, 1972, 1973; Karniol *et al.*, 1974; Zuardi *et al.*, 1981, 1982, 1984; Zuardi e Karniol, 1983). Estudos posteriores realizados por pesquisadores estrangeiros corroboraram essa descoberta (Davis e Borgen, 1974; Fernandes *et al.*, 1974; Hollister e Gillespie, 1975; Dalton *et al.*, 1976; Brady e Balster, 1980; Hiltunen e Jarbe, 1986). Recentemente, outros trabalhos têm confirmado e acrescentado novas evidências sobre a interação entre o  $\Delta^9$ -THC e o CBD (Varvel *et al.*, 2006; Hayakawa *et al.*, 2008; Vann *et al.*, 2008; Malone *et al.*, 2009; Klein *et al.*, 2011; Zuardi *et al.*, 2012).

### 1.3. O sistema endocanabinoide

As primeiras evidências da existência de um sistema de neurotransmissão canabinoide endógeno (endocanabinoide) ocorreram quando Howlett e Fleming (1984) demonstraram que o  $\Delta^9$ -THC inibe a atividade da enzima adenilil ciclase. Essa inibição promove redução das concentrações intracelulares de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), o que sugere um sistema de tradução de sinais mediada pela ativação de receptores acoplados à proteína G<sub>i</sub> (Howlett, 1985; Howlett *et al.*, 1986). Esta descoberta foi seguida pela identificação de um sítio de ligação para o  $\Delta^9$ -THC no cérebro de ratos



(Devane *et al.*, 1988). Estes achados culminaram na localização, clonagem e sequenciamento do primeiro receptor canabinoide, denominado como CB<sub>1</sub> (*Cannabinoid Binding receptor type-1*) (Herkenham *et al.*, 1990; Matsuda *et al.*, 1990).

Os receptores CB<sub>1</sub>, acoplados à proteína G, estão entre os mais abundantes no cérebro de mamíferos (Matsuda *et al.*, 1990; Herkenham *et al.*, 1990, 1991). Estes receptores localizam-se, predominantemente, em terminações pré-sinápticas de neurônios que utilizam diferentes tipos de neurotransmissores (Hajos *et al.*, 2000; Katona *et al.*, 2000). A ativação dos receptores CB<sub>1</sub> resulta em inibição da adenilil ciclase, o que leva, em última instância, à hiperpolarização neuronal e à diminuição da liberação de neurotransmissores (ver revisão, Breivogel e Sim-Selley, 2009).

Os receptores CB<sub>1</sub> são amplamente expressos nas camadas internas do bulbo olfativo, hipocampo (sobretudo giro denteado e região CA3), estriado lateral, núcleos estriatais (globo pálido, núcleo entopeduncular, *substantia nigra pars reticulata*) e cerebelo (camada molecular); expressos moderadamente no prosencéfalo e alguns núcleos do tronco cerebral e medula espinhal, áreas do córtex cerebral (sobretudo no lobo frontal, parietal e cíngulo), *septum*, amígdala (núcleo do trato olfativo lateral), hipotálamo ventromedial, subnúcleo lateral do núcleo interpeduncular, núcleo parabraquial, núcleo do trato solitário (porção caudal e comissural) e corno dorsal da medula; e expressos de forma reduzida no tálamo e núcleos restantes do tronco cerebral, bem como no corno ventral da medula (Herkenham *et al.*, 1990, 1991; Mackie, 2005; Svizenska *et al.*, 2008; Breivogel e Sim-Selley, 2009; Costa *et al.*, 2011). Verifica-se que os CB<sub>1</sub> estão presentes em áreas associadas ao

controle motor, resposta emocional, aprendizagem e memória, comportamentos orientados por objetivos, homeostase energética e funções cognitivas superiores, entre outras (Breivogel e Sim-Selley, 2009; Kano *et al.*, 2009).

Além do receptor CB<sub>1</sub>, um segundo subtipo foi descoberto (CB<sub>2</sub>) e existem evidências de um terceiro receptor canabinoide (Howlett *et al.*, 2002). Os receptores CB<sub>2</sub> estão ligados principalmente a funções do sistema imunológico, sendo expressos em diversos tecidos linfoides onde regulam a liberação de citocinas e a migração de células imunológicas (Pertwee, 2005). Estudos demonstram a presença desses receptores no fígado, timo, tonsilas palatinas, medula óssea e pâncreas, assim como em macrófagos, monócitos e em uma ampla variedade de células imunológicas (Lynn e Herkenham, 1994; Buckley *et al.*, 1998). Além disso, estes receptores também são expressos no sistema nervoso central, embora em menor abundância (ver revisão Svizenska *et al.*, 2008).

Os receptores vanilóides (*transient receptor potential vanilloid type-1 - TRPV1*), filogeneticamente relacionados com receptores canabinóides, constituem os receptores putativos CB<sub>3</sub> (Breivogel e Sim-Selley, 2009; Wang e Ueda, 2009). Ainda, acredita-se que os receptores acoplados à proteína G 55 (*G Protein-coupled Receptor 55 - GPR55*) e os receptores nucleares ativados por proliferadores de peroxissoma (*Peroxisome Proliferator Activated Receptors - PPAR*) do tipo  $\alpha$  e  $\gamma$  constituem novos receptores canabinóides (Ryberg *et al.*, 2007; Kano *et al.*, 2009; De Petrocellis e Di Marzo, 2009, 2010).

A demonstração da existência de um receptor específico para a ligação do  $\Delta^9$ -THC, no início da década de 90, desencadeou uma busca pelo ligante

endógeno do receptor CB<sub>1</sub>. Em 1992, isolou-se o primeiro endocanabinoide conhecido, a araquidonoil etanolamida, batizada pelo descobridor como “anandamida” (Devane *et al.*, 1992). A anandamida é formada a partir do ácido araquidônico e atua como um agonista parcial dos receptores CB<sub>1</sub> (ver revisão, Mechoulam *et al.*, 1998). Esta molécula é inativada por meio de dois processos cooperativos, a recaptação e a metabolização. A recaptação ocorre por meio de um processo mediado por carreadores proteicos (Di Marzo *et al.*, 1994; Beltramo *et al.*, 1997a; Hillard e Campbell, 1997; Fu *et al.*, 2012). Depois de recaptada, a anandamida é metabolizada por uma hidrolase de amidas de ácidos graxos (*Fatty Acid Amide Hydrolase - FAAH*) (Di Marzo *et al.*, 1994; Cravatt *et al.*, 1996). Foram desenvolvidos compostos que inibem a FAAH, o que leva a um aumento das concentrações sinápticas de anandamida (Beltramo *et al.*, 1997b).

Em 1995, outro endocanabinoide foi identificado, o 2-araquidonoil-glicerol (2-AG), o qual possui afinidade pelos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (Mechoulam *et al.*, 1995). A partir de então, outros derivados do ácido araquidônico foram identificados como endocanabinoides.

As evidências indicam que os endocanabinoides diferem dos neurotransmissores clássicos em alguns aspectos. Essas substâncias parecem ser sintetizadas “sob demanda” a partir de fosfolípidos de membrana, sendo rapidamente liberadas em decorrência de atividade elétrica induzida por despolarização e consequente influxo de íons cálcio (Di Marzo, 1999). Além disso, os endocanabinoides normalmente originam-se em neurônios pós-sinápticos e agem em receptores canabinoides localizados em terminações

pré-sinápticas, exercendo assim uma transmissão do tipo retrógrada (Di Marzo *et al.*, 1998; Mechoulam *et al.*, 1998; Hoffman e Lupica, 2000).

Em resumo, a localização dos receptores CB<sub>1</sub> e os efeitos celulares decorrentes da sua ativação, juntamente com o modo de transmissão retrógrada dos endocanabinoides, conferem ao sistema endocanabinoide a propriedade de modular a liberação de variados neurotransmissores. Por este motivo, o sistema endocanabinoide é considerado como um sistema neuromodulatório que participa de diversos processos biológicos (Di Marzo *et al.*, 1998; Alger, 2002; Pertwee, 2006; Breivogel e Sim-Selley, 2009; Kano *et al.*, 2009).

#### **1.4. Canabinoides como antidepressivos**

Recentemente, as evidências pré-clínicas têm demonstrado o envolvimento do sistema endocanabinoide na neurobiologia da depressão e o potencial antidepressivo de fitocanabinoides, canabinoides sintéticos e drogas que alteram a concentração de endocanabinoides (Hill e Gorzalka, 2005; Witkin *et al.*, 2005; Mangieri *et al.*, 2007; Serra e Fratta, 2007; Bambico *et al.*, 2009; Gaetani *et al.*, 2009; Crippa *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2010; Zanettini *et al.*, 2011; Hill *et al.*, 2012). Esses estudos sugerem que o sistema endocanabinoide modula a atividade neuronal monoaminérgica, envolvendo principalmente os receptores CB<sub>1</sub> e 5-HT<sub>1A</sub>.

As primeiras evidências do potencial antidepressivo dos canabinoides foram obtidas com a administração de agonistas sintéticos de receptores CB<sub>1</sub> e drogas que inibem a metabolização da anandamida. Jiang *et al.* (2005)

demonstraram que o tratamento crônico com o HU210, um agonista potente dos receptores CB<sub>1</sub>, promove efeitos antidepressivos em ratos submetidos ao teste do nado forçado (TNF). Paralelamente, Gobbi *et al.* (2005) utilizaram um inibidor seletivo da enzima FAAH, o URB597, e observaram que a elevação das concentrações cerebrais de anandamida induz efeitos antidepressivos no TNF e no teste de suspensão pela cauda (TSC) em roedores. Esse efeito se mostrou dependente da ativação dos receptores CB<sub>1</sub> e foi acompanhado por um aumento no número de disparos de neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe (NDR) e neurônios noradrenérgicos no *locus ceruleus*. Esses dados foram corroborados por Bambico *et al.* (2007), que demonstraram que a ativação dos receptores CB<sub>1</sub> pelo canabinoide sintético WIN55,212-2 induz efeitos antidepressivos no TNF em ratos, por aumentar a atividade neuronal serotoninérgica no NDR e no córtex pré-frontal ventromedial.

Posteriormente, outros estudos demonstraram que a administração isolada de fitocanabinoides como o  $\Delta^9$ -THC e o CBD induz efeitos sugestivos de atividade antidepressiva em roedores. El-Alfy *et al.* (2010) demonstraram que a administração aguda intraperitoneal (i.p.) de  $\Delta^9$ -THC (2,5 mg/kg), CBD (200 mg/kg) ou CBC (20 mg/kg) produz uma redução do tempo de imobilidade no TNF e no TSC em camundongos. Ainda em 2010, Zanelati e colaboradores verificaram resultados semelhantes no TNF após a administração aguda de CBD (30 mg/kg, i.p.) em camundongos. Recentemente, Bambico *et al.* (2012) verificaram que a administração crônica (5 dias), mas não aguda, de  $\Delta^9$ -THC (1 mg/kg, i.p.) reduz o tempo de imobilidade de ratos expostos ao TNF.

Por outro lado, já foram observados efeitos sugestivos de atividade depressiva pelo  $\Delta^9$ -THC em camundongos. Egashira *et al.* (2008) observaram

que a administração aguda de  $\Delta^9$ -THC nas doses de 2 ou 6 mg/kg (i.p.) induz um aumento no tempo de imobilidade em camundongos expostos ao TNF. Mais recentemente, Realini *et al.* (2011) observaram que ratas pré-tratadas cronicamente com  $\Delta^9$ -THC em doses progressivas (2,5–10 mg/kg) durante a adolescência apresentam comportamentos que indicam sintomas depressivos na fase adulta, como imobilidade elevada no TNF, redução no consumo de sacarose (indicativo de anedonia) e prejuízo na interação social.

Em síntese, os resultados dos estudos pré-clínicos indicam que os canabinoides naturais e sintéticos apresentam efeitos antidepressivos significativos. Entretanto, a discrepância nos resultados obtidos com o  $\Delta^9$ -THC revela que os efeitos deste composto nos modelos animais preditivos de atividade antidepressiva necessitam de mais investigações. Ademais, os efeitos da interação entre  $\Delta^9$ -THC e CBD nestes permanecem desconhecidos.

Estudos clínicos sobre os efeitos dos canabinoides no tratamento da depressão são escassos na literatura. Apesar disso, estudos epidemiológicos indicam que o uso medicinal da *Cannabis* parece ser benéfico para pacientes depressivos (Gruber *et al.*, 1996; Grinspoon e Bakalar, 1998; Schnelle *et al.*, 1999; Johns, 2001). Schnelle *et al.* (1999) realizaram um levantamento na Alemanha, Áustria e Suíça, e observaram que dentre os pacientes que faziam o uso médico da *Cannabis sativa* (N=128), a indicação mais citada foi depressão (12%). Dessa parcela dos pacientes, 72% afirmaram uma melhora “muito grande” nos sintomas da doença após o uso de *Cannabis*; 71% não experimentaram efeitos adversos; 26% descreveram efeitos adversos “moderados” e 3% “fortes”. Além do mais, 84% dos pacientes não sentiram qualquer necessidade de aumento da dose durante os últimos três meses

anteriores ao estudo. A maior parte dos pacientes utilizava a planta seca ou produtos derivados da planta (ex. resina, tintura) por via inalatória e/ou oral, como auto-medicação, e alguns utilizavam medicamentos canabinoides (ex. Marinol<sup>®</sup>) sob prescrição médica (Schnelle *et al.*, 1999).

