



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Curso de Ciências Biomédicas – Turma V
Trabalho de Conclusão de Curso



Efeitos antipsicóticos do canabidiol em modelo de esquizofrenia baseado em alterações no neurodesenvolvimento em ratas fêmeas

LÍDIA MACEDO DE ANDRADE

Ribeirão Preto, 2022

Efeitos antipsicóticos do canabidiol em modelo de esquizofrenia baseado em alterações no neurodesenvolvimento em ratas fêmeas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte das exigências para a conclusão da ênfase em Ciências Básicas da Saúde e a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientador: Professor Dr. Francisco Silveira Guimarães

Coorientador: Professor Dr. Felipe Villela Gomes

Ribeirão Preto, julho de 2022.

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

A inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 63ª Sessão Ordinária, realizada em 06/06/2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família. Aos meus pais, Messias e Elizabete, e meu irmão Rodrigo. Pessoas pelas quais expresso maior admiração nesse mundo e sem as quais eu nunca estaria aqui. Obrigada por cada ensinamento e momento compartilhado, por me apoiarem em minhas escolhas e me ajudarem a ser a pessoa que sou hoje.

Ao meu namorado Tomás, que me ajudou a passar pelos momentos finais da minha graduação com muita leveza e tranquilidade. Muito obrigada por estar sempre presente, nunca ter desistido de mim, bem como por cada demonstração de afeto e carinho.

A todos meus amigos e amigas da República Sparta, com os quais dividi a vida nesses últimos 3 anos. Obrigada por tanto aprendizados, momentos de alegria, sofrimentos, festas e choros compartilhados. Mais que minha casa, vocês se tornaram minha família.

Agradeço à Débora, doutoranda que me orientou, e que foi de extrema importância para minha formação como cientista. Obrigada por estar sempre disposta a me ajudar e pela paciência em responder às minhas milhares de dúvidas. Sou muito grata por você e pela amizade que criamos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Guimarães, carinhosamente apelidado de Chico. Obrigado por me acolher em seu laboratório, pela sua dedicação, disponibilidade e paciência em me orientar. Mas gostaria de agradecer principalmente pelo carinho, palavras amigas e conselhos.

Agradeço também ao Prof. Dr. Felipe, que me auxiliou em grande parte do projeto, obrigada pelos muitos ensinamentos e pela paciência. Além de todo o pessoal do laboratório, que me fizeram companhia durante meus experimentos.

RESUMO

A esquizofrenia é um distúrbio que geralmente afeta os jovens na puberdade e se demonstra por uma perturbação da cognição e da emoção, juntamente com sintomas negativos e positivos. Embora sua etiologia ainda seja desconhecida, algumas teorias têm sido apresentadas a respeito da origem da doença. A hipótese do neurodesenvolvimento sugere que anormalidades no processo de neurodesenvolvimento podem promover a ativação de circuitos neuronais patológicos durante a adolescência ou idade adulta, dando origem aos sintomas. Para estudo dessa hipótese, o modelo animal empregado se baseia na administração de uma mitotoxina, acetato de metilazoximetanol (MAM), durante a gestação da rata, com o objetivo de induzir uma interrupção do desenvolvimento. Assim, intervenções farmacológicas que sejam capazes de reverter essas alterações podem ser novas estratégias para tratamento da doença. Em vista disso, o presente estudo objetivou avaliar se o canabidiol (CBD) poderia reverter as alterações comportamentais e moleculares observadas no modelo MAM. Para tal propósito, ratas da linhagem Sprague–Dawley foram tratadas com MAM (20 mg/Kg) ou salina no dia gestacional 17, e as fêmeas de sua prole foram avaliadas quando atingiram idade adulta (dia pós-natal 62), onde foi feita a administração aguda do CBD (60 mg/Kg) 1 hora antes de cada teste. Os animais foram submetidos aos testes de labirinto em cruz elevado, caixa claro-escuro, reconhecimento de objeto, hiperlocomoção induzida por MK-801. Os experimentos comportamentais nos permitiram consolidar o aprendizado da metodologia de administração do MAM, da identificação e criação da prole e das técnicas necessárias para a realização dos testes. De maneira geral, os resultados demonstram que, com exceção de aumento de ansiedade detectada no teste de claro-escuro, os animais MAM não apresentaram prejuízo nos testes quando comparados aos animais salina como se era esperado. Além disso, o CBD na dose de 60 (mg/kg) não foi capaz de reverter algumas das alterações comportamentais. No teste claro-escuro, no entanto, apresentou efeito ansiogênico nos animais controle, porém ansiolítico no grupo MAM. Além disso, ele facilitou a memória dos animais controle no teste de reconhecimento de objetos.

Palavras chaves: esquizofrenia, neurodesenvolvimento, modelo MAM, intervenção farmacológica, canabidiol.

ABSTRACT

Schizophrenia is a disorder that usually affects young people at puberty and is demonstrated by a disturbance of cognition and emotion, along with negative and positive symptoms. Although its etiology is still unknown, some theories have been put forward regarding the origin of the disease. The neurodevelopmental hypothesis states that abnormalities in the neurodevelopmental process can promote the activation of pathological neuronal circuits during adolescence or adulthood, giving rise to symptoms. To study this hypothesis, the animal model used is based on the administration of a mitotoxin, methylazoxymethanol acetate (MAM), during the rat's pregnancy, to induce a developmental interruption. Thus, pharmacological interventions that can reverse these changes may be new strategies for treating the disease. Therefore, the present study aimed to assess whether Cannabidiol (CBD) could reverse the behavioral and molecular changes observed in the MAM model. For this purpose, Sprague–Dawley rats were treated with MAM (20 mg/kg) or saline on gestational day 17, and their offspring were evaluated when they reached adulthood (postnatal day 62) when there was an acute administration of CBD (60 mg/kg) one hour before each test. The animals were submitted to object recognition test, prepulse inhibition, elevated plus maze, light-dark transition, and MK-801 induced hyperlocomotion test. The behavioral experiments allowed us to consolidate the learning of the MAM administration methodology, of the identification and creation of the offspring, and of the techniques necessary to carry out the tests. In general, the results demonstrate that, except for anxiety measured in the light/dark test, the MAM animals did not show any impairment in the tests when compared to the saline animals as expected. In addition, CBD at a dose of 60 (mg/kg) was not able to reverse several behavioral changes. In the light/dark test, however, it caused an anxiogenic response in control animals but decreased anxiety in the MAM group. In addition, CBD facilitated memory in control animals in the novel object recognition test.

Keywords: schizophrenia, neurodevelopment, MAM model, pharmacological intervention, cannabidiol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo experimental do bloco 1. Tratamento com salina ou MAM (20 mg/kg; i.p) e testes comportamentais.

Figura 2. Protocolo experimental do teste de LCE.

Figura 3. Protocolo experimental do teste claro/escuro.

Figura 4. Protocolo experimental do teste de reconhecimento de objetos (RO).

Figura 5. Protocolo experimental do teste da hiper locomoção induzida por MK-801.

Figura 6. Efeitos do MAM e da administração aguda de CBD (60 mg/kg) no teste de claro-escuro.

Figura 7. Efeitos do MAM e da administração aguda de CBD (60 mg/kg) no teste do labirinto em cruz elevado (LCE).

Figura 8. Efeitos do MAM e da administração aguda de CBD (60 mg/kg) no teste de reconhecimento de objetos (RO).

Figura 9. Efeitos do MAM e da administração aguda de CBD (60mg/kg) na hiper locomoção induzida por MK-801.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	9
1.1 ESQUIZOFRENIA	9
1.1.1 Origem do termo, sintomas e epidemiologia	9
1.1.2 Hipótese dopaminérgica da esquizofrenia	10
1.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO	11
1.2.1 O Canabidiol	13
1.2.2 O CBD e suas propriedades antipsicóticas	13
1.1.1 Possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos antipsicóticos do CBD	14
1.3 HIPÓTESE DO NEURODESENVOLVIMENTO E MODELO MAM	15
1.2 Efeitos do CBD no modelo animal MAM de esquizofrenia	17
2. HIPÓTESE	17
3.OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4.MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 ANIMAIS	18
4.2 DROGAS	19
4.3 TRATAMENTO COM MAM	19
4.4 DESENHO EXPERIMENTAL	19
4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS	20
4.6 TESTES COMPORTAMENTAIS	20
4.6.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)	20
4.6.2 Claro/Escuro	21
4.6.3 Reconhecimento de objetos (RO)	22
4.6.2 Hiper locomoção induzida por anfetamina	23
4.6.5 Análise estatística	24
5. RESULTADOS	24
5.1 EFEITO DO MAM E DO TRATAMENTO AGUDO DE CBD NO TESTE CLARO/ESCURO	24
5.2 EFEITO DO MAM E DO TRATAMENTO AGUDO DE CBD NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)	25
5.3 EFEITO DO MAM E DO TRATAMENTO AGUDO DE CBD NO TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (RO)	26

5.4 EFEITO DO MAM E DO TRATAMENTO AGUDO DE CBD NO TESTE DE HIPER LOCOMOÇÃO INDUZIDA POR ANFETAMINA	27
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESQUIZOFRENIA

1.1.1 Origem do termo, sintomas e epidemiologia

O termo esquizofrenia é derivado do grego e tem como significado: *schizo* = divisão, cisão e *phrenos* = mente. Em 1896 o psiquiatra alemão Emil Kraepelin definiu o transtorno como demência precoce (*dementia praecox*), conceito originado da progressiva deterioração das funções cognitivas (E. Kraepelin, 1919). Posteriormente, em 1911, o psiquiatra suíço Eugen Bleuler destacou desintegração do pensamento, enfatizando que a doença não era uma demência e que nem sempre se iniciava na adolescência, renomeando o transtorno como “*esquizofrenia*”. Tanto para Kraepelin quanto para Bleuler, a característica mais importante da esquizofrenia era uma incapacidade de pensar de maneira clara, fluente e lógica. Desde então, o termo esquizofrenia passou a ser largamente empregado.

Os sintomas da esquizofrenia são divididos em 3 grupos: sintomas positivos, negativos e cognitivos. Os sintomas positivos ou psicóticos refletem um excesso ou distorção da função normal, incluindo delírios, alucinações e agitação motora (Patel et al., 2014). Os sintomas negativos se referem a uma diminuição ou ausência de comportamentos considerados normais, como isolamento social, embotamento afetivo e anedonia (Correll et al., 2020). Por fim, os sintomas cognitivos são a classificação mais recente na esquizofrenia e inclui alterações nas funções cognitivas especificamente na fala, pensamento e atenção (Patel et al., 2014).