Tomados em conjunto, os dados dos estudos pré-clínicos e epidemiológicos que investigaram o potencial antidepressivo dos canabinoides sugerem que estes compostos podem representar uma nova estratégia para o tratamento da depressão. No entanto, pouco se sabe a respeito dos efeitos da interação entre os fitocannabinoides  $\Delta^9$ -THC e CBD. Assim, este estudo buscou avaliar os efeitos da interação entre o  $\Delta^9$ -THC e o CBD em modelos animais preditivos de atividade antidepressiva. Ademais, tendo em vista que o  $\Delta^9$ -THC apresentou efeitos contraditórios em trabalhos anteriores, os resultados deste estudo poderão esclarecer melhor os efeitos deste composto nesses modelos.

# | OBJETIVOS



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antidepressiva da associação entre os fitocanabinoides  $\Delta^9$ -THC e CBD em camundongos.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos da administração aguda de  $\Delta^9$ -THC sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos à caixa de atividade locomotora;
- Avaliar os efeitos da administração aguda de  $\Delta^9$ -THC e CBD, isolados e em associação, sobre o desamparo comportamental em camundongos submetidos ao TNF e ao TSC;
- Avaliar os efeitos da administração aguda de  $\Delta^9$ -THC e CBD, isolados e em associação, sobre a temperatura retal de camundongos submetidos ao teste IHA.

# MATERIAL E MÉTODOS

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados camundongos suíços machos adultos (75 a 90 dias, 30-40g) provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para a Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O estudo foi conduzido no Departamento de Psicobiologia da UNIFESP e no Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID).

Os animais foram mantidos em gaiolas padrão de polipropileno, com condições de luz (ciclo claro-escuro de 12 horas, das 7:00 às 19:00) e temperatura ( $23 \pm 2$  °C) controladas automaticamente. Água e ração foram fornecidos *ad libitum*. A limpeza das gaiolas foi feita três vezes por semana para remoção da maravalha utilizada para forração. Os animais foram aleatoriamente distribuídos entre os grupos experimentais ( $n = 8-10$  animais/grupo).

Ao final dos protocolos propostos os animais foram submetidos à eutanásia utilizando o método de injeção letal de pentobarbital sódico, com o mínimo de desconforto. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (#1811/10).

### 3.2. Drogas

O  $\Delta^9$ -THC e o CBD purificados foram gentilmente cedidos pelo *Department of Health and Human Services - National Institute on Drug Abuse* (DHHS-NIDA / Research Triangle Institute - Carolina do Norte, EUA). O cloridrato de imipramina - utilizado como antidepressivo controle - foi gentilmente cedido pela Cristália<sup>®</sup> Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda (São Paulo, Brasil). A apomorfina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup> - St Louis, EUA) foi adquirida comercialmente pelo Departamento de Psicobiologia da UNIFESP. O cloridrato de imipramina e a apomorfina foram dissolvidos em salina estéril (NaCl 0,9%); e os fitocanabinoides foram solubilizados em Tween 80 (1%) e salina. A solução veículo foi composta de Tween 80 (1%) e salina.

Em todos os experimentos as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e a administração foi feita por via i.p., em um volume correspondente a 0,1 ml / 10 g. As doses e o intervalo de administração utilizado foram escolhidos com base em dados da literatura (Carlini *et al.*, 1974; Rieli Mendes *et al.*, 2002; Poleszak *et al.*, 2005; Varvel *et al.*, 2006; El-Alfy *et al.*, 2010; Zanelati *et al.*, 2010), em conjunto com os resultados dos experimentos iniciais que determinaram a curva dose-resposta do  $\Delta^9$ -THC sobre a atividade locomotora e o tempo de imobilidade no TNF (Experimento 1).

A proporção de 1:1 e a administração simultânea das substâncias foram escolhidas a fim de simular as mesmas condições presente na formulação comercial Sativex<sup>®</sup>, que está sendo utilizada amplamente nos países em que o seu uso medicinal já está regulamentado.

### 3.3. Avaliação da atividade locomotora

A avaliação da atividade locomotora foi realizada para determinar uma curva dose-resposta do  $\Delta^9$ -THC, com o objetivo de se selecionar uma dose deste composto que não interferisse no desempenho locomotor dos animais nos testes subsequentes (TNF e TSC). Assim, buscou-se assegurar que possíveis efeitos sobre o tempo de imobilidade não fossem uma consequência secundária da ação não específica do  $\Delta^9$ -THC sobre a atividade locomotora.

Foram utilizadas caixas de atividade locomotora Opto-Varimex (Columbus Instruments, Columbus, OH, EUA, 47,5 X 25,7 X 20,5 cm) providas de 15 pares de células fotoelétricas conectadas a um contador digital. Cada unidade de locomoção horizontal é computada quando o animal interrompe 2 feixes sequenciais.

Imediatamente após a administração das drogas, os animais foram colocados individualmente nas caixas de atividade nas quais permaneceram durante 30 minutos. Foram considerados para a avaliação da atividade locomotora os 10 minutos finais do teste, devido à atividade exploratória inicial e a curva de ação da droga (El-Alfy *et al.*, 2010).

### 3.4. Teste do nado forçado

Proposto originalmente por Porsolt *et al.* (1977), o TNF é um modelo para avaliar a ação de drogas antidepressivas com base no princípio de “desamparo comportamental”, que sugere que a imobilidade apresentada pelos animais durante o teste reflete o que os autores designaram como um estado

de humor rebaixado (Porsolt *et al.*, 1977). Nesse teste, os camundongos são forçados a nadar em um recipiente com água de onde é impossível escapar. Inicialmente, há uma tentativa desesperada de sair dessa situação, quando os animais apresentam um período de intensa atividade motora seguido por momentos em que permanecem imóveis, limitando-se aos movimentos necessários para manter a cabeça fora da água (imobilidade). Drogas com atividade antidepressiva causam uma diminuição no tempo total de imobilidade e/ou um aumento no período entre o início do teste e o primeiro episódio de imobilidade (latência para imobilidade), em relação ao grupo controle.

O teste foi conduzido da forma como proposto por Porsolt *et al.* (1977), com mínimas modificações (Aley e Kulkarni, 1989; Petit-Demouliere *et al.*, 2005; Castagné *et al.*, 2009). Trinta minutos após a administração das drogas, os camundongos foram colocados para nadar em cilindros de vidro transparente (20 cm de altura, 14 cm de diâmetro, 12 cm de água a 23-25 °C) durante 6 minutos. Os testes foram filmados e, posteriormente, os seguintes parâmetros foram aferidos manualmente, com o auxílio de cronômetros digitais: (a) latência para imobilidade: tempo entre o início do teste até o primeiro episódio de imobilidade; (b) tempo de imobilidade: tempo total em que o animal permaneceu imóvel nos 4 minutos finais do teste. A análise do tempo de imobilidade foi realizada considerando-se os 4 minutos finais do teste, pois pouca ou nenhuma imobilidade é observada nos 2 minutos iniciais (Porsolt *et al.*, 1977). Os animais foram considerados imóveis quando permaneciam flutuando passivamente, limitando-se aos movimentos necessários para manter a cabeça fora da água. A água do cilindro foi trocada a cada novo animal

submetido ao teste, a fim de evitar possíveis influências de substâncias de alarme (Abel e Bilitzke, 1990).

### **3.5. Teste de suspensão pela cauda**

Proposto por Steru *et al.* (1985), o TSC, assim como o TNF, se baseia no princípio de desamparo comportamental. Camundongos suspensos pela cauda demonstram um padrão temporal de movimentação buscando a fuga, seguido de imobilidade, semelhante ao que é observado no TNF.

Trinta minutos após a administração das drogas, os camundongos foram fixados pela cauda (2-4 cm da ponta), com um pedaço de esparadrapo, em um suporte de aço 35 cm acima da bancada forrada com uma esponja protetora, no qual permaneceram durante 6 minutos. Os testes foram filmados e, posteriormente, os seguintes parâmetros foram aferidos manualmente, com o auxílio de cronômetros digitais: (a) latência para imobilidade; e (b) tempo de imobilidade. Para o tempo de imobilidade, a análise foi realizada considerando-se os 4 minutos finais do teste. Considerou-se como imobilidade quando os animais permaneceram completamente imóveis.

### **3.6. Inibição da hipotermia induzida por apomorfina**

O teste de inibição da hipotermia induzida por apomorfina (IHA) se baseia na capacidade de drogas antidepressivas antagonizarem o efeito hipotermizante da apomorfina em roedores (Puech *et al.*, 1981; Menon *et al.*, 1984; Rieli Mendes *et al.*, 2002).

Primeiramente, a temperatura retal basal dos camundongos foi aferida com o auxílio de um termômetro digital (Dixtal<sup>®</sup>) à profundidade constante de 2 cm. Imediatamente depois, os animais receberam (i.p.) as drogas que foram avaliadas ( $\Delta^9$ -THC, CBD, imipramina ou solução veículo) e, após trinta minutos, a temperatura retal foi aferida novamente. Esta medida visou avaliar o efeito *per se* das drogas estudadas sobre a temperatura retal dos camundongos. Em seguida, todos os animais receberam apomorfina (10mg/kg, i.p.) e a partir de então a temperatura retal foi aferida a cada intervalo de trinta minutos (3 medidas), com o objetivo de avaliar o efeito das drogas estudadas sobre a hipotermia induzida pela apomorfina.

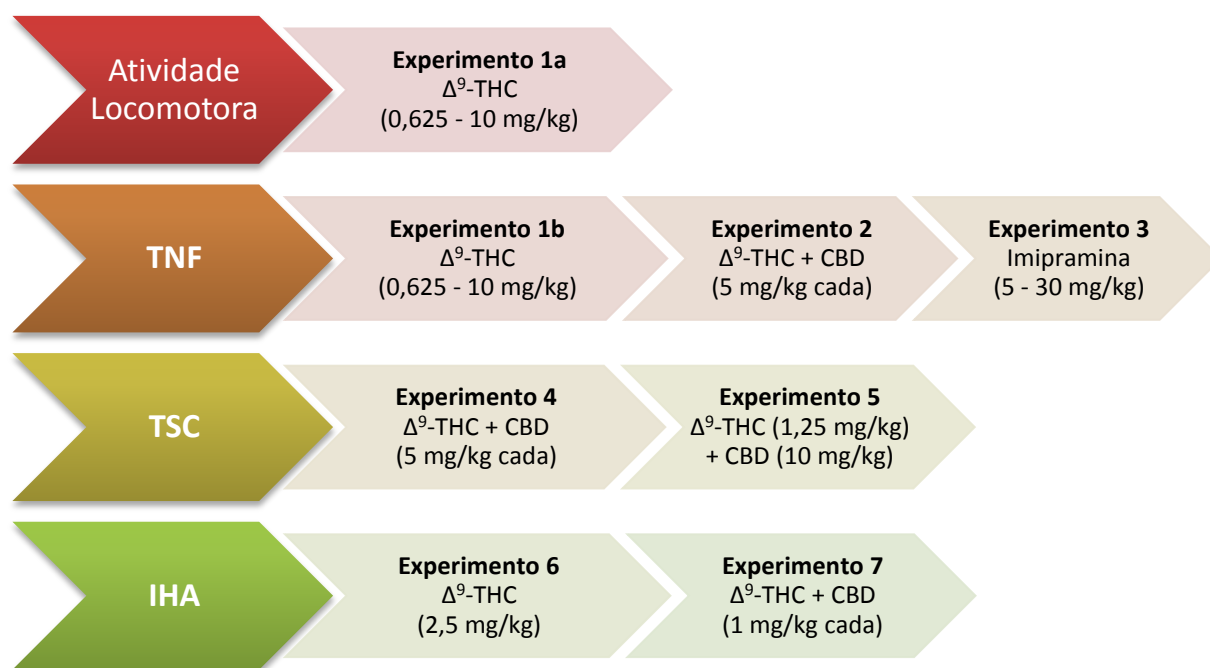
### 3.7. Grupos experimentais e delineamento experimental

▪ Grupos experimentais:

- ❖ **Controle:** recebeu solução veículo (i.p.)
- ❖ **Imipramina:** recebeu cloridrato de imipramina (i.p.)
  - Curva dose-resposta (TNF): 5, 10, 15 e 30 mg/kg
  - TNF: 15 mg/kg
  - TSC: 15 e 30 mg/kg
  - IHA: 5 mg/kg
- ❖ **THC:** recebeu  $\Delta^9$ -THC (i.p.)
  - Curva dose-resposta (atividade locomotora e TNF): 0,625, 1,25, 2,5, 5 e 10 mg/kg
  - TNF: 5 mg/kg
  - TSC: 1,25 e 5 mg/kg
  - IHA: 1 e 2,5 mg/kg
- ❖ **CBD:** recebeu CBD (i.p.)
  - TNF: 5 mg/kg
  - TSC: 5 e 10 mg/kg
  - IHA: 1 mg/kg
- ❖ **THC+CBD:** recebeu a associação entre  $\Delta^9$ -THC e CBD (i.p.)
  - TNF: 5 mg/kg cada (1:1)
  - TSC: 5 mg/kg cada (1:1) e 1,25 mg/kg  $\Delta^9$ -THC + 10 mg/kg CBD (1:8)
  - IHA: 1 mg/kg cada (1:1)



▪ Delineamento experimental:



**Figura 1.** Desenho esquemático dos experimentos realizados, subdividido pelos métodos utilizados (TNF: teste do nado forçado; TSC: teste de suspensão pela cauda; IHA: inibição da hipotermia induzida por apomorfina).

### 3.8. Análise estatística

Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EP). Todos os dados foram organizados e analisados utilizando os softwares SPSS versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) e Excel 2007 (Microsoft Office). Os testes Shapiro-Wilk e Levene foram utilizados para testar, respectivamente, a normalidade e homogeneidade dos dados. Foi utilizado o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) para medidas independentes ou repetidas, seguido do teste *post-hoc* de Tukey para determinar as diferenças entre os grupos experimentais. O teste de Mauchly foi utilizado para verificar a

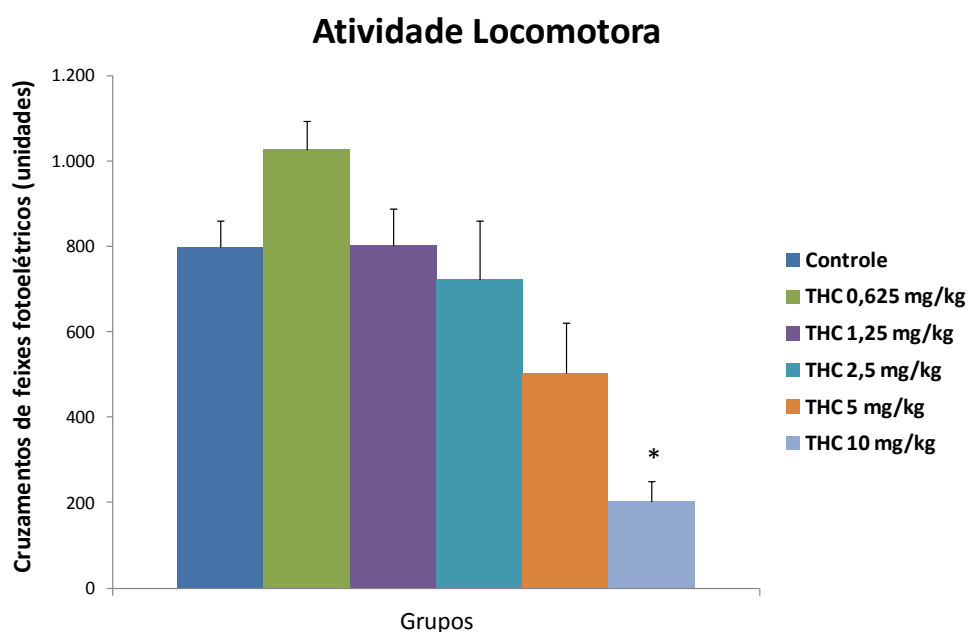
esfericidade da amostra nos experimentos com medidas repetidas. Quando este critério não foi atingido, os resultados foram apresentados com o valor de F corrigido (Greenhouse-Geiser). No experimento 6, o  $n$  amostral utilizado foi menor que o mínimo estabelecido para a confiabilidade dos resultados da ANOVA. Neste caso, os resultados da ANOVA foram corroborados pelo teste não-paramétrico de Friedman para medidas repetidas. O nível de significância mínima estabelecida foi  $p < 0,05$ .

# RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

### ✓ Experimento 1a – Atividade Locomotora: curva dose-resposta do $\Delta^9$ -THC

Inicialmente, o Experimento 1a foi realizado com o uso de cinco diferentes doses de  $\Delta^9$ -THC (0,625; 1,25; 2,5; 5; e 10 mg/kg), a fim de se determinar uma curva dose-resposta. A ANOVA mostrou efeito significativo do tratamento na atividade locomotora ( $F_{(6,63)}=14,958$ ;  $p<0,001$ ) (Figura 2). O teste *post-hoc* de Tukey revelou que houve uma diminuição da atividade locomotora no grupo que recebeu a dose de 10 mg/kg  $\Delta^9$ -THC ( $p<0,001$ ), em relação ao grupo Controle. Não houve diferença significativa com as outras doses de  $\Delta^9$ -THC em comparação ao grupo Controle.



**Figura 2.** Efeitos do  $\Delta^9$ -THC (0,625 a 10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade locomotora de camundongos expostos à caixa de atividade locomotora ( $n = 10$  animais/grupo). Dados expressos em média  $\pm$  EP. \* $p<0,001$  comparado ao grupo Controle (veículo).

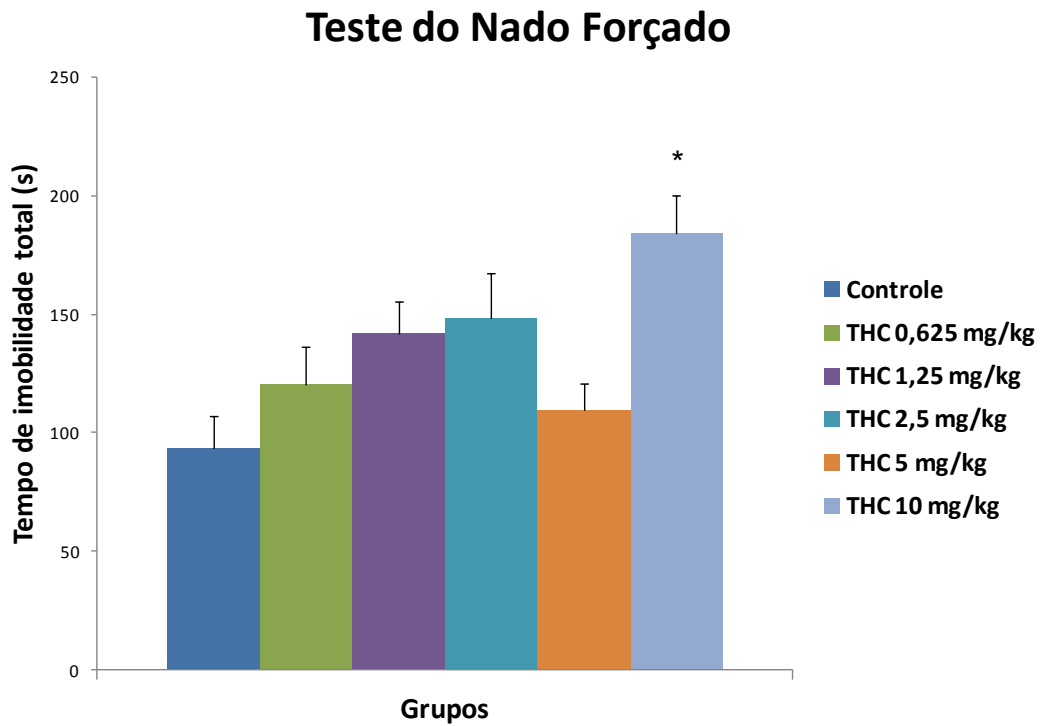
✓ **Experimento 1b – Teste do Nado Forçado: curva dose-resposta do  $\Delta^9$ -THC**

O TNF foi realizado imediatamente após a exposição dos animais à caixa de atividade locomotora, portanto, 30 minutos após a administração das drogas/veículo. Este teste visa obter uma curva dose-resposta do  $\Delta^9$ -THC no TNF, método tradicionalmente empregado para avaliar efeitos antidepressivos.

A ANOVA mostrou efeito significativo do tratamento no tempo de imobilidade ( $F_{(6,63)}=4,863$ ;  $p<0,001$ ) (Figura 3). O teste *post-hoc* de Tukey revelou que houve um aumento do tempo de imobilidade no grupo que recebeu a dose de 10 mg/kg  $\Delta^9$ -THC ( $p<0,001$ ), em relação ao grupo Controle.

A observação comportamental durante o teste mostrou que os animais que receberam a dose de 10 mg/kg de  $\Delta^9$ -THC apresentaram uma hipertonia muscular das patas anteriores e posteriores, adotando uma postura diferente da habitual em relação aos animais dos demais grupos (Imagem 1).

A partir dos resultados dos experimentos 1a e 1b, selecionou-se a dose de 5 mg/kg de  $\Delta^9$ -THC para ser aplicada em associação com o CBD nos modelos de desamparo comportamental (TNF e TSC – Experimentos 2 e 4).



**Figura 3.** Tempo de imobilidade de camundongos ( $n = 10$  animais/grupo) submetidos ao teste do nado forçado 30 minutos após a administração (i.p.) de solução veículo (Controle) ou  $\Delta^9$ -THC (0,625 a 10 mg/kg). Dados expressos em média  $\pm$  EP. \* $p < 0,01$  comparado ao grupo Controle.

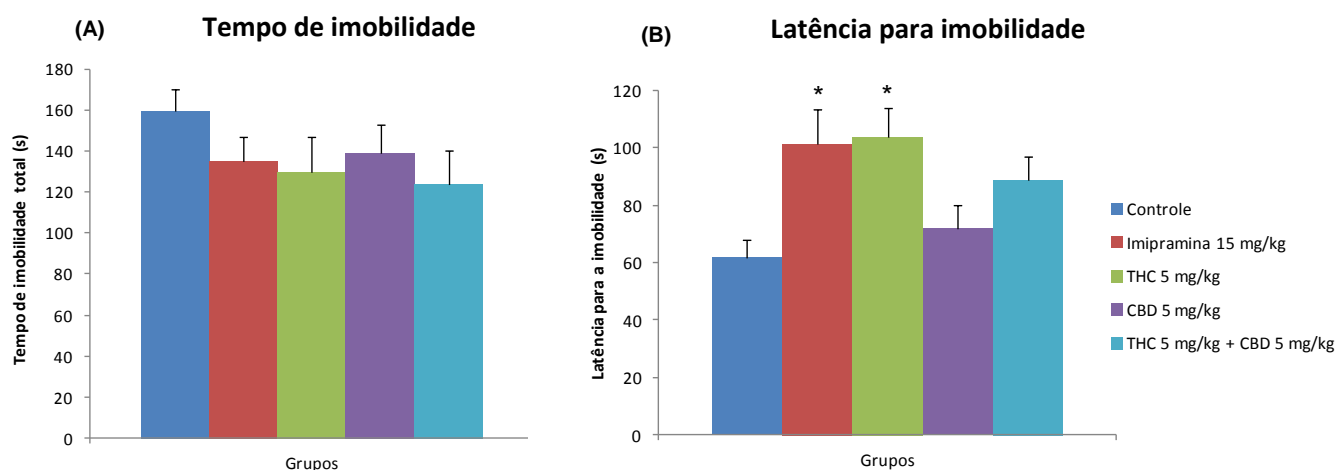


**Imagem 1.** Camundongo em postura imóvel com hipertonia muscular das pernas anteriores e posteriores após a administração aguda de  $\Delta^9$ -THC (10 mg/kg, i.p.).

✓ **Experimento 2 – Teste do Nado Forçado:  $\Delta^9$ -THC + CBD (5 mg/kg cada)**

A ANOVA mostrou efeito significativo do tratamento na latência para imobilidade ( $F_{(4,43)}=4,117$ ;  $p=0,007$ ), mas não no tempo de imobilidade ( $F_{(4,43)}=0,886$ ;  $p=0,480$ ) (Figura 4). O teste *post-hoc* de Tukey mostrou que houve um aumento da latência para imobilidade nos grupos Imipramina 15 mg/kg ( $p=0,024$ ) e  $\Delta^9$ -THC 5 mg/kg ( $p=0,019$ ), quando comparados ao grupo Controle. Apesar disso, a imipramina e o  $\Delta^9$ -THC não demonstraram efeito significativo sobre o tempo de imobilidade.

Em relação a ambos os parâmetros analisados, não houve efeito do CBD quando administrado isoladamente. No entanto, o CBD atenuou o efeito do  $\Delta^9$ -THC sobre a latência para imobilidade, uma vez que a associação entre  $\Delta^9$ -THC e CBD obteve resultados estatisticamente semelhantes ao grupo Controle ( $p=0,254$ ). Considerando a média dos grupos, esta redução no efeito do  $\Delta^9$ -THC foi de aproximadamente 15%.

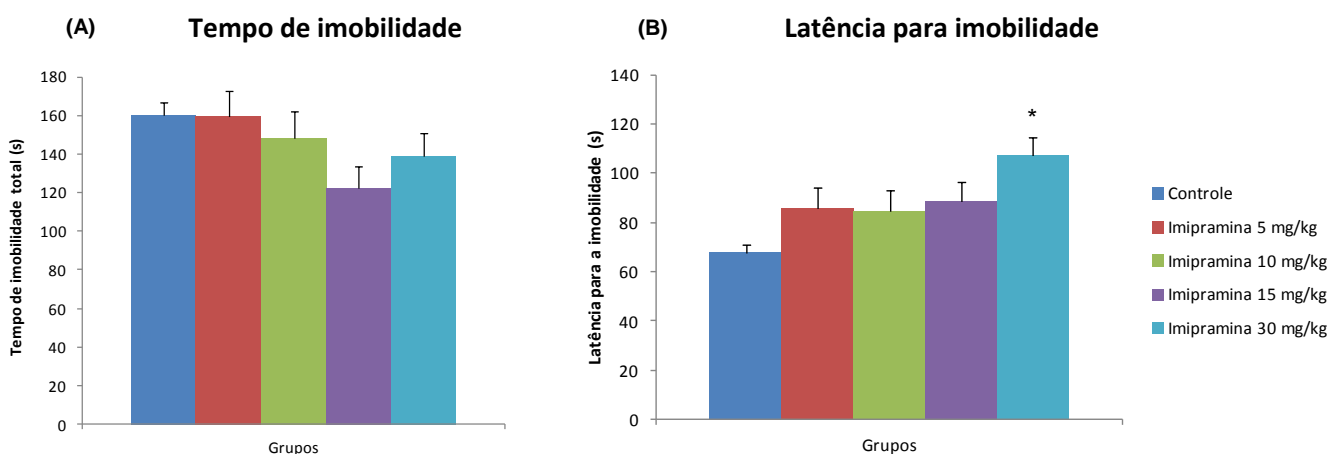


**Figura 4.** Tempo de imobilidade (A) e latência para imobilidade (B) de camundongos ( $n = 9-10$  animais/grupo) submetidos ao teste do nado forçado 30 minutos após a administração (i.p.) de solução veículo (Controle), imipramina (15 mg/kg),  $\Delta^9$ -THC (5 mg/kg), CBD (5 mg/kg) ou a associação  $\Delta^9$ -THC+CBD (5 mg/kg cada). Dados expressos em média  $\pm$  EP. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo Controle.