Atualmente a esquizofrenia é considerada um transtorno psiquiátrico crônico e incapacitante que afeta cerca de 1% da população mundial (McCutcheon et al., 2020; Jauhar et al., 2022). Em geral, se manifesta no final da adolescência ou início da vida adulta, atingindo proporções similares entre homens e mulheres, apesar da idade diferir para ambos os sexos. Dados da literatura apontam que os homens desenvolvem mais precocemente a esquizofrenia, manifestando os primeiros sintomas de forma súbita ou insidiosa entre 18 e 25 anos. As mulheres costumam apresentar a doença dos 25 aos 35 anos, com 3 a 10% delas após os 40 anos (Chaves, 2000). O início do transtorno pode ser marcado por uma fase prodrômica, que é caracterizada por sintomas positivos, negativos e cognitivos atenuados (Kuharic et al., 2019). Porém, o diagnóstico ainda é relativamente tardio ocorrendo após o

primeiro episódio psicótico, quando geralmente ocorre o primeiro contato com os serviços de saúde (Kuharic et al., 2019).

Até o momento, as causas da esquizofrenia ainda são desconhecidas. Contudo, parecem envolver a interação entre fatores genéticos e socioambientais (Crush et al, 2018; Gomes et al., 2020). A esquizofrenia também é proposta como um transtorno do neurodesenvolvimento, uma vez que perturbações durante a gestação ou no período perinatal, se estendendo até a adolescência, podem contribuir para o surgimento do transtorno no início da idade adulta (Millan et al., 2016; Immonen et al., 2017).

1.1.2 Hipótese dopaminérgica da esquizofrenia

Embora a etiologia da esquizofrenia ainda seja desconhecida, algumas teorias têm sido apresentadas a respeito da origem da doença. As principais observações são originadas da ação de drogas na prática clínica ou resultado das similaridades entre os sintomas da doença e os efeitos de drogas que induzem efeitos psicotomiméticos. O desequilíbrio da neurotransmissão dopaminérgica é a hipótese mais aceita para explicar a fisiopatologia da esquizofrenia e baseia-se em evidências de que drogas que antagonizam receptores de dopamina (DA) do subtipo D2, são eficazes no tratamento de sintomas positivos (Carlsson et al., 1963). Além disso, drogas que aumentam ou facilitam a neurotransmissão dopaminérgica podem desencadear surtos psicóticos em indivíduos sadios (Angrist et al., 1984).

As quatro principais vias dopaminérgicas são: (a) A via nigroestriatal, com os corpos celulares na substância negra e os terminais dopaminérgicos no estriado dorsal; (b) A via mesolímbica, com fibras que se projetam da área tegmental ventral (ATV) para o estriado; (c) a via mesocortical que tem projeções da ATV para o córtex pré-frontal; e finalmente (d) a via tuberoinfundibular, cujas fibras nervosas se projetam do hipotálamo para a hipófise anterior (Stahl, 2013).

A hipótese dopaminérgica também propõe um aumento da transmissão de dopamina nas áreas mesolímbicas, induzindo um estado hiperdopaminérgico estriatal que estaria relacionado aos sintomas positivos da doença, enquanto os sintomas negativos e cognitivos seriam explicados por um estado hipodopaminérgico no córtex

pré-frontal, além das áreas mesolímbicas do cérebro. A desregulação da dopamina também é observada em regiões do cérebro, incluindo a amígdala, importante para o processamento emocional (Laviolette, 2007). Observa-se, portanto, um desbalanço no sistema dopaminérgico, com aumento em determinadas vias e diminuição em outras (Pogarell et al., 2012; Howes et al., 2017; Walter et al., 2009).

1.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

O principal tratamento farmacológico da esquizofrenia são os antipsicóticos. A descoberta dos antipsicóticos típicos como a Clorpromazina e o Haloperidol, introduzidos na clínica nas décadas de 1950 e 1960, representou grande marco na farmacoterapia da esquizofrenia (Miyamoto et al., 2008). Essa classe de antipsicóticos atuam como antagonista dos receptores dopaminérgicos do subtipo D2 (Seeman, et al., 1976), observado pela significativa correlação entre a potência clínica dos antipsicóticos e sua afinidade pelos receptores D2 (Cresse et al., 1976; Seeman et al., 1976). Em termos de eficácia, esses fármacos são efetivos na redução dos sintomas positivos em uma grande proporção de pacientes, embora 20 a 30% dos pacientes não mostrem melhora nos sintomas positivos quando utilizam antipsicóticos (Steeds et al., 2015; Tandon et al., 2010). Em relação aos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia, esses medicamentos têm eficácia reduzida (Chan, 2017). Além disso, o bloqueio de receptores D2 no núcleo estriado cerebral determina o surgimento de sintomas chamados efeitos extrapiramidais, que caracterizam-se principalmente por movimentos anormais não intencionais e discinesias tardias, sinais crônicos relacionados ao uso de antipsicóticos que comprometem a adesão do paciente ao tratamento (Meltzer, 2013).

A indução de efeitos extrapiramidais é uma característica tão comum dos antipsicóticos típicos que, inicialmente, acreditava-se que esse fosse um pré-requisito para a atividade terapêutica desses fármacos (Hippius, 1989). Tal ideia fez com que o uso da Clozapina fosse questionável, considerando que ela não produzia efeitos extrapiramidais. Entretanto, um estudo clínico realizado pelo grupo de Herbert Meltzer demonstrou que a Clozapina possuía um perfil “atípico”, atenuando os sintomas positivos sem promover efeitos extrapiramidais (Kane et al., 1988). Dessa forma, surgiu a classificação de “antipsicóticos atípicos”, para representar os fármacos como

a olanzapina, quetiapina, risperidona e aripiprazol, que não induzem efeitos extrapiramidais (Moreira & Guimarães, 2007). Uma das hipóteses para explicar o perfil atípico dessas drogas é a do antagonismo de receptores de serotonina 5HT. De acordo com ela, a afinidade pelos receptores D2 seria necessária para o efeito antipsicótico, enquanto uma afinidade maior pelo receptor 5HT2 conferiria a um antipsicótico o caráter de atípico. Então, além de atuar nos receptores D2, esses compostos também atuariam como um potente antagonista do receptor de serotonina 5HT2 (Meltzer et al., 1999; Nasrallah, 2008).

Na última década, os antipsicóticos típicos foram substituídos por antipsicóticos atípicos, principalmente devido ao menor risco de efeitos extrapiramidais. No entanto, também foram observados efeitos indesejáveis após tratamento prolongado, como alterações metabólicas e ganho de peso, atribuído ao bloqueio de receptores pós-sinápticos adrenérgicos, colinérgicos e histaminérgicos (Lieberman et al., 2005). Além disso, a sedação, um efeito colateral comum do tratamento com Clozapina pode estar relacionada à ligação da droga aos receptores de histamina no sistema nervoso central (Solismaa et al., 2017). Os efeitos adversos somada a baixa tolerabilidade por essas drogas resultam em uma alta taxa de abandono ao tratamento (Lieberman et al., 2005). Juntas, essas observações destacam a necessidade de desenvolver novas possibilidades farmacológicas com melhor eficácia e tolerabilidade (Hanson et al., 2010).

1.2.1 O Canabidiol

A planta *Cannabis sativa*, da qual são produzidos produtos considerados ilícitos em muitas sociedades, como a maconha e haxixe, há muito é utilizada para fins médicos ao longo da história da humanidade. O interesse científico por essa espécie aumentou devido à identificação dos principais componentes químicos, dentre estes o delta-nove-tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC) e o canabidiol (CBD). O CBD é um dos principais fitocanabinóides presentes na planta *Cannabis sativa* e diferente do seu principal constituinte, o Δ^9 -tetraidrocanabinol (delta-9-THC), é desprovido de efeitos psicotomiméticos. O CBD foi isolado no início da década de 40 (falar o grupo que isolou o CBD) (Adams et al., 1940), contudo, sua estrutura química foi elucidada apenas na década de 60 por Raphael Mechoulam e colaboradores (Mechoulam et al.,

1963). Ao longo dos anos, o grupo do pesquisador Mechoulam foi responsável pela determinação da estrutura e das características estereoquímicas dos principais canabinóides presentes na *Cannabis sativa*, incluindo o CBD, o que incentivou a pesquisa da atividade farmacológica desses compostos.

Atualmente, o CBD tem atraído interesse significativo devido aos seus diversos efeitos farmacológicos, incluindo propriedades neuroprotetoras (Hampson et al., 1998), anti-inflamatórias (Carrier et al., 2006), ansiolíticas (Crippa et al., 2004) e antipsicóticas (Zuardi et al., 1982). Em resumo, a complexidade da farmacologia do CBD se deve à capacidade do CBD de interagir com vários alvos moleculares, tornando-o um bom candidato para investigação terapêutica adicional.

1.2.2 O CBD e suas propriedades antipsicóticas: primeiros estudos

A primeira evidência de que o CBD poderia apresentar propriedades do tipo antipsicótica foi obtida pela observação de que os efeitos desencadeados pelo delta 9-THC em voluntários sadios poderiam ser inibidos pelo CBD (Karniol et al., 1973; Zuardi et al., 1982). Os efeitos induzidos pelo delta 9-THC eram semelhantes aos observados nas psicoses como a desfragmentação do pensamento, alterações da percepção e resistência à comunicação (Zuardi, 2008). Assim, uma série de estudos foram realizados para explorar o papel dos endocanabinóides na neurobiologia da esquizofrenia. Grande parte desses estudos revelou níveis aumentados de endocanabinóides no líquido cefalorraquidiano e sangue dos portadores do transtorno, e que essas concentrações estavam correlacionadas negativamente com os sintomas (Koethe et al., 2009; Schubart et al., 2011).

Como primeiro passo na investigação de possíveis propriedades antipsicóticas de CBD, a droga foi comparada ao haloperidol em ratos submetidos a modelos experimentais preditivos de atividade antipsicótica (Zuardi et al., 1991). Foi observado que ambas as drogas diminuiram o comportamento estereotipado induzido pela apomorfina de maneira dose-dependente. Além disso, os mesmos autores também demonstram que a catalepsia, modelo animal do efeito adverso motor induzido pelos antipsicóticos típicos, não foi observada nos animais tratados com CBD, mesmo em altas doses (480 mg/kg). Em resumo, estes estudos apoiam a

ideia de que o CBD apresenta um perfil semelhante ao de antipsicóticos atípicos (Zuardi et al., 1991; João et al., 2014; Moreira & Guimarães, 2005).

1.2.3 Possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos antipsicóticos do CBD

Até o momento, apesar das inúmeras evidências indicando propriedades antipsicóticas do CBD, os mecanismos de ação subjacentes ainda permanecem desconhecidos. Dentro dos mecanismos propostos, os mais prováveis parecem envolver o aumento da sinalização do endocanabinóide anandamida, e a ativação de receptores de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) (Zuardi et al., 2012).

Estudos anteriores descreveram concentrações mais altas de anandamida no líquido cefalorraquidiano em pacientes com esquizofrenia em comparação com pacientes controle saudáveis. Essas concentrações foram negativamente correlacionadas com sintomas psicóticos, sugerindo que o aumento de anandamida envolva uma resposta de feedback negativo afim de contrabalançar os sintomas psicóticos e a hiperativação dos receptores D2 (Leweke et al., 2008). Nesse sentido, é sugerido que o efeito antipsicótico do CBD dependa do aumento da disponibilidade de anandamida resultante do bloqueio de sua captação e metabolismo. O CBD é capaz de facilitar a sinalização dos endocanabinóides através da inibição da recaptação celular de anandamida e sua hidrólise enzimática pela amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH). (Thomas, 1998; Petitet, 1998). Também foi observado que CBD aumenta a neurogênese no hipocampo através da neurotransmissão mediada por receptores CB1 (Wolf et al., 2010), um efeito que pode estar relacionado com um possível efeito benéfico do CBD sobre a atenuação dos déficits cognitivos observados em pacientes com esquizofrenia.

Além dos mecanismos discutidos acima, o CBD também é capaz de produzir vários outros efeitos que podem ser responsáveis por suas propriedades antipsicóticas, incluindo a interação com o receptor TRPV1. Esses receptores são expressos em diversas áreas do cérebro relacionadas à psicose, como o córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo (Cristino et al., 2006). Seus agonistas endógenos são compostos lipídicos que foram nomeados endovanilóides (EVs), sendo o mais estudado a anandamina (Di Marzo et al., 2001). O CBD é capaz de ativar esses receptores, facilitando assim a liberação pré-sináptica de glutamato, e está envolvido

na capacidade do CBD de reverter alterações observadas no teste de inibição pelo pré-pulso induzidas pelo antagonista do receptor NMDA (Long et al., 2006).

Também existem evidências de que o CBD possa atuar sobre outros alvos, além do sistema endocanabinóide. Um dos mecanismos propostos é que o CBD atue como agonista do receptor de serotonina 5HT1A, e embora o papel da neurotransmissão mediada por esses receptores na esquizofrenia não seja clara, este é um mecanismo compartilhado por alguns antipsicóticos atípicos como, por exemplo, o aripiprazol, que atua como um agonista parcial destes receptores (Jordan et al., 2002).

1.3 HIPÓTESE DO NEURODESENVOLVIMENTO E MODELO ANIMAL MAM DE ESQUIZOFRENIA

Uma das hipóteses que têm sido apresentadas a respeito da esquizofrenia é a do neurodesenvolvimento, que sugere que a etiologia da doença pode envolver processos patológicos, causados por fatores genéticos e ambientais, que começam antes de o cérebro se aproximar de seu estado anatômico adulto na adolescência. Essas anormalidades do neurodesenvolvimento, desenvolvendo-se no útero no final do primeiro ou início do segundo trimestre, levam à ativação de circuitos neurais patológicos durante a adolescência ou na idade adulta, o que leva ao surgimento de sintomas (Powell, 2010). A evidência de uma perturbação do neurodesenvolvimento é amplamente baseada em estudos em que a história pré-mórbida de pacientes com esquizofrenia indica uma prevalência de perturbações pré-natais sutis, como fome, infecção materna ou hipóxia durante o segundo trimestre, que pode interagir com a predisposição genética para resultar no fenótipo da esquizofrenia. (Lodge et al., 2009).

Essa hipótese contribui para elaboração de modelos animais que utilizam insultos perinatais para produzir um fenótipo comportamental no adulto que corresponde a algumas das características observadas da esquizofrenia em humanos (Moore et al., 2006). Um desses modelos emprega a administração de uma mitotoxina, acetato de metilazoximetanol (MAM), um agente alquilante de DNA, durante a gestação levando à metilação anormal do DNA na prole para induzir uma interrupção do desenvolvimento. Este modelo foi investigado, demonstrando que a administração de MAM induz déficits anatômicos e comportamentais que estão intimamente associados ao tempo de gestação em que a toxina é administrada

(Balduini et al., 1991; Cattabeni et al., 1997). O padrão de interrupção do desenvolvimento é o dia 17 de gestação, um período em que a proliferação neuronal atingiu o pico na maioria das regiões corticais e está essencialmente concluída ou suspensa na maioria das regiões subcorticais (Grace et al., 1998). Neste estágio específico de desenvolvimento (GD17), a exposição ao MAM tem um efeito mais seletivo no desenvolvimento dos córtices paralímbico, frontal e temporal, regiões onde os déficits são tipicamente observados em pacientes com esquizofrenia. Assim, a administração de MAM no dia gestacional 17 induz alterações que são semelhantes às observadas em pacientes com esquizofrenia (Lodge et al., 2009).

Portanto, roedores expostos à essa toxina exibem alterações morfológicas nas regiões do cérebro implicadas na esquizofrenia (hipocampo, córtex frontal e entorrinal). Também apresentam alterações comportamentais como aumento da resposta locomotora aos psicoestimulantes de dopamina e glutamato (Lena et al. 2007; Moore et al 2006), interação social prejudicada, déficits cognitivos, incluindo memória de reconhecimento espacial prejudicada e aprendizagem reversa (Le Pen et al. 2006). Essas diferenças comportamentais produzidas pelo modelo MAM estão associadas a alterações nos sistemas dopaminérgicos mesolímbicos e mesocorticais (Lodge e Grace 2007) e diminuição do número de interneurônios PV no córtex Pré-Frontal, dorsolateral e no hipocampo.

1.3.1 Efeitos do CBD no modelo animal MAM de esquizofrenia

A implementação de estratégias preventivas representaria uma grande melhoria no tratamento da esquizofrenia. Nesse cenário, o CBD surge como uma intervenção promissora, além de apresentar um perfil antipsicótico, não induz os efeitos colaterais motores comumente associados ao uso de antipsicóticos (Zuardi et al., 1991; Leweke et al., 2012; Dos-Santos-Pereira et al., 2016).

Em um trabalho recente, foi demonstrado que tanto o fenótipo semelhante à esquizofrenia do modelo MAM, quanto a regulação da transcrição alterada dos receptores CB1 foram revertidos pelo tratamento peripubertal com o CBD (Stark et al. 2018). Esses resultados sugerem que o tratamento precoce com o CBD pode prevenir o aparecimento de déficits semelhantes à esquizofrenia, bem como alterações de CB1 no córtex pré-frontal na idade adulta, apoiando que o tratamento peripubertal com canabidiol pode ser protetor contra o insulto MAM (Stark et al., 2018). O CBD regula

o sistema dopaminérgico na via mesolímbica, que pode, pelo menos em parte, estar subjacente aos seus efeitos comportamentais (Renard et al., 2017). Entretanto, a relação entre as alterações no sistema dopaminérgico e os efeitos antipsicóticos do CBD ainda não está clara.

De maneira geral, poucos estudos exploraram os efeitos do CBD no modelo animal MAM de esquizofrenia. Além disso, grande maioria dos estudos existentes são realizados em ratos machos. O presente projeto, portanto, pretende investigar se o CBD poderia reverter as alterações comportamentais observados no modelo MAM em ratas fêmeas.

2. HIPÓTESE

O canabidiol administrado de forma aguda na fase adulta irá reverter a emergência de alterações comportamentais associadas à esquizofrenia em ratas fêmeas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o CBD poderia reverter as alterações comportamentais observadas em ratas fêmeas submetidas ao modelo MAM de esquizofrenia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar se o MAM induz alterações relacionadas a ansiedade nos testes do LCE e claro/escuro e se a administração aguda de CBD na idade adulta é capaz de atenuar essas alterações.
2. Avaliar se o MAM induz alterações relacionadas à memória no teste do reconhecimento de objeto novo e se a administração aguda de CBD na idade adulta é capaz de atenuar essas alterações.
3. Avaliar se o MAM induz alterações relacionadas a alterações na atividade locomotora após bloqueio de receptores NDMD de glutamato pelo MK-801 se a administração aguda de CBD na idade adulta é capaz de atenuar essas alterações.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas da linhagem Sprague–Dawley, obtidas no Biotério Central do campus da USP Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em caixas individualmente, sob um ciclo claro/escuro de 12 horas (com as luzes acesas às 7:00 da manhã), em temperatura ambiente controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), com água e ração oferecidas ad libitum. As ratas foram acasaladas, ao final da tarde, com machos da mesma linhagem, também obtidos no Biotério Central do campus e a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal foi a indicativa do primeiro dia após inseminação. Assim, no (GD17), foi administrado via intraperitoneal MAM (20 mg/kg) ou salina (1ml/kg). O desmame da prole foi realizado no dia pós-natal 21, e apenas as fêmeas foram utilizadas nos experimentos. Os procedimentos foram iniciados após a aprovação do comitê de ética local CEUA-FMRP (número de aprovação: 081/2020).

4.2 DROGAS

Canabidiol (60 mg/kg, BSPG, > 99.9% de pureza, Reino Unido) foi dissolvido em 5% de Tween 80. O MK-801 (0,15 mg/kg, Sigma, EUA) foi dissolvido em salina. O MAM (20 mg/kg, Midwest Research, EUA) foi dissolvido em salina. As doses e o tempo de espera foram baseados em trabalhos anteriores (Guimarães et al., 2004; Lodge et al., 2009, Le Pen et al., 2011; Deiana et al., 2011).