✓ **Experimento 3 – Teste do Nado Forçado: curva dose-resposta da imipramina**

Devido à ausência de efeito da imipramina sobre o tempo de imobilidade no TNF, embora tenha produzido efeitos sobre a latência, foi realizado um novo experimento utilizando quatro doses distintas de imipramina (5, 10, 15 e 30 mg/kg) a fim de se determinar uma curva dose-resposta, medindo-se o tempo de imobilidade e a latência para imobilidade.

Em relação à latência, a ANOVA mostrou efeito significativo do tratamento ( $F_{(4,41)}=3,417$ ;  $p=0,017$ ), conforme demonstrado na Figura 5. O teste *post-hoc* de Tukey mostrou que houve um aumento da latência no grupo Imipramina 30 mg/kg ( $p=0,003$ ), em comparação com ao grupo Controle. Entretanto, em relação ao tempo de imobilidade não houve efeito significativo do tratamento ( $F_{(4,44)}=1,147$ ;  $p=0,347$ ).



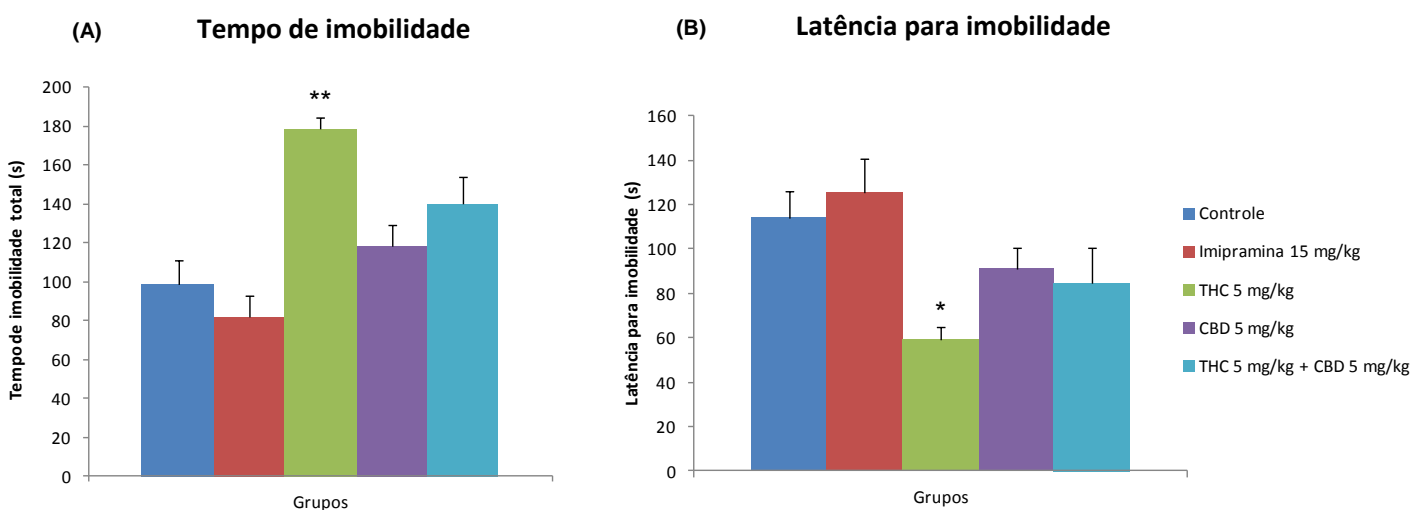
**Figura 5.** Tempo de imobilidade (A) e latência para imobilidade (B) de camundongos ( $n = 8-10$  animais/grupo) submetidos ao teste do nado forçado 30 minutos após a administração (i.p.) de solução veículo (Controle) ou imipramina (5 a 30 mg/kg). Dados expressos em média  $\pm$  EP. \* $p < 0,01$  comparado ao grupo Controle.



✓ **Experimento 4 – Teste de Suspensão pela Cauda:  $\Delta^9$ -THC + CBD (5 mg/kg)**

A ANOVA mostrou que houve efeito significativo do tratamento no tempo de imobilidade ( $F_{(4,45)}=11,552$ ;  $p<0,001$ ) e na latência para imobilidade ( $F_{(4,45)}=4,523$ ;  $p=0,004$ ) (Figura 6). O teste *post-hoc* de Tukey mostrou que houve um aumento do tempo de imobilidade ( $p<0,001$ ), acompanhado de uma redução da latência ( $p=0,023$ ) no grupo THC 5 mg/kg, em comparação ao grupo Controle.

Não houve efeito do CBD quando administrado isoladamente, em ambos os parâmetros analisados. No entanto, o CBD bloqueou parcialmente os efeitos do  $\Delta^9$ -THC, uma vez que a associação entre eles obteve resultados estatisticamente semelhantes ao grupo Controle, tanto para o tempo de imobilidade ( $p=0,081$ ) quanto para a latência ( $p=0,461$ ). Considerando a média dos grupos, a redução observada nos efeitos do  $\Delta^9$ -THC foi de aproximadamente 21,5% para o tempo de imobilidade e 43,5% para a latência. Diferente do esperado, a imipramina não demonstrou efeito significativo sobre o tempo ou a latência de imobilidade.



**Figura 6.** Tempo de imobilidade (A) e latência para imobilidade (B) de camundongos ( $n = 9-10$  animais/grupo) submetidos ao teste de suspensão pela cauda 30 minutos após a administração (i.p.) de solução veículo (Controle), imipramina (15 mg/kg),  $\Delta^9$ -THC (5 mg/kg), CBD (5 mg/kg) ou a associação  $\Delta^9$ -THC+CBD (5 mg/kg cada). Dados expressos em média  $\pm$  EP. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$  comparado ao grupo Controle.

✓ **Experimento 5 – Teste de Suspensão pela Cauda:  $\Delta^9$ -THC 1,25 mg/kg + CBD 10 mg/kg**

Diante dos resultados obtidos no experimento anterior, este teste foi realizado utilizando grupos semelhantes, porém com uma dose de  $\Delta^9$ -THC quatro vezes menor (1,25 mg/kg), uma vez que a dose de 5 mg/kg induziu um efeito sugestivo de atividade depressiva. Além disso, a proporção entre  $\Delta^9$ -THC e CBD também foi alterada. Ao invés de 1:1, como nos experimentos anteriores, foi utilizada a proporção de 1:8. Esta modificação teve por objetivo avaliar a interação entre os canabinoides estudados em uma proporção diferente, uma vez que a razão da dose entre estes compostos pode influenciar diretamente os resultados (Zuardi *et al.*, 2012). Também foi alterada a dose de imipramina administrada, que passou de 15 para 30 mg/kg, visto que a primeira dose não demonstrou o efeito antidepressivo esperado.

A ANOVA mostrou que não houve efeito significativo do tratamento no tempo de imobilidade ( $F_{(4,45)}=1,092$ ;  $p>0,05$ ) e na latência para imobilidade ( $F_{(4,45)}=0,414$ ;  $p>0,05$ ), conforme demonstrado na Tabela 1. Desta forma, a administração de  $\Delta^9$ -THC (1,25 mg/kg) e/ou CBD (10 mg/kg) não gerou diferença em relação ao grupo Controle para os parâmetros analisados. Da mesma forma, a imipramina induziu uma resposta semelhante àquela observada no grupo Controle, ou seja, não apresentou efeito antidepressivo.

**Tabela 1.** Efeitos da associação  $\Delta^9$ -THC+CBD (proporção de 1:8) no teste de suspensão pela cauda.

Grupo	Tempo de imobilidade (s)	Latência para imobilidade (s)
Controle	92,7 ± 14,6	64,1 ± 6,3
Imipramina 30 mg/kg	112,0 ± 19,6	72,6 ± 6,6
$\Delta^9$ -THC 1,25 mg/kg	119,7 ± 8,6	75,8 ± 8,5
CBD 10 mg/kg	103,6 ± 12,2	75,3 ± 10,6
$\Delta^9$ -THC 1,25 mg/kg + CBD 10 mg/kg	131,2 ± 15,7	67,4 ± 7,9

**Tabela 1.** Tempo de imobilidade e latência para imobilidade de camundongos ( $n = 10$  animais/grupo) submetidos ao teste de suspensão pela cauda 30 minutos após a administração (i.p.) de solução veículo (Controle), imipramina (30 mg/kg),  $\Delta^9$ -THC (1,25 mg/kg), CBD (10 mg/kg) ou a associação de  $\Delta^9$ -THC (1,25 mg/kg) + CBD (10 mg/kg). Dados expressos em média ± EP.

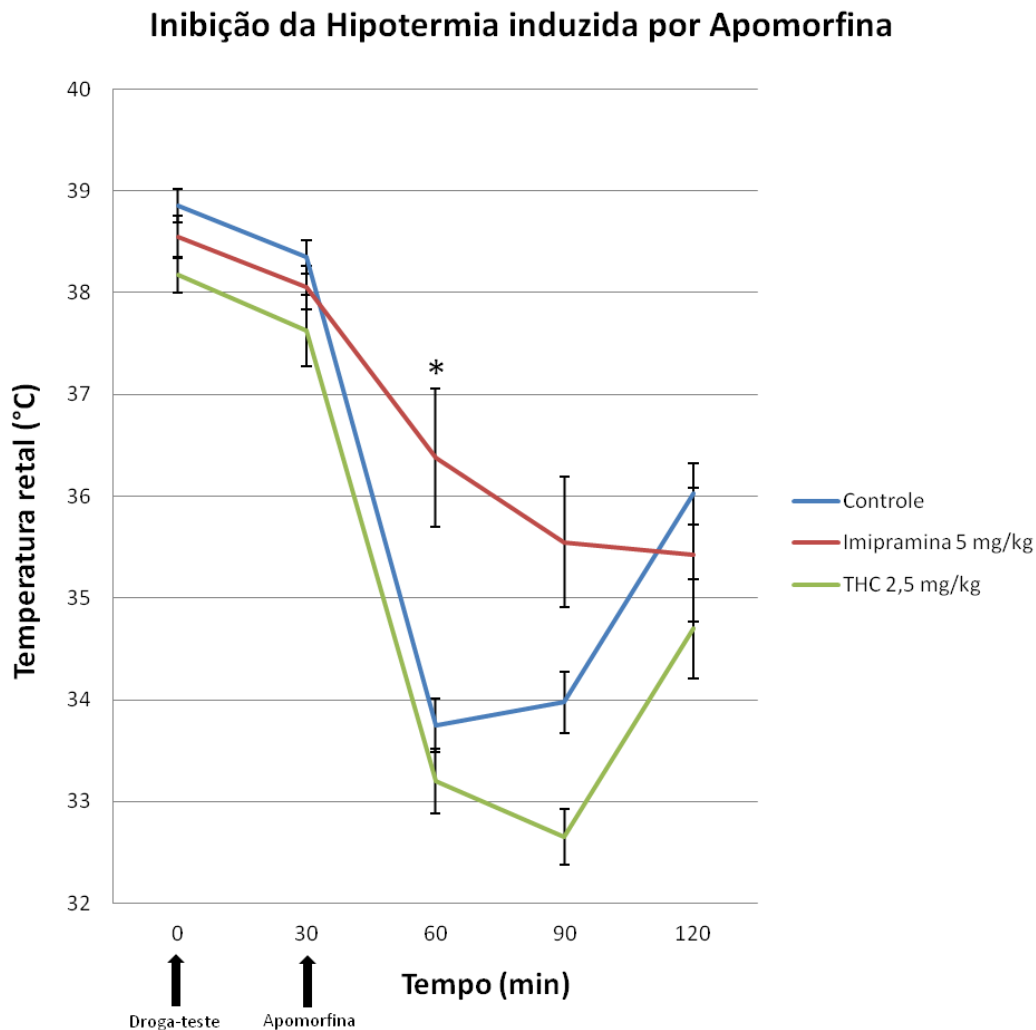
✓ **Experimento 6 – Inibição da Hipotermia induzida por Apomorfina:  $\Delta^9$ -THC (2,5 mg/kg)**

O teste IHA se baseia na capacidade de drogas antidepressivas de bloquear o efeito hipotermizante da apomorfina. Sabidamente, o próprio  $\Delta^9$ -THC pode induzir hipotermia em determinadas doses. Apesar disso, as doses utilizadas no presente estudo (1 e 2,5 mg/kg) não provocam esse efeito (Lomax e Campbell, 1971; Varvel *et al.*, 2005, 2006; Hayakawa *et al.*, 2008; El-Alfy *et al.*, 2010).

Para a comparação da temperatura retal em função dos grupos e do tempo, foi realizada uma ANOVA para medidas repetidas. Uma vez que o  $n$  amostral deste experimento é pequeno ( $n = 4$  animais/grupo), o teste não-paramétrico de Friedman foi utilizado para corroborar os resultados da ANOVA.