4.3 TRATAMENTO COM MAM

O tratamento com MAM (acetato de metilazoximetanol) foi realizado conforme descrito anteriormente (Moore et al., 2006). Em resumo, ratos machos e fêmeas Sprague Dawley foram obtidos com 7 semanas de idade para realização do acasalamento. Após uma semana de habituação no biotério local, uma fêmea e um macho foram alojados conjuntamente. Foi realizado diariamente no período da manhã o lavado vaginal para a detecção do primeiro dia de gravidez. O primeiro dia de gravidez foi marcado pela presença de espermatozoides no lavado vaginal e a

fêmea prenha foi separada do macho e alojada individualmente. MAM (20 mg/kg, i.p.) foi administrado no 17º dia de gestação. A injeção foi administrada no peritônio da rata acima da linha média para evitar atingir as bolsas gestacionais. As ratas controles receberam injeção de salina (1 mL/kg, i.p.). Todos os filhotes foram desmamados no dia 21 e alojados de acordo com o sexo e em pares com os irmãos da mesma ninhada. Apenas fêmeas foram usadas nos testes comportamentais.

4.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Todos os filhotes foram provenientes de ratas prenhas tratadas com salina ou MAM (20 mg/kg; i.p.). Quando os animais atingiram a idade adulta com 62 dias de idade, eles foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: labirinto em cruz elevado (LCE), claro/escuro, reconhecimento de objeto e resposta locomotora ao MK-801. Uma hora antes de cada teste comportamental os animais receberam veículo (1ml/kg) ou CBD (60 mg/kg) de acordo com o grupo experimental.

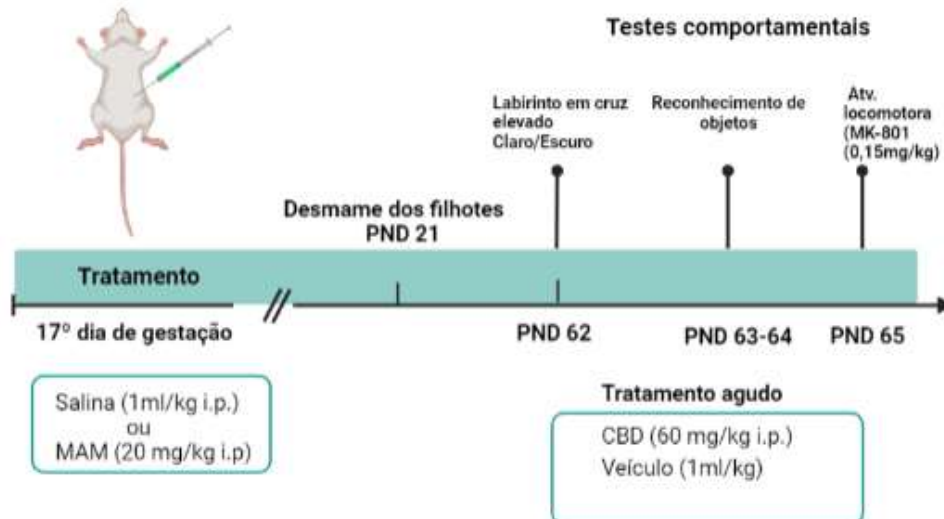


Figura 1. Protocolo experimental. Tratamento com salina ou MAM (20 mg/kg; i.p) e testes comportamentais. **Imagem ilustrativa: Biorender.**

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: salina tratado com veículo; salina tratado com CBD (60 mg/kg; i.p.); MAM tratado com veículo e MAM tratado com CBD (60 mg/kg, i.p.). Os animais receberam o tratamento 1 hora antes de cada teste comportamental na idade adulta.

4.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.6.1 Labirinto em cruz elevado

Descrito pela primeira vez por Handley & Mithani (1984) e validado por Pellow & File (1986), o LCE é um modelo clássico de ansiedade utilizado em estudos experimentais, sendo um método para investigar o efeito das drogas na ansiedade, através de respostas comportamentais espontâneas (Campos et al., 2013). O instrumento é formado por dois braços abertos e opostos posicionados perpendicularmente a dois braços fechados e opostos, formando uma cruz. Ambas as regiões (aberta e fechada) possuem 50 × 10 cm cada uma e as paredes fechadas com 40 cm de altura, e 50 cm em relação ao chão (Pellow & File, 1986). A sala experimental foi mantida com luminosidade controlada. Uma hora após da administração de CBD ou veículo, cada animal foi posicionado região central do labirinto com a cabeça direcionada para um dos braços fechados, podendo se locomover e explorar todas as regiões livremente durante cinco minutos. No intervalo entre a retirada de um animal e o posicionamento de outro, foi realizado a higienização do aparato com álcool 70%. Acima do labirinto foi posicionada uma câmera conectada a um computador, de forma a contemplar todas as regiões do equipamento para o registro do teste e análise comportamental. Esta análise foi realizada por meio de um software Anymaze (Stoelting, Irlanda). Foram analisadas as respostas exploratórias clássicas: porcentagem de entradas nos braços abertos e fechados e tempo de permanência nos braços abertos (Blanchard et al., 1991).

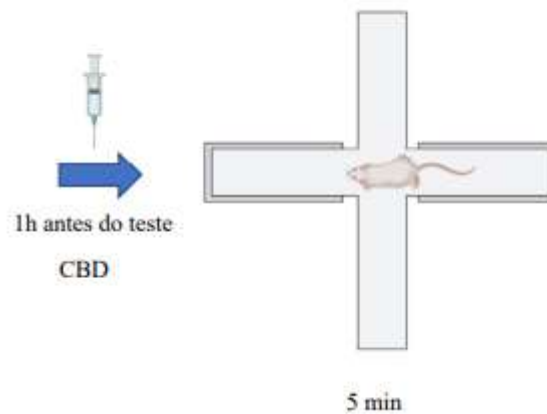


Figura 2. Protocolo experimental do teste de LCE; teste realizado no DPN 62. Imagem ilustrativa: Biorender.

4.6.2 Claro/Escuro

O teste claro/escuro é um teste de roedores comumente usado de comportamento incondicionado tipo ansiedade que se baseia em um conflito de abordagem/evitação entre o desejo de explorar novas áreas e uma aversão a espaços abertos e bem iluminados. Os ratos foram testados em uma caixa composta por um compartimento escuro (seguro) e um compartimento claro (aversivo), de forma que os dois compartimentos são conectados por uma pequena abertura. Os roedores são colocados no compartimento de luz do aparelho e podem se movimentar durante 5 minutos, os quais serão observados o tempo de permanência em cada compartimento, e o número total de cruzamentos de uma área para outra.



Figura 3. Protocolo experimental do teste claro/escuro; teste realizado no DPN 62. Imagem ilustrativa: Biorender.

4.6.3 Reconhecimento de objetos

No dia seguinte a realização do LCE e do claro/escuro, os animais foram submetidos ao teste de RO. Descrito originalmente por Ennaceur & Delacour (1988), o RO tem por objetivo avaliar o comportamento exploratório inato de roedores em explorar a novidade, passando a interagir mais tempo mais com um objeto novo do que com um objeto familiar, sem atribuição de regras ou recompensa. Baseado nisso, o RO passou a ser amplamente utilizado em estudos sobre aprendizagem e memória (Antunes & Biala, 2012; Lueptow, 2017). O teste foi realizado em uma arena circular de acrílico (40 cm de diâmetro e altura de 40 cm). No primeiro dia de teste, cada animal foi submetido a uma sessão de habituação à arena com duração de 15 min. No dia seguinte, os animais foram colocados na mesma arena contendo dois objetos idênticos, onde permaneceram por um período de 10 minutos (sessão de aquisição). Imediatamente após a sessão de aquisição foi administrado CBD (60 mg/kg; i.p.) ou salina. Após um intervalo de 60 minutos, um dos objetos presentes na sessão de aquisição foi trocado por um objeto novo com tamanho, textura e cor diferentes dos objetos anteriores. Os animais foram novamente colocados na arena contendo este objeto novo e o objeto familiar por um período de 5 minutos, registrando-se o tempo de interação com cada objeto (sessão de retenção). A exploração dos objetos foi definida como o animal direcionando sua face ao objeto até uma distância aproximada de 2 cm enquanto observa, cheira ou toca. Os objetos tiveram aproximadamente 16 cm de altura, peso suficiente para evitar serem deslocados pelos 5 min 1h antes do teste CBD 25 animais durante o experimento. Os parâmetros analisados foram: tempo de exploração dos objetos e o índice de discriminação ($ID = TN - TF / TN + TF$), onde TN corresponde ao tempo de exploração do objeto novo e TF ao tempo de exploração do objeto familiar.

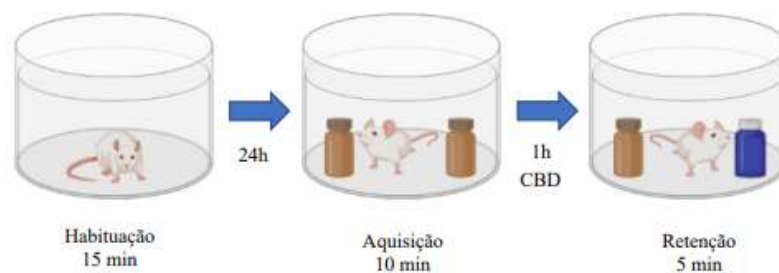


Figura 4. Protocolo experimental do teste de Reconhecimento de objetos (RO); teste realizado no DPN 63. Imagem ilustrativa: Biorender.

4.6.4 Hiperlocomoção induzida por MK-801

No dia seguinte a realização do teste de RO, foi avaliada a hiperlocomoção induzida por MK-801. Este teste foi realizado no campo aberto que consiste em uma arena circular de acrílico (40 cm de diâmetro e 40 cm de altura). Os animais foram colocados no centro da arena e sua atividade locomotora foi determinada e registada com o software Anymaze (Stoelting, Irlanda). Primeiramente os animais receberam veículo ou CBD e a atividade locomotora espontânea foi registrada por 30 minutos. Depois disso, os todos os animais receberam uma injeção intraperitoneal de MK-801 (0,15 mg/kg, i.p.; Sigma) e a sua atividade locomotora foi registada durante outros 60 minutos. A distância total percorrida foi calculada a cada 5 minutos.

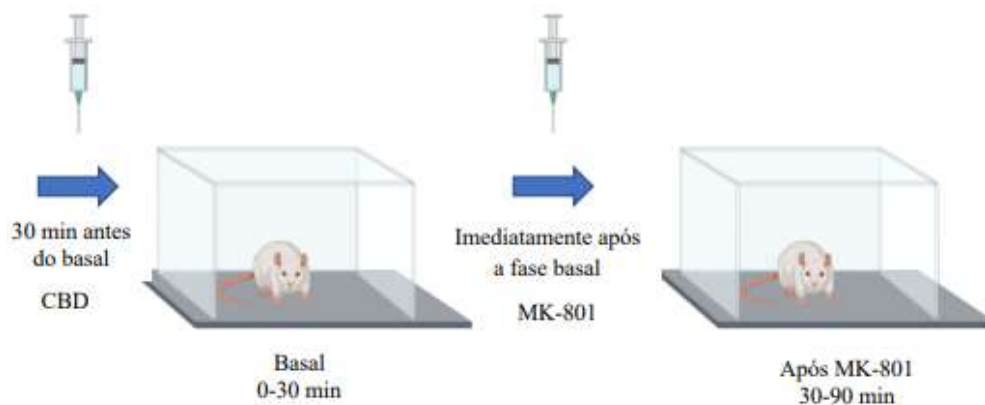


Figura 5. Protocolo experimental do teste da hiperlocomoção induzida por MK-801.; teste realizado no DPN 64. Imagem ilustrativa: Biorender.

4.6.5 Análises estatísticas

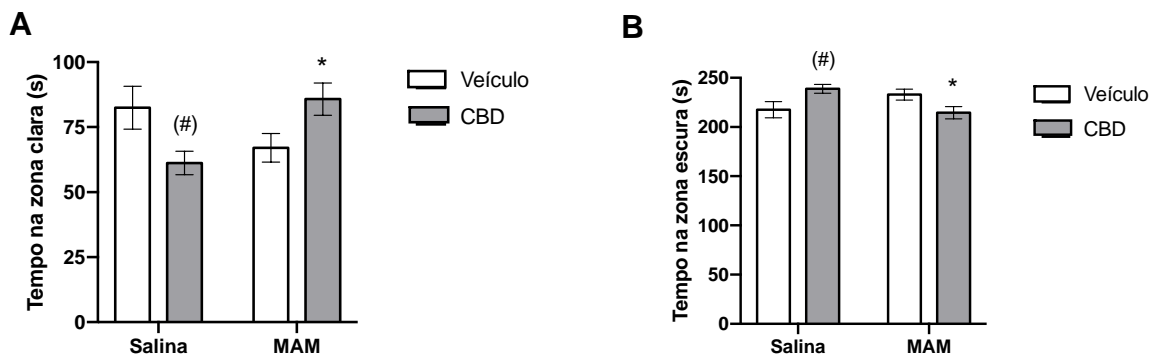
Os resultados obtidos no LCE foram analisados através da ANOVA de duas vias (fatores condição – salina e MAM – e tratamento – veículo e CBD) seguido do pós-teste de Tukey. Para o teste de RO na avaliação do tempo de exploração dos objetos foi utilizado o teste t de Student durante a sessão de aquisição (objeto da direita ou esquerda da arena) e retenção (objeto novo e objeto familiar) para cada grupo. A resposta locomotora foi avaliada através da ANOVA de duas vias (fatores condição – salina e 28 MAM – e tratamento – veículo e CBD) e pela ANOVA de medidas repetidas, com o tempo como fator repetido e grupo (salina/MAM + salina/CBD) como fator principal, seguido do pós-teste de Tukey. Os dados são

representados como a média e o erro padrão da média (\pm EPM) e analisados pelo software GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA). O nível de significância foi estabelecido com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1: EFEITOS DO MAM E DO TRATAMENTO AGUDO DE CBD NO TESTE CLARO-ESCURO

No tempo de permanência no lado claro da caixa ocorreu uma interação entre a condição (Salina/MAM) e o tratamento (veículo/CBD, $F_{1,44}=10,14$, $p=0003$, Figura 6A). Da mesma forma, também ocorreu uma interação entre a condição e o tratamento no tempo de permanência no lado escuro da caixa ($F_{1,44}=3,51$, $p=0,023$). O CBD apresentou efeitos opostos dependendo do tratamento prévio das progenitoras com o MAM, sendo ansiogênico (diminuindo o tempo de permanência no lado claro e aumentando este tempo no lado escuro) nas ratas controle mas sendo ansiolítico (aumentando o tempo de permanência no lado claro e diminuindo este tempo no lado escuro) no grupo MAM (Tukey, $p < 0,05$). Não foi observado efeito significativo no número total de cruzamentos.



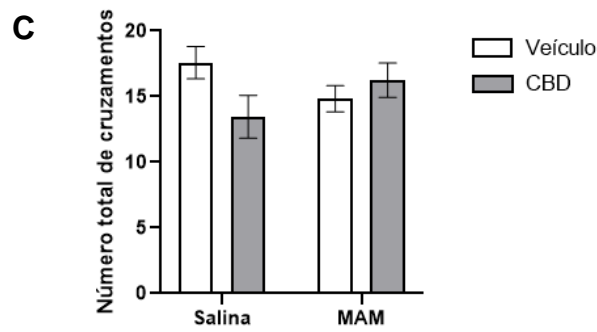


Figura 6: Efeitos do MAM e da administração aguda de CBD (60 mg/kg) no teste de Claro-Escuro. (A) Tempo no lado claro da caixa. (B) Tempo no lado escuro da caixa. (C) Número total de cruzamentos. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM de 12 ratos/grupo, * $p < 0,05$ comparado com o grupo salina-CBD, (#) $p < 0,10$ comparado com o grupo salina-veículo.

5.2 EXPERIMENTO 2: EFEITOS DO MAM E DO TRATAMENTO AGUDO DE CBD NO TESTE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

Os dados obtidos abaixo não demonstraram nenhum efeito significativo ($p < 0,05$) da condição (MAM) ou do tratamento (CBD) em relação ao número de entradas nos braços abertos, ao tempo de permanência nos mesmos, e ao número de entradas nos braços fechados, fatores que são utilizados como índices de ansiedade (Figura 7A, B e C).

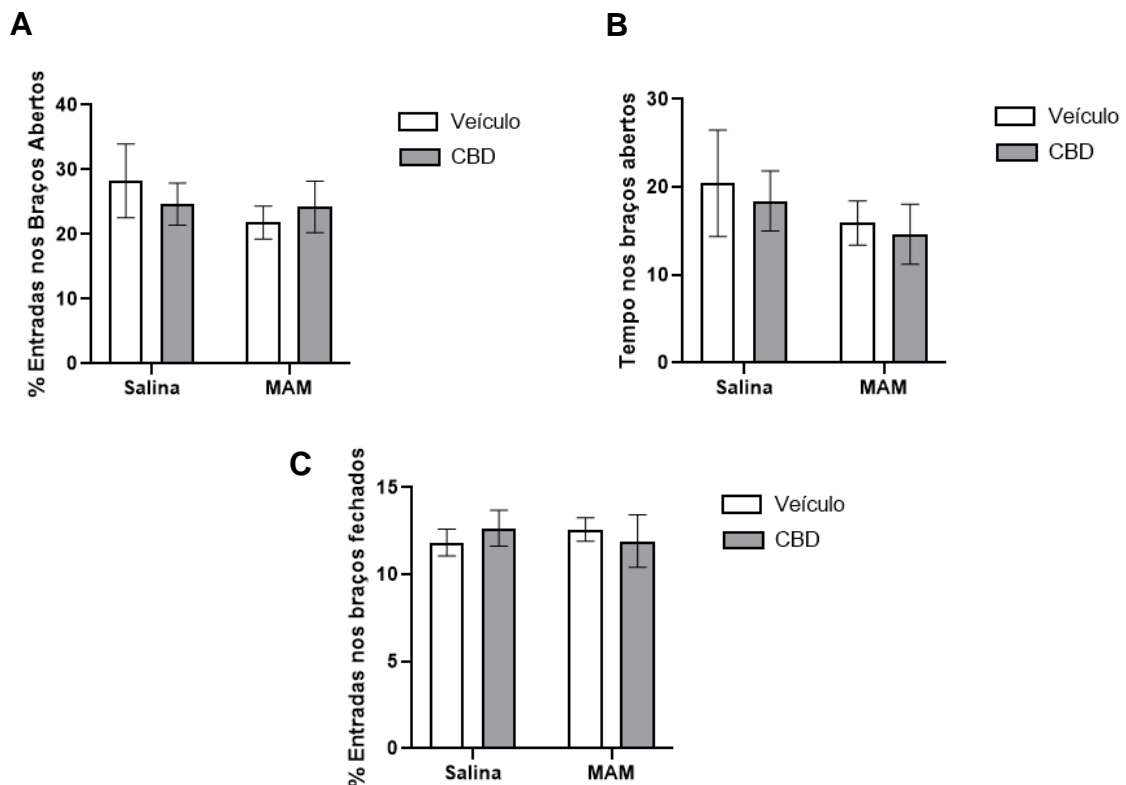


Figura 7. Efeito do MAM e do tratamento agudo com CBD no LCE (n=8-12/grupo). (A) Porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE. Não houveram diferenças significativas. (B) Tempo gasto nos braços abertos do LCE. Não houveram diferenças significativas. (C) Número de entradas nos braços fechados. Não houveram diferenças significativas. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM, * $p < 0,05$. ANOVA de duas vias.

5.3 EXPERIMENTO 3: EFEITOS DO MAM E DO TRATAMENTO AGUDO DE CBD NO RECONHECIMENTO DE OBJETOS (NOR)

Novamente o CBD produziu efeitos opostos na dependência do tratamento das progenitoras com veículo ou MAM no índice de discriminação (interação condição versus tratamento, $F_{1,44}=4,14$, $p=0,048$), apresentando um efeito pró-cognitivo nos animais controle, mas não alterando os animais MAM (Figura 8).