A ANOVA para medidas repetidas mostrou efeito significativo do tempo ( $F_{(4)}=77,96$ ;  $p<0,001$ ), do grupo ( $F_{(2,12)}=28,44$ ;  $p<0,001$ ) e da interação entre tempo e grupo ( $F_{(8,3)}=4,205$ ;  $p=0,001$ ) (Figura 7). O efeito do tempo foi corroborado pelo teste não-paramétrico de Friedman ( $p<0,001$ ). O teste *post-hoc* de Tukey mostrou que

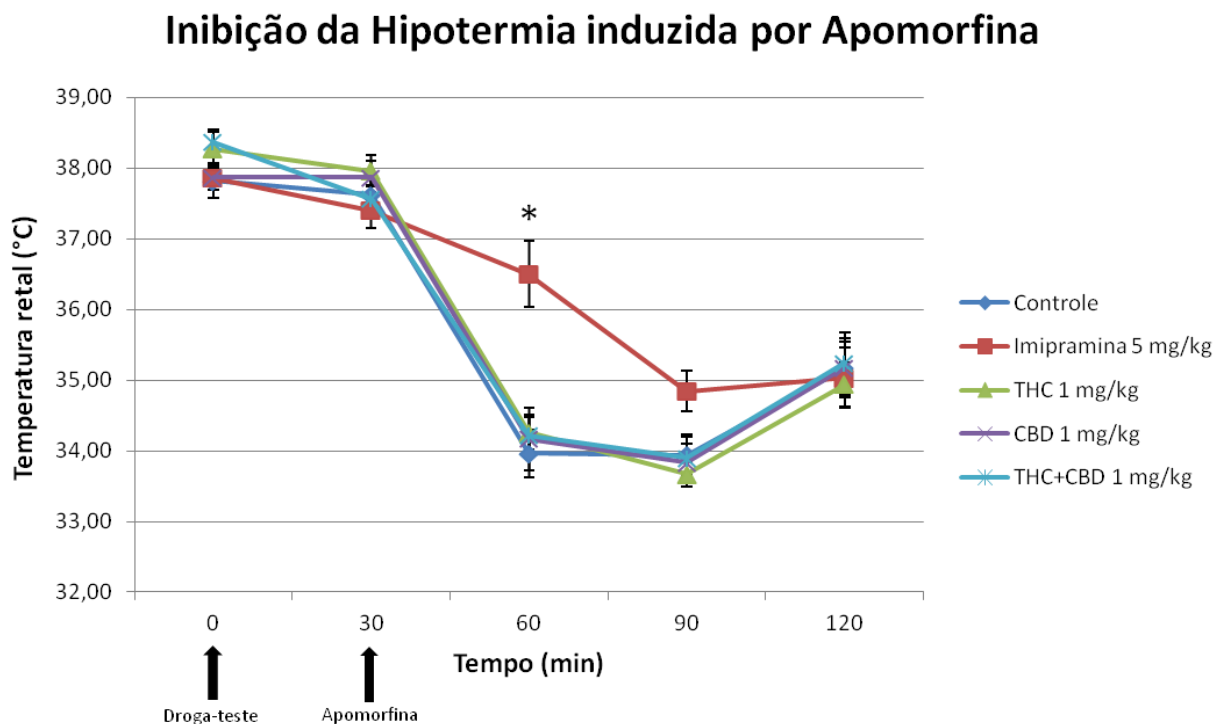
houve uma inibição da hipotermia para o grupo que recebeu imipramina (5 mg/kg) aos 60 minutos ( $p=0,007$ ), em relação ao grupo Controle. Não houve diferença entre os grupos Controle e THC 2,5 mg/kg ( $p=0,686$ ). Desta forma, o  $\Delta^9$ -THC não inibiu a hipotermia induzida pela apomorfina na dose testada.



**Figura 7.** Temperatura retal de camundongos ( $n = 4$  animais/grupo) submetidos ao teste de inibição da hipotermia induzida por apomorfina. Inicialmente, a temperatura retal basal foi aferida (tempo 0'); imediatamente depois, os animais receberam (i.p.) solução veículo (Controle), imipramina (5 mg/kg) ou  $\Delta^9$ -THC (2,5 mg/kg); trinta minutos após a administração, a temperatura retal foi aferida novamente (efeito das drogas-testes *per se*; tempo 30'); imediatamente depois, todos os animais receberam (i.p.) apomorfina (10mg/kg); a partir de então, a temperatura retal foi aferida a cada intervalo de trinta minutos (efeito das drogas-testes sobre a hipotermia induzida pela apomorfina; tempos 60', 90' e 120'). Dados expressos em média  $\pm$  EP. \* $p<0,001$  comparado ao grupo Controle.

### Experimento 7 – Inibição da Hipotermia induzida por Apomorfina: $\Delta^9$ -THC + CBD (1 mg/kg cada)

A ANOVA para medidas repetidas mostrou que houve efeito principal do tempo ( $F_{(4)}=315,48$ ;  $p<0,001$ ) e interação entre tempo e grupo ( $F_{(16,5)}=5,24$ ;  $p<0,001$ ) (Figura 8). O teste *post-hoc* de Tukey mostrou que houve inibição da hipotermia no grupo que recebeu imipramina (5 mg/kg) aos 60 minutos ( $p<0,001$ ), em relação ao grupo Controle. Não houve diferença significativa para os grupos que receberam  $\Delta^9$ -THC, CBD ou a associação entre ambos. Sendo assim, estes fitocanabinoides não apresentaram efeito sobre a hipotermia induzida pela apomorfina na dose testada (1 mg/kg).



**Figura 8.** Temperatura retal de camundongos ( $n = 9-10$  animais/grupo) submetidos ao teste de inibição da hipotermia induzida por apomorfina. Inicialmente, a temperatura retal basal foi aferida (tempo 0'); imediatamente depois, os animais receberam (i.p.) solução veículo (Controle), imipramina (5 mg/kg),  $\Delta^9$ -THC (1 mg/kg), CBD (1 mg/kg) ou a associação  $\Delta^9$ -THC+CBD (1 mg/kg cada); trinta minutos após a administração, a temperatura retal foi aferida novamente (efeito das drogas-testes *per se*; tempo 30'); imediatamente depois, todos os animais receberam (i.p.) apomorfina (10mg/kg); a partir de então, a temperatura retal foi aferida a cada intervalo de trinta minutos (efeito das drogas-testes sobre a hipotermia induzida pela apomorfina; tempos 60', 90' e 120').

# | DISCUSSÃO

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, buscou-se avaliar os efeitos da interação entre os fitocanabinoides  $\Delta^9$ -THC e CBD em modelos animais preditivos de atividade antidepressiva. O TNF e o TSC, ambos fundamentados no princípio de desamparo comportamental (Porsolt *et al.*, 1977; Steru *et al.*, 1985), estão entre os modelos animais mais bem estabelecidos (Cryan *et al.*, 2005; Petit-Demouliere *et al.*, 2005). A atividade locomotora também foi investigada, a fim de demonstrar que possíveis efeitos sobre o tempo de imobilidade não foram uma consequência de uma ação não específica dos compostos estudados. O teste IHA é um modelo que se baseia na capacidade de drogas antidepressivas de bloquear o efeito hipotermizante da apomorfina (Puech *et al.*, 1981; Menon *et al.*, 1984).

Diversos estudos já demonstraram efeitos antidepressivos de drogas que atuam sobre o sistema endocanabinoide (ver revisão Bambico *et al.*, 2009). Contudo, poucos estudos avaliaram efeitos de fitocanabinoides nestes modelos. Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou os efeitos da interação entre o  $\Delta^9$ -THC e o CBD em modelos preditivos de atividade antidepressiva.

### ***Efeitos do $\Delta^9$ -THC e do CBD nos modelos de desamparo comportamental***

Os resultados obtidos no TNF e no TSC revelaram que o  $\Delta^9$ -THC apresentou efeitos divergentes em cada um destes modelos. O  $\Delta^9$ -THC (5 mg/kg, i.p.) induziu um aumento da latência para imobilidade no TNF, similar ao aumento induzido pela imipramina, o que demonstra um efeito sugestivo de atividade antidepressiva. No entanto, a mesma dose deste composto produziu um aumento do tempo de imobilidade no TSC, que foi acompanhado de uma redução da latência para

imobilidade, o que demonstra um efeito sugestivo de atividade depressiva. O CBD (5 mg/kg, i.p.), embora sem efeito quando administrado isoladamente, atenuou os efeitos do  $\Delta^9$ -THC sobre a imobilidade em ambos os testes quando estes compostos foram administrados simultaneamente, o que revela uma interação entre estes fitocannabinóides nos modelos de desamparo comportamental.

A interferência nos efeitos do  $\Delta^9$ -THC pelo CBD observada neste estudo está em concordância com trabalhos anteriores, que demonstram que o CBD bloqueia diversos efeitos fisiológicos e comportamentais do  $\Delta^9$ -THC, em animais e humanos (Carlini *et al.*, 1970, 1972, 1974; Karniol e Carlini, 1972, 1973; Karniol *et al.*, 1974; Davis e Borgen, 1974; Fernandes *et al.*, 1974; Hollister e Gillespie, 1975; Dalton *et al.*, 1976; Brady e Balster, 1980; Zuardi *et al.*, 1981, 1982, 1984; Zuardi e Karniol, 1983; Hiltunen e Jarbe, 1986; Varvel *et al.*, 2006; Hayakawa *et al.*, 2008; Vann *et al.*, 2008; Malone *et al.*, 2009; Klein *et al.*, 2011)<sup>1</sup>.

Diferente do  $\Delta^9$ -THC, o CBD parece ter baixa afinidade pelos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (Petitet *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1998; Pertwee, 1999), o que indica que a interferência observada pode ser independente da ação do CBD sobre estes receptores. Assim, as razões para essa interferência podem envolver os múltiplos mecanismos de ação do CBD, incluindo: (1) a ação sobre receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Russo *et al.*, 2005; Zanelati *et al.*, 2010), que pode ter influenciado a resposta comportamental induzida pelo  $\Delta^9$ -THC por meio de uma modulação do sistema serotoninérgico; (2) a ação sobre receptores TRPV1 (Bisogno *et al.*, 2001), que pode ter influenciado a resposta de desamparo comportamental, uma vez que estes receptores são expressos em áreas cerebrais relacionadas com respostas emocionais (Cristino *et al.*, 2006); (3) a ação como inibidor da recaptação e

---

<sup>1</sup> Informações detalhadas sobre alguns dos estudos citados serão apresentadas no tópico seguinte “Efeitos da interação entre  $\Delta^9$ -THC e CBD” (p. 45).



metabolização da anandamida, o que aumenta a concentração sináptica deste endocanabinoide (Watanabe *et al.*, 1998; Bisogno *et al.*, 2001). Sabe-se que a anandamida, assim como o CBD, ativa receptores TRPV1 e 5-HT<sub>1A</sub> (Zygmunt *et al.*, 1999; Rubino *et al.*, 2008; Russo *et al.*, 2008), o que pode, ainda, ter levado a uma potencialização dos efeitos mediados por estes receptores. Além disso, a anandamida atua como agonista parcial de receptores CB<sub>1</sub> (ver revisão Mackie, 2007), de forma que o aumento da sua concentração sináptica poderia gerar um antagonismo competitivo com o  $\Delta^9$ -THC, podendo assim interferir nos efeitos do último.

Embora a baixa afinidade do CBD pelos receptores canabinoides indique uma ação mediada por outros receptores com os quais o CBD interage, alguns estudos sugerem que o CBD também pode atuar como antagonista ou agonista inverso de receptores CB<sub>1</sub> (Petitet *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2007; Pertwee, 2008). Desta forma, outra explicação para a interação observada pode envolver (4) um bloqueio ou uma ação inversa do CBD sobre os receptores CB<sub>1</sub>. Finalmente, pode ter havido uma sinergia entre os elementos de cada uma das hipóteses apresentadas, as quais não são mutuamente exclusivas.

A divergência observada nos efeitos do  $\Delta^9$ -THC pode ser atribuída à interação entre dois fatores principais: as diferenças intrínsecas entre o TNF e o TSC, e o mecanismo de ação complexo do  $\Delta^9$ -THC. As evidências demonstram que existem diferenças bioquímicas e neuroquímicas nos substratos biológicos que medeiam o desempenho dos animais em cada modelo (Renard *et al.*, 2003; Petit-Demouliere *et al.*, 2005). O TSC não apresenta a hipotermia que é induzida no TNF pela imersão do animal na água, o que altera o nível de estresse do método (Thierry *et al.*, 1986). Estudos anteriores observaram efeitos distintos de algumas drogas em cada modelo (Porsolt e Lenegre, 1992; Mombereau *et al.*, 2004).

Em relação ao mecanismo de ação do  $\Delta^9$ -THC, evidências recentes sugerem que esta droga pode atuar como agonista de receptores CB<sub>1</sub> de forma total ou parcial, dependendo da localização sináptica destes receptores (Laaris *et al.*, 2010). A ativação dos receptores CB<sub>1</sub> pode acarretar respostas excitatórias, inibitórias ou inertes em diferentes populações de neurônios serotoninérgicos, segundo estudos eletrofisiológicos (Bambico *et al.*, 2012). Desta forma, uma vez que diferentes substratos neurais estão envolvidos em cada teste e o  $\Delta^9$ -THC pode atuar de forma distinta em cada um deles, é possível que a interação entre estes fatores possa ter influenciado os efeitos do  $\Delta^9$ -THC em cada modelo.