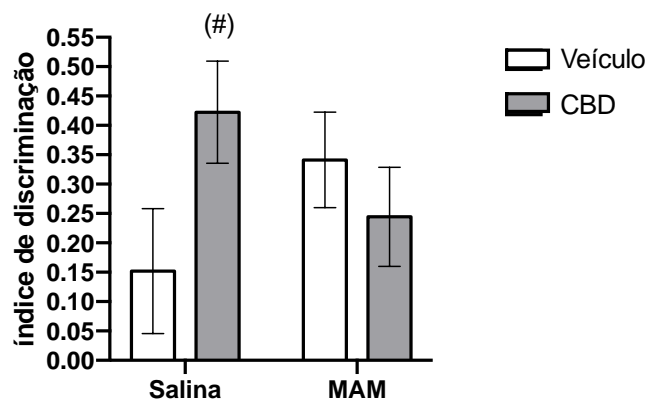


Figura 8. Efeito do MAM e do tratamento agudo com CBD no teste de RO (n=8-13/grupo). Os dados estão apresentados como a média \pm EPM, (#) $p = 0,061$.

5.4 EXPERIMENTO 4: EFEITOS DO MAM E DO TRATAMENTO AGUDO DE CBD NA HIPER LOCOMOÇÃO INDUZIDAS POR MK-801

Exceto por um efeito geral do tempo ($F_{4,68};196,86=61,58$, $p<0,001$), não houveram diferenças entre os grupos na fase basal do teste (Fig. 8). Após a administração do MK801, ocorreu um aumento na atividade locomotora ($F_{2,64};111,16=65,5$, $p<0,001$) que foi menor nos animais cujas progenitoras foram tratadas com o MAM (interação condição versus tempo, $F_{2,64},111,16=3,28$, $p<0,029$, Figura 8).

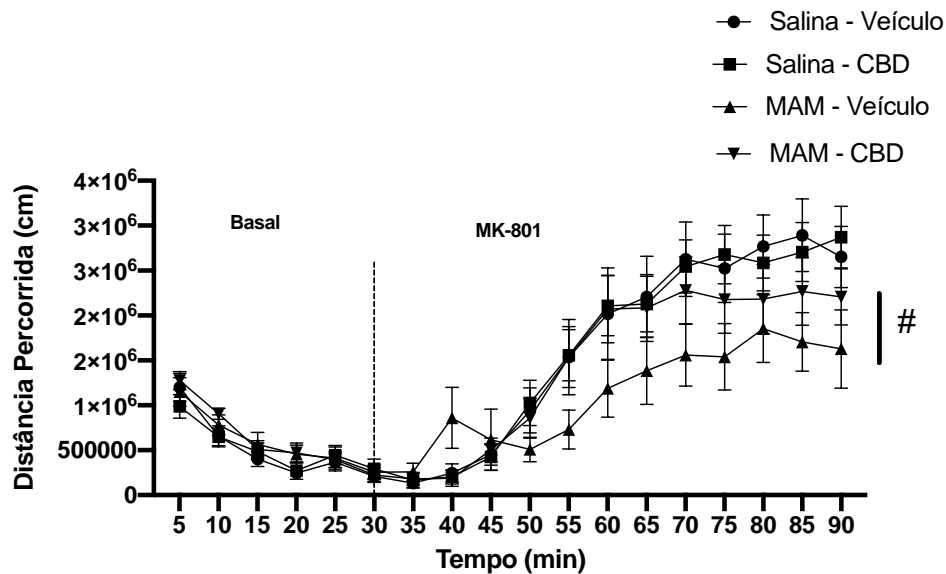


Figura 8. Efeito do MAM e tratamento agudo de CBD no teste de hiper locomoção induzida por MK-801. (A) Não houve diferenças na fase basal do teste. (B) Após o MK-801 ocorreu um aumento da atividade locomotora que foi menor nos animais do grupo MAM Também não foi observado efeito do tratamento. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM de 12 ratos/grupo. #diferença dos animais cujas progenitoras foram tratadas com MAM versus salina.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo as principais alterações comportamentais observadas na prole após o tratamento com MAM nas progenitoras relacionou-se ao aumento de ansiedade e diminuição na resposta locomotora observada após a administração do antagonista de receptores NMDA de glutamato MK801.

A maioria dos estudos deste modelo foi realizado em ratos machos. Até onde sabemos, existem três estudos que avaliaram ratas neste modelo, estudando alterações comportamentais e eletrofisiológicas (Hazane et al. 2009 ; Pen et al. 2011 ; Snyder et al. 2013). Estes estudos mostraram a presença de sintomas positivos e função hipocampal reduzida. As diferenças sexuais também foram observadas em outros estudos de modelos animais de desenvolvimento, incluindo o modelo de exposição Poly I:C e o modelo de lesão hipocampal ventral neonatal (Hill, 2016). Embora a prevalência da esquizofrenia ao longo da vida não varie entre homens e mulheres, diferenças foram observadas na idade de início e nos perfis dos sintomas (Li R et al., 2016), sugerindo que pode existir um componente hormonal para esse transtorno. Diversos sintomas da esquizofrenia se correlacionam com fases de baixos níveis hormonais em humanos, o que levou à hipótese de proteção

de estrogênio da esquizofrenia (Perez et al., 2014). A evidência para esta hipótese vem da observação de que as mulheres são mais suscetíveis ao primeiro episódio ou recaída quando há uma grande queda de estrogênio, como durante o período pós-parto (MCNeil, 1986) ou durante a menopausa (Salem et al., 1998). Por outro lado, a gravidez, que é acompanhada por altos níveis de estrogênio, confere um efeito protetor (Munk-Olsen et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que a psicose é exacerbada durante as fases de baixo estrogênio do ciclo menstrual, enquanto as melhorias dos sintomas são observadas durante as fases mais altas de estrogênio (Hallonquist et al., 1993). Uma maneira pela qual as alterações hormonais podem influenciar os sintomas semelhantes à esquizofrenia é por meio de seus efeitos no sistema dopaminérgico, pois os estrogênios demonstraram modificar a sinalização da dopamina em ratos (Silverman et al., 2007).

O teste de LCE é comumente utilizado para avaliação de repostas relacionadas a ansiedade (Pellow & File, 1986). É baseado na tendência natural dos roedores de explorar novos ambientes e sua evitação inata de lugares desprotegidos e potencialmente perigosos, eliciando o conflito esquiva-exploração dos braços abertos (Wall et al., 2001; Campos et al., 2013). O aumento ou diminuição do número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos são índices relacionados a ansiedade enquanto a exploração nos braços fechados são parâmetros relacionados a atividade locomotora (Campos et al., 2013). Nesse teste, foi possível observar que os animais MAM/Veículo apresentaram uma pequena diminuição na porcentagem de entradas nos braços abertos, quando comparados aos animais Salina/Veículo. Entretanto, a administração de MAM (20mg/Kg) não foi capaz de gerar comportamentos semelhantes a ansiedade de forma significativa ($p < 0,05$). Também não houve efeito significativo do tratamento com CBD nesse teste. Ademais, é válido salientar que os animais do grupo controle mostraram grande variabilidade.

Assim como o LCE, o teste claro-escuro é um modelo que se baseia tanto na aversão inata de roedores a áreas iluminadas quanto em sua tendência a exibir comportamento locomotor espontâneo em resposta a novos ambientes. Os ansiolíticos aumentam a locomoção e o tempo gasto na área de luz, enquanto os compostos ansiogênicos têm efeitos opostos (Gogas et al., 2007). Nossos resultados apresentados indicam um efeito significativo de interação entre a

condição MAM e o tratamento com CBD ($F_{1,44}=10,14$, $p=0003$). É possível notar que nos animais Salina, o tratamento com CBD apresenta um perfil ansiogênico, diminuindo o tempo de permanência na zona clara desses animais. No entanto, nos animais MAM o tratamento com CBD possui um efeito oposto, aumentando o tempo de permanência na zona clara. Assim, pode-se afirmar que o efeito ansiolítico do CBD nesse teste dependeu da condição MAM.

Segundo estudo, os compostos canabinóides produzem efeitos bimodais, causando assim efeito ansiolítico em baixas doses (Campos, et al., 2009; Onaivi et al., 1990; Rodriguez de Fonseca et al., 1996; Berrendero and Maldonado, 2002; Genn et al., 2003) e efeito ansiogênico em altas doses (Campos, et al., 2009; Onaivi et al., 1990; Rodriguez de Fonseca et al., 1996; Giuliani et al., 2000; Arévalo et al., 2000; Genn et al., 2003, Viveros et al., 2005). As razões para essa curva dose-resposta ainda não são conhecidas, mas evidências sugerem que poderia envolver o receptor TRPV1. No Sistema Nervoso Central, esses receptores são expressos em diversas áreas do cérebro que estão relacionadas ao controle de defesa e respostas de estresse, onde alguns estudos sugerem que eles podem facilitar a liberação de glutamato (Campos, et al., 2009; Palazzo et al., 2002; Xing and Li, 2007). A dose utilizada foi baseada em estudos anteriores da literatura que apontam resultados consistentes utilizando a dose de 60 (mg/kg) de CBD (Zuardi et al., 1991; Guimarães et al., 2004; Moreira et al., 2005), incluindo estudos recentes realizados no modelo MAM (Stark et al., 2019; 2020).

No teste de Reconhecimento de objetos, buscamos avaliar a função cognitiva desses animais MAM, além dos possíveis efeitos antipsicóticos do CBD. Na esquizofrenia os déficits cognitivos podem estar presentes antes do primeiro episódio psicótico (Brewer et al., 2006) e persistem durante todo o curso da doença (Chua et al., 1996). Além disso, os sintomas cognitivos são resistentes aos antipsicóticos disponíveis, o que indica a necessidade de novas estratégias farmacológicas que sejam eficazes para esses sintomas. Similar aos humanos, roedores tratados com MAM apresentam déficits cognitivos na idade adulta, como alterações na memória de reconhecimento (Flagstad et al., 2004; Stark et al., 2022).

Na fase de retenção, se o animal se orienta preferencialmente para o objeto novo, infere-se que o animal “reconheceu” o objeto familiar, mostrando assim uma sensibilidade para discriminar o antigo do novo. O desempenho no teste é quantificado

usando o índice de discriminação, que reflete o tempo de exploração para o novo, em comparação com o objeto familiar, como uma proporção do tempo total de exploração do animal. Assim, esperávamos que os animais MAM/Veículo apresentassem prejuízo cognitivo relacionado a memória de curto prazo de reconhecimento dos objetos, entretanto, os resultados obtidos foram contrários, com os animais MAM tendendo a apresentar maior índice quando comparados com os animais Salina. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores, que indicaram que alterações na cognição induzidas por MAM não foram observadas em fêmeas, apenas em ratos machos (Moore et al., 2006; Gastambide et al., 2012; Perez et al., 2013). Além disso, novamente o CBD produziu efeitos opostos na dependência do tratamento das progenitoras com veículo ou MAM no índice de discriminação (interação condição versus tratamento, $F_{1,44}=4,14$, $p=0,048$), apresentando um efeito pró-cognitivo nos animais controle, mas não alterando os animais MAM.

O comprometimento da memória de reconhecimento observado no modelo MAM pode ser atribuído à expressão alterada do receptor CB1 no córtex pré-frontal (CPF), uma região intimamente relacionada com os sintomas cognitivos (Stark et al., 2019). O aumento da expressão de CB1 no CPF também é observado em outros modelos de neurodesenvolvimento da esquizofrenia (Marco et al., 2014; Robinson et al., 2010). Complementando esses resultados, o prejuízo na memória de reconhecimento observado nos animais MAM foi revertido pelo tratamento neonatal com AM251, antagonista/agonista inverso do receptor CB1 (Stark et al., 2022). Em conjunto, esses resultados podem abrir caminho para novas estratégias farmacológicas no tratamento dos sintomas cognitivos.

O efeito pró-cognitivo do CBD foi observado em trabalho anterior no modelo de alterações produzidas pelo tratamento repetido com MK801 (Rodrigues et al., 2020). Neste estudo, o efeito pré-cognitivo do CBD dependeu da facilitação da neurotransmissão mediada por receptores de serotonina de tipo 5HT1A. Em trabalho recente, ainda não publicado, (Rodrigues da Silva et al.), foi verificado, usando a técnica de micro diálise, que o CBD aumenta as concentrações de dopamina no córtex pré-frontal através de mecanismo envolvendo receptores 5HT1A. Baseado nestes resultados, nossa hipótese, que ainda necessita ser testada, é a de que o CBD facilite a memória por facilitar a liberação de dopamina no córtex pré-frontal via receptores 5HT1A.

Já no teste de hiperlocomoção induzida por anfetamina, o conceito é baseado nas premissas de que drogas que promovem a liberação de DA, como o MK-801 que antagoniza receptores glutamatérgicos inotrópicos do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA), causam alterações relacionadas aos sintomas positivos, por exemplo um aumento da atividade locomotora (Krystal et al., 1994). Embora complexo e multifatorial, o papel da dopamina no controle do movimento é razoavelmente bem definido, com envolvimento predominante dos sistemas dopaminérgicos mesolímbicos e nigroestriatal e uma farmacologia relativamente clara. Portanto, espera-se que os animais tratados com MAM apresentem atividade locomotora aumentada em comparação com animais controle. Em nossos resultados, não foram encontradas diferenças entre os grupos na fase basal do teste, exceto por efeito geral do tempo. Após a administração do MK-801, obtivemos um resultado contrário ao esperado, com os animais tratados com MAM apresentando menor aumento na atividade locomotora. As razões desta alteração inesperada ainda não são claras. Precisamos complementar este resultado verificando a resposta locomotora e a interferência do MAM e CBD em modelo de hiperestimulação dopaminérgica. Além disso, é importante lembrar que neste estudo os animais não foram submetidos a estresse adicional. Dentro da hipótese de “two-hit” (Maynard et al., 2001), a exposição a estressores durante o período da adolescência seria um fator importante no desenvolvimento da esquizofrenia. Embora muitas das alterações investigadas no presente trabalho ocorram em ratos machos sem a exposição de estressores no período da adolescência, é possível que, no caso das fêmeas, este seja um fator importante.

7. CONCLUSÃO

Em suma, os resultados obtidos indicam que o modelo de neurodesenvolvimento MAM não induziu em fêmeas todas as alterações comportamentais esperadas similares às observadas na esquizofrenia. Entretanto, conseguimos notar algumas alterações na prole após o tratamento com MAM, que se relacionaram ao aumento de ansiedade e diminuição na resposta locomotora observada após a administração do antagonista de receptores NMDA de glutamato MK801. Com relação ao tratamento com Canabidiol, no teste claro/escuro, que avaliou o comportamento relacionado a ansiedade nos animais MAM e os efeitos

ansiolíticos do CBD, foi possível identificar uma interação entre o tratamento (CBD) e a condição (MAM). Assim, neste teste o tratamento com CBD nos animais salina apresentou um perfil ansiogênico, enquanto que nos animais MAM apresentou efeito ansiolítico, aumentando o tempo de permanência na zona clara. Um efeito oposto do CBD foi observado no teste de reconhecimento de objetos (RO), o qual buscava avaliar as alterações cognitivas nos animais MAM e os efeitos antipsicóticos do CBD. Neste, observamos um efeito pré-cognitivo do tratamento nos animais salina, sem alterar a cognição nos animais MAM. Nos demais testes comportamentais, o CBD na dose de 60 (mg/Kg) não foi capaz de reverter as alterações comportamentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS R., HUNT M., CLARK J. Structure of cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of Minnesota wild hemp. **J. Am. Chem. Soc.** **62**, 196–200, 1940.
- ANGRIST, B.; KAMMEN, D. P. VAN. CNS. Stimulants as tools in the study of schizophrenia. **Trends Neurosci**, v. 7; p. 388–390, 1984.
- BALDUINI W, *et al.* Treatment with methylazoxymethanol at different gestational days: Physical, reflex development and spontaneous activity in the offspring. **NeuroToxicology**. 12(2):179–188, 1991.
- BERRENDERO F; MALDONADO R. Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by delta (9)-tetrahydrocannabinol. **Psychopharmacology Berl**, 163:111–7, 2002.
- CAMPOS, A. C., FOGAÇA, M. V., AGUIAR, D. C., & GUIMARAES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Braz J Psychiatry**, 35, S101-S111., 2013.
- CAMPOS AC, GUIMARÃES FS. Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 1517-21, 2009.
- CARLSSON, A.; LINDQVIST, M. Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on formation of 3methoxytyramine and Normetanephrine in mouse brain. **Acta pharm. et toxicologica**, v. 20, p. 140–4, 1963.
- CARRIER EJ., AUCHAMPACH JA., HILLARD CJ. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. **Proc Natl Acad Sci**, 103(20), 7895–7900, 2006.
- CATTABENI F, DI LUCA M. Developmental models of brain dysfunctions induced by targeted cellular ablations with methylazoxymethanol. **Physiol Rev**. 1997;77(1):199–215.
- CHAN V. Schizophrenia and Psychosis: Diagnosis, Current Research Trends, and Model Treatment Approaches with Implications for Transitional Age Youth. **Child Adolesc Psychiatr Clin N Am**:341-366, 2017.
- CHAVES, A.C. Diferenças entre os sexos na esquizofrenia. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v.22, supl.1, p.21-22, maio. 2000.
- CORRELL, C. U., & SCHOOLER, N. R. Negative Symptoms in Schizophrenia: A Review and Clinical Guide for Recognition, Assessment, and Treatment. **Neuropsychiatr Dis Treat**, 16, 519–534, 2020.

CREESE, I., BURT, D. R., & SNYDER, S. H. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. **Science**, 192(4238), 481-483, 1976.

CRIPPA JA., *et al.* Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. **Neuropsychopharmacol**, 29(2), 417-426, 2004.

CRISTINO L, *et al.* Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. **Neurosci**; 139: 1405-15, 2006.

CRUSH, E., *et al.* Protective factors for psychotic experiences amongst adolescents exposed to multiple forms of victimization. **J Psychiatric Research**, 104, 32-3, 2018.

DI MARZO V, BISOGNO T, DE PETROCELLIS L. Anandamide: some like it hot. **Trends Pharmacol Sci** 22: 346-9, 2001;

DOS-SANTOS-PEREIRA M., DA-SILVA C. A., GUIMARAES F. S., DEL-BEL E. Co-administration of cannabidiol and capsazepine reduces L-DOPA-induced dyskinesia in mice: possible mechanism of action. **Neurobiol. Dis.** 94 179–195, 2016.

E. BLEULER, (Translated by J. Zinkin, 1950), *Dementia Praecox or the Group of Schizophrenias*, **International Universities Press**, New York, 1911.

E. KRAEPELIN, R.M. BARCLAY, G.M. ROBERTSON, *Dementia Praecox and Paraphrenia*, **E and S Livingstone**, Edinburgh, 1919.

GASTAMBIDE F, *et al.* Tricklebank MD, Selective remediation of reversal learning deficits in the neurodevelopmental MAM model of schizophrenia by a novel mGlu5 positive allosteric modulator, *Neuropsychopharmacology : official publication of the Neuropsychopharmacology* 37(4) 1057–66, 2012.

GENN RF, TUCCI S, MARCO E, VIVEROS MP. Anxiolytic and anxiogenic effects of the cannabinoid agonist CP 55, 940 animal tests of anxiety. **J Psychopharmacol** ;17:A27, 2003.

GOGAS, K. R., et al. *Anxiety. Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 85–115, 2007.

GOMES, F. V., ZHU, X., & GRACE, A. A. The pathophysiological impact of stress on the dopamine system is dependent on the state of the critical period of vulnerability. **Mol Neuropsychiatry**, 25(12), 3278-3291, 2020.

GRACE AA, MOORE H. Regulation of information flow in the nucleus accumbens: A model for the pathophysiology of schizophrenia. In: Lenzenweger MF, Dworkin RH, editors. *Origins and development of schizophrenia: Advances in experimental psychopathology*. **APA**; Washington D.C.: pp. 123–157, 1998.

HAMPSON AJ., *et al.* Cannabidiol and (-)Delta9- tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. **Proc Natl Acad Sci**, 95(14), 8268-8273, 1998.