Interessante notar que a divergência nos efeitos do  $\Delta^9$ -THC observada neste estudo remete à divergência nos efeitos da *Cannabis sativa* observada em relatos de usuários recreacionais, que descrevem desde elevação do humor até sintomas depressivos (Leweke e Koethe, 2008). Isso reforça a hipótese de que esta planta está ligada a efeitos complexos, que por vezes podem ser bidirecionais dependendo da interação entre diversos fatores, desde a quantidade consumida (considerando inclusive a proporção variada de fitocannabinóides em cada planta) até o contexto interior (*set*) e ambiental (*setting*) (Lupica *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2011; Mechoulam e Parker, 2013). Esse fenômeno foi magistralmente descrito pelo poeta francês Charles Baudelaire (1821-1867), no século XIX, em seu livro *Os Paraísos Artificiais*: “O cérebro e o organismo sobre os quais opera o haxixe, oferecerão apenas seus fenômenos comuns, aumentados, é verdade, mas sempre fiéis às suas origens. O homem não escapará à fatalidade de seu temperamento. (...) se você estiver em um ambiente favorável, como uma paisagem pitoresca, ou em um quarto poeticamente decorado, e se, além disso, puder contar com um pouco de música, então tudo vai melhor. (...) Que não haja nenhuma tristeza, nenhuma dor de amor. Essa

*infelicidade, essa inquietude, soará como um dobre de finados em meio à sua embriaguez e envenenarão o seu prazer.”* (Baudelaire, 1998).

Resultados contraditórios já foram obtidos em outros estudos que investigaram os efeitos do  $\Delta^9$ -THC nos modelos de desamparo comportamental. A administração crônica deste composto (1 mg/kg, i.p.) induziu redução do tempo de imobilidade em ratos expostos ao TNF (Bambico *et al.*, 2012), enquanto que a administração aguda nas doses de 2 ou 6 mg/kg (i.p.) produziu aumento do tempo de imobilidade no TNF em camundongos (Egashira *et al.*, 2008).

El-Alfy *et al.* (2010) verificaram que a administração aguda de  $\Delta^9$ -THC (2,5 mg/kg, i.p.) induziu efeitos antidepressivos em camundongos suíços no TNF e em camundongos DBA/2 no TSC. Em relação ao TNF, este achado está de acordo com os resultados obtidos neste estudo, embora o efeito antidepressivo tenha sido detectado em doses diferentes. Esta diferença pode ser atribuída aos fatores de sensibilidade e variabilidade entre os estudos, tais como diâmetro do cilindro, profundidade da água, idade e peso dos animais (Sunal *et al.*, 1994; Detke e Lucki, 1996; Bourin *et al.*, 1998; Petit-Demouliere *et al.*, 2005). Porém, no estudo de El-Alfy *et al.* (2010) a dose de 5 mg/kg de  $\Delta^9$ -THC não apresentou efeito sobre a imobilidade no TSC, o que está em contraste com os resultados obtidos neste estudo. Esta discrepância pode ter sido reflexo da utilização de linhagens de camundongos distintas no caso do TSC. Sabe-se que existem diferenças significativas intra e interlinhagens em relação à imobilidade apresentada nos modelos de desamparo comportamental (Porsolt *et al.*, 1978; Bai *et al.*, 2001; Lucki *et al.*, 2001; David *et al.*, 2003).

Diversos estudos sugerem que os efeitos dos canabinoides sobre a imobilidade sejam decorrentes de uma modulação da atividade neuronal monoaminérgica pelo sistema endocanabinoide, envolvendo principalmente os

receptores CB<sub>1</sub> e 5-HT<sub>1A</sub> (French *et al.*, 1997; Gobbi *et al.*, 2005; Hill e Gorzalka, 2005; Jiang *et al.*, 2005; Muntoni *et al.*, 2006; Palazzo *et al.*, 2006; Bambico *et al.*, 2007, 2012; Egashira *et al.*, 2008; Zanelati *et al.*, 2010). Em relação ao  $\Delta^9$ -THC, Bambico *et al.* (2012) verificaram que os efeitos sugestivos de atividade antidepressiva apresentados por este composto no TNF foram acompanhados de um aumento da atividade neuronal serotoninérgica no NDR e uma elevação da atividade tônica de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos no hipocampo dorsal. Estes efeitos foram anulados pelo antagonista de receptores CB<sub>1</sub> rimonabanto, sugerindo um mecanismo CB<sub>1</sub>-dependente. Paralelamente, os efeitos sugestivos de atividade depressiva induzidos pelo  $\Delta^9$ -THC também se mostraram dependentes da ativação de receptores CB<sub>1</sub>, os quais, neste caso, poderiam mediar a inibição da neurotransmissão serotoninérgica via receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Egashira *et al.*, 2008).

Ao contrário do esperado, a imipramina não alterou o tempo de imobilidade em ambos os métodos de desamparo comportamental utilizados. A ausência de efeito após a administração aguda de antidepressivos clássicos já foi observada em outros estudos (Dulawa *et al.*, 2004; Bambico *et al.*, 2012), o que reflete a dificuldade em se detectar a atividade antidepressiva após a administração aguda. Evidências indicam que os efeitos de grande parte das drogas antidepressivas conhecidas estão associados a alterações neuroplásticas ao longo do tempo, que podem levar também à amplificação de efeitos agudos ou subcrônicos (Haddjeri *et al.*, 1998; Besson *et al.*, 2000; Dulawa *et al.*, 2004; Zhu, 2006; Heifets e Castillo, 2009). Somado a isso, diferentes fatores de sensibilidade e variabilidade podem ter interferido na resposta a imipramina em diferentes estudos, tais como idade e peso dos animais, diâmetro do cilindro e profundidade da água, (Sunal *et al.*, 1994; Detke e Lucki, 1996; Bourin *et al.*, 1998; David *et al.*, 2001; Cryan *et al.*, 2005; Petit-Demouliere *et al.*, 2005).

**Efeitos da interação entre  $\Delta^9$ -THC e CBD**

No presente estudo, verificou-se que o CBD foi capaz de atenuar os efeitos do  $\Delta^9$ -THC sobre a imobilidade nos modelos de desamparo comportamental. Trabalhos anteriores do CEBRID demonstram que o CBD bloqueia parcialmente efeitos fisiológicos e comportamentais do  $\Delta^9$ -THC em animais de laboratório, tais como: inibição do reflexo corneal em coelhos, indução de catatonia em camundongos e a indução de comportamento agressivo em ratos privados de sono paradoxal (Carlini *et al.*, 1970, 1972, 1974; Karniol e Carlini, 1973). Estudos de outros grupos de pesquisa estão de acordo com estes resultados (Davis e Borgen, 1974; Fernandes *et al.*, 1974; Zuardi *et al.*, 1981, 1984; Zuardi e Karniol, 1983, 1984; Hiltunen e Jarbe, 1986). Mais recentemente, demonstrou-se que o CBD bloqueia diversos efeitos do  $\Delta^9$ -THC, como na aversão condicionada ao local (Vann *et al.*, 2008), na interação social (Malone *et al.*, 2009), e nos efeitos catapléticos e antinociceptivos (El-Alfy *et al.*, 2010). Esta interferência do CBD nos efeitos do  $\Delta^9$ -THC também foi observada em diversos estudos em seres humanos (Karniol e Carlini, 1972, 1973; Carlini *et al.*, 1974; Karniol *et al.*, 1974; Hollister e Gillespie, 1975; Dalton *et al.*, 1976; Zuardi *et al.*, 1982). Karniol e colaboradores (1974) verificaram uma ação antagônica do CBD sobre efeitos do  $\Delta^9$ -THC, como a aceleração do batimento cardíaco, prejuízo em tarefas cognitivas e reações psicológicas como ansiedade e pânico. Dalton *et al.* (1976) verificaram que o CBD atenuou significativamente os efeitos subjetivos produzidos pelo  $\Delta^9$ -THC quando ambos os fitocanabinoides foram inalados simultaneamente por voluntários saudáveis. Estudos comparativos entre animais e seres humanos revelaram que a potência dos efeitos de diferentes extratos de *Cannabis sativa* não pode ser explicada somente pelo conteúdo de  $\Delta^9$ -THC, de forma que uma possível ação

sinérgica entre outros fitocannabinoides e o  $\Delta^9$ -THC possa ocorrer (Carlini *et al.*, 1974). Recentemente, estudos de ressonância magnética funcional revelaram que o CBD induz efeitos opostos aos do  $\Delta^9$ -THC em relação à ativação de áreas cerebrais em humanos, o que pode ser relacionado a um antagonismo entre estes fitocannabinoides (Fusar-Poli *et al.*, 2009; Bhattacharyya *et al.*, 2010; Winton-Brown *et al.*, 2011).

Portanto, uma série de estudos demonstra que o CBD pode bloquear a atividade farmacológica do  $\Delta^9$ -THC em animais e humanos. Entretanto, em alguns estudos o CBD potencializou os efeitos do  $\Delta^9$ -THC ou não teve efeito, revelando que o resultado da interação entre estes fitocannabinoides depende de diversos fatores, entre eles o tempo entre a administração de cada composto, a proporção entre as doses utilizadas e o parâmetro mensurado (Karniol e Carlini, 1973; Varvel *et al.*, 2006; Hayakawa *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2011; Zuardi *et al.*, 2012).

Sabe-se que o CBD pode inibir o metabolismo hepático do  $\Delta^9$ -THC por meio de uma ação sobre enzimas do complexo citocromo P450 (Fernandes *et al.*, 1973; Bornheim e Correia, 1990), levando a um aumento das concentrações sanguíneas e cerebrais do  $\Delta^9$ -THC quando o CBD é administrado previamente, mas não quando os dois fitocannabinoides são administrados simultaneamente (Jones e Pertwee, 1972; Reid e Bornheim, 2001; Klein *et al.*, 2011). Esta interação farmacocinética pode resultar em uma potencialização dos efeitos do  $\Delta^9$ -THC (Zuardi *et al.*, 1984; Klein *et al.*, 2011). Contudo, o presente estudo utilizou a administração simultânea desses dois fitocannabinoides, que parece favorecer uma interação farmacodinâmica (Zuardi *et al.*, 2012).

A proporção entre as doses de  $\Delta^9$ -THC e CBD é outro fator que pode influenciar a interação e, conseqüentemente, os efeitos comportamentais eliciados pela associação entre estes dois compostos. Segundo Zuardi e colaboradores

(2012), existe uma tendência de indução de efeitos antagônicos quando são utilizadas proporções em que a dose de CBD é, em média, 8 vezes mais alta do que a dose de  $\Delta^9$ -THC, ao passo que em proporções menores (em média, dose de CBD 1,8 maior) ocorrem efeitos de potencialização. Contudo, o presente estudo utilizou a proporção de 1:1 e foi observado um antagonismo do CBD aos efeitos comportamentais do  $\Delta^9$ -THC, enquanto que na proporção de 1:8 não foram observados efeitos de interação entre estes compostos nas doses utilizadas. Apesar desta discrepância, estudos anteriores também demonstram resultados antagônicos utilizando esta mesma proporção (Karniol e Carlini, 1973; Karniol *et al.*, 1974). Além disso, os efeitos da interação entre  $\Delta^9$ -THC e CBD também dependem do parâmetro investigado e, uma vez que não foram encontrados outros estudos que avaliassem os efeitos da interação entre estes compostos nos modelos preditivos de atividade antidepressiva, é possível que os parâmetros avaliados neste estudo não obedeçam àquela tendência.

São necessários novos estudos que investiguem os mecanismos de ação envolvidos na interação entre  $\Delta^9$ -THC e CBD, com o propósito de entender melhor os efeitos da *Cannabis* e a contribuição do sistema endocanabinoide na modulação de diversos comportamentos, além de explicar as respostas comportamentais bidirecionais eliciadas por estas substâncias.

### ***Efeitos do $\Delta^9$ -THC sobre a atividade locomotora***

Os experimentos iniciais com o  $\Delta^9$ -THC em uma faixa de doses progressiva (0,625 a 10 mg/kg) mostraram que este composto induziu uma redução dose-dependente na atividade locomotora de camundongos, acompanhada de efeitos que se assemelham à catatonia, o que está em concordância com estudos anteriores

(Carlini *et al.*, 1970, 1972, 1974; Karniol e Carlini, 1973; Varvel *et al.*, 2005; Pertwee *et al.*, 2007; Hayakawa *et al.*, 2008; El-Alfy *et al.*, 2010).

Este efeito do  $\Delta^9$ -THC, na dose de 10 mg/kg, parece ter se refletido no TNF subsequente à avaliação locomotora, interferindo no desempenho motor dos animais durante o teste, de forma a impedir o animal de tentar escapar da situação experimental. Este resultado revela uma limitação para a aplicação desta droga nos modelos de desamparo comportamental. Consequências secundárias de ações não específicas podem prejudicar a avaliação da atividade antidepressiva.

### **Efeitos do $\Delta^9$ -THC sobre a hipotermia induzida por apomorfina**

Os resultados obtidos no teste IHA mostraram que, conforme esperado, a imipramina inibiu o efeito hipotermizante da apomorfina, corroborando com resultados de estudos anteriores (Puech *et al.*, 1981; Rieli Mendes *et al.*, 2002).

Sabidamente, o  $\Delta^9$ -THC pode induzir hipotermia em determinadas doses. Apesar disso, as doses utilizadas no presente estudo (1 e 2,5 mg/kg) não provocam esse efeito (Lomax e Campbell, 1971; Varvel *et al.*, 2005, 2006; Hayakawa *et al.*, 2008; El-Alfy *et al.*, 2010). Contudo, os resultados revelaram que o  $\Delta^9$ -THC e o CBD, isolados ou em associação, não inibiram a hipotermia induzida pela apomorfina. Desta forma, não houve interação farmacológica capaz de alterar os efeitos dos dois fitocanabinoides quando administrados separadamente, nas condições experimentais utilizadas.

Sendo assim, estes resultados sugerem que os fitocanabinoides estudados não são efetivos neste método. A temperatura retal pode ser diretamente afetada de modo negativo pelo  $\Delta^9$ -THC em doses elevadas, enquanto que doses reduzidas,



apesar de não alterarem a temperatura retal basal, não foram eficazes em antagonizar o efeito hipotermizante da apomorfina.