- HAZANE, F. *et al.*, Behavioral Perturbations after Prenatal Neurogenesis Disturbance in Female Rat. **Neurotox Res**, **15**(4), pp.311–320, 2009.
- HALLONQUIST JD, SEEMAN MV, LANG M, RECTOR NA, Variation in symptom severity over the menstrual cycle of schizophrenics, **Biol Psychiatry** 33(3) 207–9, 1993.
- HIPPIUS H. The history of clozapine. **Psychopharmacol**,99:S3-S5, 1989.
- HILL, R.A., Neuroscience and Biobehavioral Reviews Sex differences in animal models of schizophrenia shed light on the underlying pathophysiology **Neurosci Biobehav Rev**, **67**, pp.41–56, 2016.
- HOWES, O. D., MCCUTCHEON, R., OWEN, M. J., & MURRAY, R. M. The role of genes, stress, and dopamine in the development of schizophrenia. **Biol Psychiatry**, 81(1), 9-20, 2017.
- IMMONEN, J., JÄÄSKELÄINEN, E., KORPELA, H., & MIETTUNEN, J. Age at onset and the outcomes of schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. **Early Interv Psychiatry**, 11(6), 453-460, 2017.
- JAUHAR, S., JOHNSTONE, M & MCKENNA, P. J Schizophrenia. **Lancet**, 399(10323):473-486, 2022.
- JORDAN, S., *et al.* The antipsychotic aripiprazole is a potent, partial agonist at the human 5-HT1A receptor. **Eur J of Pharmacol**, 441(3), 137-140, 2002.
- KARNIOL IG, CARLINI EA. Pharmacological interaction between cannabidiol and delta 9 tetrahydrocannabinol. **Psychopharmacol.**; 33: 53–70. 40, 1973.
- KIM, Y.-K.; NA, K.-S. Neuroprotection in Schizophrenia and Its Therapeutic Implications. **Psychiatry investigation**, v. 14, n. 4, p. 383–391, jul. 2017.
- KOETHE D, *et al.* Anandamide elevation in cerebrospinal fluid in initial prodromal states of psychosis. **Br J Psychiatr**. 194: 371-2. 43, 2009.
- KUHARIC, D., *et al.* Interventions for prodromal stage of psychosis. **Cochrane Database Syst Rev** (11), 2019.
- LAVIOLETTE SR. Dopamine modulation of emotional processing in cortical and subcortical neural circuits: evidence for a final common pathway in schizophrenia? **SchizophrBull** 33:971–84, 2007.
- LENA I, CHESSEL A, LE PEN G, KREBS MO, GARCIA R. Alterations in prefrontal glutamatergic and noradrenergic systems following MK-801 administration in rats prenatally exposed to methylazoxymethanol at gestational day 17. **Psychopharmacology (Berl)**;192:373–383, 2007.
- LE PEN G., *et al.* Peri-pubertal maturation after developmental disturbance: a model for psychosis onset in the rat. **Neurosci.**;143:395–405, 2006.

LEWEKE FM, KOETHE D. Cannabis and psychiatric disorders: it is not only addiction. **Addict Biol** ; 13: 264-75, 2008.

LIEBERMAN, J. A., *et al.* Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. **New England J of Medicine**, 353(12), 1209-1223, 2005.

LI R, MA X, WANG G, YANG J, WANG C. Why sex differences in schizophrenia? **J Transl Neurosci (Beijing)**. Sep;1(1):37-42, 2016.

LODGE DJ, GRACE AA. Aberrant hippocampal activity underlies the dopamine dysregulation in an animal model of schizophrenia. **J Neurosci.**;27:11424–11430, 2007.

LODGE, D. J., & GRACE, A. A. Gestational methylazoxymethanol acetate administration: a developmental disruption model of schizophrenia. **Behav brain res**, 204(2), 306–312, 2009.

MAYNARD TM, SIKICH L, LIEBERMAN JA, LAMANTIA AS. Neural development, cell-cell signaling, and the "two-hit" hypothesis of schizophrenia. **Schizophr Bull.**;27(3):457-76, 2001.

MCNEIL TF, A prospective study of postpartum psychoses in a high-risk group. 1. Clinical characteristics of the current postpartum episodes, **Acta psychiatrica Scandinavica** 74(2) 205–16, 1986.

MCCUTCHEON, R. A., MARQUES, T. R., & HOWES, O. D. Schizophrenia - an overview. **JAMA Psychiatry**, 77(2), 201-210, 2020.

MECHOULAM R., SHVO Y. Hashish—I: the structure of cannabidiol. **Tetrahedron** 19, 2073–2078. 1963.

MELTZER, H. Y. The role of serotonin in antipsychotic drug action. **Neuropsychopharmacol**, 21(1), 106-115, 1999.

MILLAN, M. J., *et al.* Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. **Nature**, 15(7), 485-515, 2016.

MIYAMOTO, S. et al. Antipsychotic Drugs. In: **Psychiatry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2008. p. 2161–2201.

MOORE H, JENTSCH JD, GHAJARNIA M, GEYER MA, GRACE AA, A neurobehavioral systems analysis of adult rats exposed to methylazoxymethanol acetate on E17: implications for the neuropathology of schizophrenia, **Biol psychiatry** 60(3) 253–64, 2006.

MOREIRA, F. A., & GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. **Eur J of Pharmacol**, 512(2- 3), 199-205, 2005.

MOREIRA, F. A., & GUIMARÃES, F. S. Mechanisms of antipsychotic medications: dopaminergic hypotheses. **Medicina (Ribeirão Preto)**, 40(1), 63-71, 2007.

NASRALLAH, H. A. Atypical antipsychotic-induced metabolic side effects: insights from receptor-binding profiles. **Mol Psychiatry**, 13(1), 27-35, 2008.

ONAIVI ES, GREEN MR, MARTIN BR. Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. **J Pharmacol Exp Ther** ;253:1002–9, 1990.

PATEL KR, CHERIAN J, GOHIL K, ATKINSON D. Schizophrenia: overview and treatment options. **P T**. Sep;39(9):638-45, 2014.

PELLOW, S., & FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, 24(3), 525-529, 1986.

PEN, G. LE, JAY, T.M. & KREBS, M.O., . Effect of antipsychotics on spontaneous hyperactivity and hypersensitivity to MK-801-induced hyperactivity in rats prenatally exposed to methylazoxymethanol. **J of Psychopharmacol** 25(6), pp.822–835, 2011.

PEREZ SM, SHAH A, ASHER A, LODGE DJ, Hippocampal deep brain stimulation reverses physiological and behavioural deficits in a rodent model of schizophrenia, **Int J Neuropsychopharmacol** 16(6) (2013).

PEREZ SM, CHEN L, LODGE DJ, Alterations in dopamine system function across the estrous cycle of the MAM rodent model of schizophrenia, **Psychoneuroendocrinology** 47 88–97, 2014.

PETITET F. **et al.** Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta-9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. **Life Sci**. 63: 1-6, 1998.

POGARELL O, **et al.** Dopaminergic neurotransmission in patients with schizophrenia in relation to positive and negative symptoms. **Pharmacopsychiatry** 45(Suppl 1):S36–41, 2012.

POWELL S. B. Models of neurodevelopmental abnormalities in schizophrenia. **Curr Top Behav Neurosci**, 4, 435–481, 2010.

RODRIGUEZ DE FONSECA F, **et al.** Corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist [Dhe12,Nle21,38, CaMeLeu37] CRF attenuates the acute actions of the highly potent cannabinoid receptor agonist HU-210 on defensive-withdrawal behavior in rats. **J Pharmacol Exp Ther**;276:56–64, 1996.

RODRIGUES DA SILVA N, **et al.** Cannabidiol attenuates behavioral changes in a rodent model of schizophrenia through 5-HT1A, but not CB1 and CB2 receptors. **Pharmacol Res**. Jun;156:104749, 2020.

SALEM JE, KRING AM, The role of gender differences in the reduction of etiologic heterogeneity in schizophrenia, **Clin Psychol Rev** 18(7) 795–819, 1998.

SCHUBART CD., **et al.** Cannabis with high cannabidiol content is associated with fewer psychotic experiences. **Schizophr Res**. 130: 216–21., 2011.

SEEMAN, P., LEE, T., CHAU-WONG, M., & WONG, K. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. **Nature**, 261(5562), 717-719, (1976).

- SILVERMAN JL, KOENIG JI, Evidence for the involvement of ERbeta and RGS9-2 in 17-beta estradiol enhancement of amphetamine-induced place preference behavior, **Horm Behav** 52(2) 146-55, 2007.
- SNYDER, M.A. & GAO, W.-J., . NMDA hypofunction as a convergence point for progression and symptoms of schizophrenia **Front Cell Neurosci** 7(March), pp.1-12, 2013.
- SOLISMAA A., **et al.** Polimorfismos do gene histaminérgico associados à sedação em pacientes tratados com clozapina. **EUR. Neuropsicofarmacol.** ; 27 : 442-449, 2017.
- STAHL, S. M. Stahl's Essential Psychopharmacology - Neuroscientific Basis and Practical Application. **NY: Cambridge University Press**, 2013.
- STEEDS, H.; CARHART-HARRIS, R. L.; STONE, J. M. Drug models of schizophrenia. **Ther Adv Psychopharmacol**, v. 5, n. 1, p. 43-58, fev. 2015.
- TANDON, R.; NASRALLAH, H. A.; KESHAVAN, M. S. Schizophrenia, "Just the Facts" 5. Treatment and prevention Past, present, and future. **Schizophr Res**, v. 122, n. 1-3, p. 1-23, 2010.
- THOMAS, B.F. **et al.** Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. **J Pharmacol Exp Ther.** 285: 285-292, 1998.
- VIVEROS MP, MARCO EM. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. **Pharmacol Biochem Behav** ;81:331-42, 2005.
- WALTER H, KAMMERER H, FRASCH K, SPITZER M, ABLER B. Altered reward functions in patients on atypical antipsychotic medication in line with the revised dopamine hypothesis of schizophrenia. **Psychopharmacology (Berl)** 206:121-32, 2009.
- WALL, P. M., & MESSIER, C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxietylike behavior. **Neurosci Biobehav Rev**, 25(3), 275-286, 2001.
- WOLF, S. A., **et al.** Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and 47 activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis. **CCS**, 8(1), 1-14, 2010.
- ZUARDI AW., **et al.** Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. **Braz J of Medicine Biol Res**, 39(4), 421-429, 2006.
- 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. **Psychopharmacol.** 76: 245-50. 41, 1982.
- ZUARDI AW. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. **Rev Bras Psiquiatr.**; 30: 271-80, 2008.
- ZUARDI, A. W., ANTUNES RODRIGUES, J., & CUNHA, J. M. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. **Psychopharmacol**, 104(2), 260- 264, 1991.

ZUARDI, A. critical review of the antipsychotic effects of cannabidiol : 30 years of a translational investigation. **Curr Pharm Des.** 18: 5131-40, 2012.