### ***Considerações finais***

A dificuldade em se obter canabinoides extraídos da *Cannabis sativa* para pesquisa, decorrente de uma burocracia paralisante, impediu a importação de uma quantidade maior destes compostos, o que constituiu um fator limitante para este estudo. Conseqüentemente, testes envolvendo administração crônica, por exemplo, não puderam ser realizados. Diante disso, considerando o crescente interesse científico acerca dos fitocanabinoides, faz-se necessário que o acesso dos centros de pesquisa a estas substâncias seja facilitado, a fim de ampliar a investigação desses compostos e os seus possíveis efeitos terapêuticos.

### ***Conclusões***

Em resumo, os resultados deste estudo sugerem que: (1) o CBD interfere nos efeitos do  $\Delta^9$ -THC em modelos animais preditivos de atividade antidepressiva; (2) o  $\Delta^9$ -THC exibe efeitos divergentes nos modelos de desamparo comportamental, podendo apresentar, em animais, efeitos que mimetizam aqueles de substâncias com ação antidepressiva ou depressiva em humanos.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abel EL, Bilitzke PJ. A possible alarm substance in the forced swimming test. *Physiol Behav.* 1990;48:233-9.
- Akiskal HS, McKinney WT Jr. Overview of recent research in depression. Integration of ten conceptual models into a comprehensive clinical frame. *Arch Gen Psychiatry.* 1975;32:285-305.
- Aley KO, Kulkarni SK. GABA-mediated modification of despair behavior in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1989;339:306-11.
- Alger BE. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol.* 2002 Nov;68(4):247-86.
- Almeida R, Nóbrega F, Braga J, de Oliveira L, Silveira e Sá R. Modelos Animais para o Estudo de Drogas Antidepressivas. In: Carlini E, Mendes F, editores. *Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental.* São Paulo: FAP-Unifesp; 2011. p. 267-91.
- American Psychiatric Association (APA). *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 4ª ed. Texto Revisado (DSM-IV-TR).* 4ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2002.
- Bai F, Li X, Clay M, Lindstrom T, Skolnick P. Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". *Pharmacol Biochem Behav.* 2001;70:187-92.
- Bambico FR, Katz N, Debonnel G, Gobbi G. Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J Neurosci.* 2007;27:11700-11.
- Bambico FR, Gobbi G. The cannabinoid CB1 receptor and the endocannabinoid anandamide: possible antidepressant targets. *Expert Opin Ther Targets.* 2008;12:1347-66.

- Bambico FR, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Gobbi G. Endocannabinoids in the treatment of mood disorders: evidence from animal models. *Curr Pharm Des.* 2009;15:1623-46.
- Bambico FR, Hattan PR, Garant JP, Gobbi G. Effect of delta-9-tetrahydrocannabinol on behavioral despair and on pre- and postsynaptic serotonergic transmission. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012.
- Barros HM, Calil HM, Guimaraes FS, Soares JC, Andreatini R. The brain decade in debate: V-Neurobiology of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2002;26:613-7.
- Baudelaire, C. *Paraísos Artificiais - O haxixe, o ópio e o vinho.* São Paulo: L&PM Pocket; 1998.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science.* 1997a;277:1094-7.
- Beltramo M, di Tomaso E, Piomelli D. Inhibition of anandamide hydrolysis in rat brain tissue by (E)-6-(bromomethylene) tetrahydro-3-(1-naphthalenyl)-2H-pyran-2-one. *FEBS Lett.* 1997b;403:263-7.
- Besson A, Haddjeri N, Blier P, de Montigny C. Effects of the co-administration of mirtazapine and paroxetine on serotonergic neurotransmission in the rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2000;10:177-88.
- 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;35:764-74.
- 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;134:845-52.

- Bornheim LM, Correia MA. Selective inactivation of mouse liver cytochrome P-450III<sub>A</sub> by cannabidiol. *Mol Pharmacol*. 1990;38:319-26.
- Bourin M, Colombel MC, Redrobe JP, Nizard J, Hascoet M, Baker GB. Evaluation of efficacies of different classes of antidepressants in the forced swimming test in mice at different ages. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1998;22:343-51.
- Brady KT, Balster RL. The effects of delta 9-tetrahydrocannabinol alone and in combination with cannabidiol on fixed-interval performance in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*. 1980;72:21-6.
- Breivogel CS, Sim-Selley LJ. Basic neuroanatomy and neuropharmacology of cannabinoids. *Int Rev Psychiatry*. 2009;21(2):113-21.
- Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E. Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience*. 1998;82:1131-49.
- Canal N, Maffei-Faccioli A. Reversal of the reserpine-induced depletion of brain serotonin by a monoamine oxidase inhibitor. *J Neurochem*. 1959;5:99-100.
- Carlini EA. [Recent research on the psychopharmacology of "Cannabis sativa" (marihuana)]. *AMB Rev Assoc Med Bras*. 1969;15:223-8.
- Carlini EA, Santos M, Claussen U, Bieniek D, Korte F. Structure activity relationship of four tetrahydrocannabinols and the pharmacological activity of five semi-purified extracts of *Cannabis sativa*. *Psychopharmacologia*. 1970;18:82-93.
- Carlini E, Masur J, Karniol I, Leite J. *Cannabis sativa*: is it possible to consider behavioural animal data as experimental models for some effects on humans? In: Paton W, Crown J, editors. *Cannabis and its derivatives - pharmacology and experimental psychology*. London: Oxford University Press; 1972. p. 154-75.

- Carlini EA, Karniol IG, Renault PF, Schuster CR. Effects of marihuana in laboratory animals and in man. *Br J Pharmacol.* 1974;50:299-309.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature.* 1957;180(4596):1200.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, et al. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science.* 2003;301:386-9.
- Castagné V, Porsolt RD, Moser P. Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. *Eur J Pharmacol.* 2009;616:128-33.
- Castren E, Rantamaki T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol.* 2010;70:289-97.
- Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4:299-309.
- Costa JLGP, Porto Ud, Paulo UFdS, Maia LO, Paulo UFdS, Orlandi-Mattos P, et al. Neurobiology of Cannabis: from the endocannabinoid system to cannabis-related disorders. *J bras psiquiatr.* 2011;60:111-22.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.* 1996;384:83-7.
- Crippa JA, Zuardi AW, Hallak JE. [Therapeutical use of the cannabinoids in psychiatry]. *Rev Bras Psiquiatr.* 2010;32:S56-66.
- Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience.* 2006;139:1405-15.

- Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29:571-625.
- Cunha AB, Frey BN, Andreazza AC, Goi JD, Rosa AR, Goncalves CA, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett.* 2006;398:215-9.
- Dalton WS, Martz R, Lemberger L, Rodda BE, Forney RB. Influence of cannabidiol on delta-9-tetrahydrocannabinol effects. *Clin Pharmacol Ther.* 1976;19:300-9.
- David DJ, Renard CE, Jolliet P, Hascoet M, Bourin M. Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. *Psychopharmacol.* 2003;166:373-82.
- Davis WM, Borgen LA. Effects of cannabidiol and delta-9-tetrahydrocannabinol on operant behavior. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1974;9:453-62.
- 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.
- De Petrocellis L, Di Marzo V. Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010;5:103-21.
- Dell'Osso L, Del Debbio A, Veltri A, Bianchi C, Roncaglia I, Carlini M, et al. Associations between brain-derived neurotrophic factor plasma levels and severity of the illness, recurrence and symptoms in depressed patients. *Neuropsychobiology.* 2010;62:207-12.
- Deltheil T, Guiard BP, Cerdan J, David DJ, Tanaka KF, Reperant C, et al. Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing

- hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice. *Neuropharmacology*. 2008;55:1006-14.
- Detke MJ, Lucki I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res*. 1996;73:43-6.
- Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988;34:605-13.
- 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;258:1946-9.
- 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;372:686-91.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*. 1998;21:521-8.
- Di Marzo V. Biosynthesis and inactivation of endocannabinoids: relevance to their proposed role as neuromodulators. *Life Sci*. 1999;65:645-55.
- Dilsaver SC. Cholinergic mechanisms in depression. *Brain Res*. 1986;396:285-316.
- Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29:1321-30.
- 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 Behav*. 2010;95:434-42.

- Egashira N, Matsuda T, Koushi E, Higashihara F, Mishima K, Chidori S, et al. Delta(9)-tetrahydrocannabinol prolongs the immobility time in the mouse forced swim test: involvement of cannabinoid CB(1) receptor and serotonergic system. *Eur J Pharmacol.* 2008;589:117-21.
- Fernandes M, Warning N, Christ W, Hill R. Interactions of several cannabinoids with the hepatic drug metabolizing system. *Biochem Pharmacol.* 1973;22:2981-7.
- Fernandes M, Schabarek A, Coper H, Hill R. Modification of delta9-THC-actions by cannabinol and cannabidiol in the rat. *Psychopharmacologia.* 1974;38:329-38.
- Ferrari AJ, Somerville AJ, Baxter AJ, Norman R, Patten SB, Vos T, Whiteford HA. Global variation in the prevalence and incidence of major depressive disorder: a systematic review of the epidemiological literature. *Psychol Med.* 2012;1-11.
- Freis ED. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. *N Engl J Med.* 1954;251:1006-8.
- French ED, Dillon K, Wu X. Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport.* 1997;8:649-52.
- Fries G, Kunz M, Kapczinski F. Transtornos do humor. In: Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo I, editors. *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos - Uma abordagem translacional.* 3ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A.; 2011. p. 183-93.
- Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, et al. A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci.* 2012;15:64-9.
- Fusar-Poli P, Crippa JA, Bhattacharyya S, Borgwardt SJ, Allen P, Martin-Santos R, et al. Distinct effects of {delta}9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on



- neural activation during emotional processing. *Arch Gen Psychiatry*. 2009;66:95-105.
- Gaetani S, DiPasquale P, Romano A, Righetti L, Cassano T, Piomelli D, et al. The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic and antidepressant drugs. *Int Rev Neurobiol*. 2009;85:57-72.
- Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society*. 1964;86:2.
- Gobbi G, Bambico FR, Mangieri R, Bortolato M, Campolongo P, Solinas M, et al. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:18620-5.
- Graeff F, Guimarães F. Medicamentos antidepressivos e estabilizadores de humor. In: Graeff F, Guimarães F, editors. *Fundamentos de Psicofarmacologia*. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 93-122.
- Grinspoon L, Bakalar JB. The use of cannabis as a mood stabilizer in bipolar disorder: anecdotal evidence and the need for clinical research. *J Psychoactive Drugs*. 1998;30:171-7.
- Gruber AJ, Pope HG, Jr., Brown ME. Do patients use marijuana as an antidepressant? *Depression*. 1996;4:77-80.
- Gumnick JF, Nemeroff CB. Problems with currently available antidepressants. *J Clin Psychiatry*. 2000;61 Suppl 10:5-15.
- Haddjeri N, Blier P, de Montigny C. Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *J Neurosci*. 1998;18:10150-6.
- Hajos N, Katona I, Naiem SS, MacKie K, Ledent C, Mody I, et al. Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci*. 2000;12:3239-49.

- Hamani C, Machado DC, Hipolide DC, Dubiela FP, Suchecki D, Macedo CE, et al. Deep brain stimulation reverses anhedonic-like behavior in a chronic model of depression: role of serotonin and brain derived neurotrophic factor. *Biol Psychiatry*. 2012;71:30-5.
- Harro J, Oreland L. Depression as a spreading adjustment disorder of monoaminergic neurons: a case for primary implication of the locus coeruleus. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001;38:79-128.
- Hayakawa K, Mishima K, Hazekawa M, Sano K, Irie K, Orito K, et al. Cannabidiol potentiates pharmacological effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol via CB(1) receptor-dependent mechanism. *Brain Res*. 2008;1188:157-64.
- Heifets BD, Castillo PE. Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:283-306.
- Henry JP, Scherman D. Radioligands of the vesicular monoamine transporter and their use as markers of monoamine storage vesicles. *Biochem Pharmacol*. 1989;38:2395-404.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, et al. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:1932-6.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*. 1991;11:563-83.
- Hill AJ, Williams CM, Whalley BJ, Stephens GJ. Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacol Ther*. 2012;133:79-97.
- Hill MN, Gorzalka BB. Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2005;15:593-9.

- Hillard CJ, Campbell WB. Biochemistry and pharmacology of arachidonylethanolamide, a putative endogenous cannabinoid. *J Lipid Res.* 1997;38:2383-98.
- Hiltunen AJ, Jarbe TU. Cannabidiol attenuates delta 9-tetrahydrocannabinol-like discriminative stimulus effects of cannabinol. *Eur J Pharmacol.* 1986;125:301-4.
- Hoffman AF, Lupica CR. Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci.* 2000;20:2470-9.
- Hollister LE, Gillespie H. Interactions in man of delta-9-tetrahydrocannabinol. II. Cannabinol and cannabidiol. *Clin Pharmacol Ther.* 1975;18:80-3.
- Howlett AC, Fleming RM. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol.* 1984;26:532-8.
- Howlett AC. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol.* 1985;27:429-36.
- Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol.* 1986;29:307-13.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 2002;54:161-202.
- Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, et al. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest.* 2005;115:3104-16.
- Johns A. Psychiatric effects of cannabis. *Br J Psychiatry.* 2001;178:116-22.
- Jones G, Pertwee RG. A metabolic interaction in vivo between cannabidiol and 1-tetrahydrocannabinol. *Br J Pharmacol.* 1972;45:375-7.

- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev.* 2009;89:309-80.
- Karniol IG, Carlini EA. The content of (-) 9 -trans-tetrahydrocannabinol ( 9 -thc) does not explain all biological activity of some Brazilian marihuana samples. *J Pharm Pharmacol.* 1972;24:833-4.
- Karniol IG, Carlini EA. Pharmacological interaction between cannabidiol and delta 9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacologia.* 1973;33:53-70.
- Karniol IG, Shirakawa I, Kasinski N, Pfeferman A, Carlini EA. Cannabidiol interferes with the effects of delta 9 - tetrahydrocannabinol in man. *Eur J Pharmacol.* 1974;28:172-7.
- Katona I, Sperlagh B, Magloczky Z, Santha E, Kofalvi A, Czirjak S, et al. GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience.* 2000;100:797-804.
- Klein C, Karanges E, Spiro A, Wong A, Spencer J, Huynh T, et al. Cannabidiol potentiates Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) behavioural effects and alters THC pharmacokinetics during acute and chronic treatment in adolescent rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2011;218:443-57.
- Klerman GL, Cole JO. Clinical pharmacology of imipramine and related antidepressant compounds. *Pharmacol Rev.* 1965;17:101-41.
- Laaris N, Good CH, Lupica CR. Delta9-tetrahydrocannabinol is a full agonist at CB1 receptors on GABA neuron axon terminals in the hippocampus. *Neuropharmacology.* 2010;59:121-7.
- Leweke FM, Koethe D. Cannabis and psychiatric disorders: it is not only addiction. *Addict Biol.* 2008;13:264-75.
- Lomax P, Campbell C. Phenitron and marihuana induced hypothermia. *Experientia.* 1971;27:1191-2.

- Lucki I, Dalvi A, Mayorga AJ. Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001;155:315-22.
- Lupica CR, Riegel AC, Hoffman AF. Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits. *Br J Pharmacol*. 2004;143:227-34.
- Lynn AB, Herkenham M. Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;268:1612-23.
- MacQueen GM, Ramakrishnan K, Croll SD, Siuciak JA, Yu G, Young LT, et al. Performance of heterozygous brain-derived neurotrophic factor knockout mice on behavioral analogues of anxiety, nociception, and depression. *Behav Neurosci*. 2001;115:1145-53.
- Mackie K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol*. 2005:299-325.
- Mackie K. From active ingredients to the discovery of the targets: the cannabinoid receptors. *Chem Biodivers*. 2007;4:1693-706.
- Malone DT, Jongejan D, Taylor DA. Cannabidiol reverses the reduction in social interaction produced by low dose Delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009;93:91-6.
- Mangieri RA, Piomelli D. Enhancement of endocannabinoid signaling and the pharmacotherapy of depression. *Pharmacol Res*. 2007;56:360-6.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990;346:561-4.
- McKim W. Antidepressants and mood stabilizers. In: McKim W, editor. *Drugs and Behavior: An Introduction to Behavioral Pharmacology*. Upper Saddle River: Prentice-Hall; 2000. p. 282-97.

- McQueen EG, Doyle AE, Smirk FH. Mechanism of hypotensive action of reserpine, an alkaloid of *Rauwolfia serpentina*. *Nature*. 1954;174:1015.
- Mechoulam R, Shvo Y. Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron*. 1963;19:2073-8.
- Mechoulam R. Marijuana chemistry. *Science*. 1970;168:1159-66.
- Mechoulam R, Carlini EA. Toward drugs derived from cannabis. *Naturwissenschaften*. 1978;65:174-9.
- 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;50:83-90.
- Mechoulam R, Fride E, Di Marzo V. Endocannabinoids. *Eur J Pharmacol*. 1998;359:1-18.
- Mechoulam R, Hanus L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids*. 2000;108:1-13.
- Mechoulam R, Parker LA. The Endocannabinoid System and the Brain. *Annu Rev Psychol*. 2013;64:6.1-6.27.
- Menon MK, Vivonia CA, Kling AS. Pharmacological studies on the antagonism by antidepressants of the hypothermia induced by apomorphine. *Neuropharmacology*. 1984;23:121-7.
- Mirkin BL. Catechol amine depletion in the rat's denervated adrenal gland following chronic administration of reserpine. *Nature*. 1958;182:113-4.
- Mombereau C, Kaupmann K, Froestl W, Sansig G, van der Putten H, Cryan JF. Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29:1050-62.

- Moreno RA, Moreno DH, Soares MBM, Paulo US. Psicofarmacologia de antidepressivos. *Rev Bras Psiquiatr.* 1999;21:24-40.
- Muntoni AL, Pillolla G, Melis M, Perra S, Gessa GL, Pistis M. Cannabinoids modulate spontaneous neuronal activity and evoked inhibition of locus coeruleus noradrenergic neurons. *Eur J Neurosci.* 2006;23:2385-94.
- Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 1997;349:1498-504.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento. In: Organização Mundial da Saúde, editor. *Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-10)*. 10<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul Ltda.; 1993.
- Palazzo E, de Novellis V, Petrosino S, Marabese I, Vita D, Giordano C, et al. Neuropathic pain and the endocannabinoid system in the dorsal raphe: pharmacological treatment and interactions with the serotonergic system. *Eur J Neurosci.* 2006;24:2011-20.
- Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem.* 1999;6:635-64.
- Pertwee RG. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol.* 2005:1-51.
- Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1:S163-71.
- Pertwee RG, Thomas A, Stevenson LA, Ross RA, Varvel SA, Lichtman AH, et al. The psychoactive plant cannabinoid, Delta9-tetrahydrocannabinol, is antagonized by Delta8- and Delta9-tetrahydrocannabivarin in mice in vivo. *Br J Pharmacol.* 2007;150:586-94.

- Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol.* 2008;153:199-215.
- Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl).* 2005;177:245-55.
- Petit 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:PL1-6.
- Poleszak E, Wlaz P, Szewczyk B, Kedzierska E, Wyska E, Librowski T, et al. Enhancement of antidepressant-like activity by joint administration of imipramine and magnesium in the forced swim test: Behavioral and pharmacokinetic studies in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005;81:524-9.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1977;229:327-36.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol.* 1978;51:291-4.
- Porsolt R, Lenegre A. Behavioral models of depression. In: Elliott J, Heal D, Mardesen C, editors. *Experimental approaches to anxiety and depression.* London: Wiley; 1992. p. 73–85.
- Puech AJ, Chermat R, Poncelet M, Doare L, Simon P. Antagonism of hypothermia and behavioral response to apomorphine: a simple, rapid and discriminating test for screening antidepressants and neuroleptics. *Psychopharmacology (Berl).* 1981;75:84-91.
- Realini N, Vigano D, Guidali C, Zamberletti E, Rubino T, Parolaro D. Chronic URB597 treatment at adulthood reverted most depressive-like symptoms induced by adolescent exposure to THC in female rats. *Neuropharmacology.* 2011;60:235-43.



- Reid MJ, Bornheim LM. Cannabinoid-induced alterations in brain disposition of drugs of abuse. *Biochem Pharmacol*. 2001;61:1357-67.
- Renard CE, Dailly E, David DJ, Hascoet M, Bourin M. Monoamine metabolism changes following the mouse forced swimming test but not the tail suspension test. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003;17:449-55.
- Rieli Mendes F, Mattei R, de Araujo Carlini EL. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. *Fitoterapia*. 2002;73:462-71.
- Rubino T, Realini N, Castiglioni C, Guidali C, Vigano D, Marras E, et al. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2008;18:1292-301.
- Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT<sub>1a</sub> receptors. *Neurochem Res*. 2005;30:1037-43.
- Russo EB. Clinical endocannabinoid deficiency (CECD): can this concept explain therapeutic benefits of cannabis in migraine, fibromyalgia, irritable bowel syndrome and other treatment-resistant conditions? *Neuro Endocrinol Lett*. 2008;29:192-200.
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 2007;152:1092-101.
- Saito VM, Wotjak CT, Moreira FA. [Pharmacological exploitation of the endocannabinoid system: new perspectives for the treatment of depression and anxiety disorders?]. *Rev Bras Psiquiatr*. 2010;32 Suppl 1:S7-14.
- Schatzberg A, Cole J, Debattista C. Antidepressivos. In: Schatzberg A, Cole J, Debattista C, editores. *Manual de Psicofarmacologia Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p. 14-59.
- Schildkraut JJ, Kety SS. Biogenic amines and emotion. *Science*. 1967;156:21-37.

- Schloss P, Henn FA. New insights into the mechanisms of antidepressant therapy. *Pharmacol Ther.* 2004;102:47-60.
- Schnelle M, Grotenhermen F, Reif M, Gortler RW. [Results of a standardized survey on the medical use of cannabis products in the German-speaking area]. *Forsch Komplementarmed.* 1999;6 Suppl 3:28-36.
- Serra G, Fratta W. A possible role for the endocannabinoid system in the neurobiology of depression. *Clin Pract Epidemiol Ment Health.* 2007;3:25.
- Shiah IS, Yatham LN. GABA function in mood disorders: an update and critical review. *Life Sci.* 1998;63:1289-303.
- Souza FGM, Ceará UF. Tratamento da depressão. *Rev Bras Psiquiatr.* 1999;21:18-23.
- Stahl S. Depression. In: Stahl S, editor. *Essential Psychopharmacology.* Cambridge: Cambridge University Press; 1996. p. 99-130.
- Stahl SM. Symptoms and circuits, part 1: major depressive disorder. *J Clin Psychiatry.* 2003;64:1282-3.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1985;85:367-70.
- Sunal R, Gumusel B, Kayaalp SO. Effect of changes in swimming area on results of "behavioral despair test". *Pharmacol Biochem Behav.* 1994;49:891-6.
- Svizenska I, Dubovy P, Sulcova A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008;90:501-11.
- Thierry B, Steru L, Simon P, Porsolt RD. The tail suspension test: ethical considerations. *Psychopharmacology (Berl).* 1986;90:284-5.

- Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol*. 2007;150:613-23.
- Thomas BF, Gilliam AF, Burch DF, Roche MJ, Seltzman HH. Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;285:285-92.
- Vann RE, Gamage TF, Warner JA, Marshall EM, Taylor NL, Martin BR, et al. Divergent effects of cannabidiol on the discriminative stimulus and place conditioning effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Drug Alcohol Depend*. 2008;94:191-8.
- Varvel SA, Bridgen DT, Tao Q, Thomas BF, Martin BR, Lichtman AH. Delta9-tetrahydrocannabinol accounts for the antinociceptive, hypothermic, and cataleptic effects of marijuana in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;314:329-37.
- Varvel SA, Wiley JL, Yang R, Bridgen DT, Long K, Lichtman AH, et al. Interactions between THC and cannabidiol in mouse models of cannabinoid activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006;186:226-34.
- Vázquez NLA, Casalegno R, López EM, Velázquez-Moctezuma J. Animal Models in Psychiatric Research. In: Andersen ML, Tufik S, editors. *Animal Models as Tools in Ethical Biomedical Research*. São Paulo, SP, Brazil: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP; 2010. p. 383-99.
- Wang J, Ueda N. Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2009;89(3-4):112-9.
- 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;62:1223-9.
- World Health Organization (WHO). *Mental Health: New Understanding, New Hope*. In: World Health Organization, editor. *World Health Report 2001*.

- Geneva: World Health Organization; 2001. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2001/en/index.html>. Acessado em: 31/10/2012.
- World Health Organization (WHO). Depression: A Global Crisis. World Mental Health Day. World Federation for Mental Health; 2012. Disponível em: [http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/en/index.html](http://www.who.int/mental_health/management/depression/en/index.html). Acessado em: 31/10/2012.
- Winton-Brown TT, Allen P, Bhattacharyya S, Borgwardt SJ, Fusar-Poli P, Crippa JA, et al. Modulation of auditory and visual processing by delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol: an fMRI study. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36:1340-8.
- Witkin JM, Tzavara ET, Nomikos GG. A role for cannabinoid CB1 receptors in mood and anxiety disorders. *Behav Pharmacol*. 2005;16:315-31.
- Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimaraes FS, Joca SR. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. *Br J Pharmacol*. 2010;159:122-8.
- Zanettini C, Panlilio LV, Alicki M, Goldberg SR, Haller J, Yasar S. Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. *Front Behav Neurosci*. 2011;5:57.
- Zhu PJ. Endocannabinoid signaling and synaptic plasticity in the brain. *Crit Rev Neurobiol*. 2006;18:113-24.
- Zisook S, Ganadjian K, Moutier C, Prather R, Rao S. Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression (STAR\*D): lessons learned. *J Clin Psychiatry*. 2008;69:1184-5.
- Zuardi AW, Finkelfarb E, Bueno OF, Musty RE, Karniol IG. Characteristics of the stimulus produced by the mixture of cannabidiol with delta 9-tetrahydrocannabinol. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1981;249:137-46.

- Zuardi AW, Shirakawa I, Finkelfarb E, Karniol IG. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology (Berl)*. 1982;76:245-50.
- Zuardi AW, Karniol IG. Effects on variable-interval performance in rats of delta 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol, separately and in combination. *Braz J Med Biol Res*. 1983;16:141-6.
- Zuardi AW, Teixeira NA, Karniol IC. Pharmacological interaction of the effects of delta 9-trans-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on serum corticosterone levels in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1984;269:12-9.
- Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr*. 2006;28:153-7.
- Zuardi AW, Hallak JE, Crippa JA. Interaction between cannabidiol (CBD) and (9)-tetrahydrocannabinol (THC): influence of administration interval and dose ratio between the cannabinoids. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012;219:247-9.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 1999;400:452-7.