



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



**Investigação do possível envolvimento de receptores adenosinérgicos nos
efeitos comportamentais induzidos pelo canabidiol em camundongos
submetidos a diferentes modelos animais**

JOÃO RAPHAEL CAMPOS ALVES DA SILVEIRA

Ribeirão Preto, 2021

Investigação do possível envolvimento de receptores adenosinérgicos nos efeitos comportamentais induzidos pelo canabidiol em camundongos submetidos a diferentes modelos animais

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: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Ribeirão Preto,
Dezembro de 2021.

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 57ª Sessão Ordinária, realizada em 04/10/2021

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, inicialmente, à minha família. À minha mãe, a pessoa pela qual expresso maior admiração nesse mundo e sem a qual eu nunca estaria aqui. Aquela que é mãe, pai e muito mais em minha vida.

Ao meu irmão, pelas companhias, conselhos e puxões de orelhas. Meu maior exemplo de resiliência e superação, sempre me ensinando a lutar cada vez mais sem esquecer aquilo que é importante.

Ao Gianni, meu pai, pelos muitos ensinamentos e momentos compartilhados. Muito obrigado por sempre se fazer presente, me apoiar em minhas escolhas e me ajudar a chegar aonde estou.

Às minhas amizades de Guará, que cultivo desde que sou capaz de me lembrar. Em especial ao ANMILE: Fred, Raul e Haim. Apesar da distância, continuamos próximos como sempre. Sou imensamente grato pelos muitos momentos de descontração, alegria e companhia.

À todas as amizades formadas, aquelas que continuam e as que se foram, nos últimos 4 anos em Ribeirão. Foram tantos aprendizados, sofrimentos e choros compartilhados. Porém, também foram muitos momentos de alegria, festas e diversão. Muito obrigado por tornarem a minha graduação leve.

À minha namorada, Isabela, a pessoa responsável por me ajudar a passar pelo momento mais difícil de minha vida com leveza e tranquilidade. Muito obrigado por estar sempre presente, nunca ter desistido de mim, bem como por cada demonstração de afeto e carinho. Sem você eu não teria sido capaz de chegar até esse ponto.

Agradeço à Amanda, pós-doutoranda que me orientou. Por sempre ser paciente, responder às minhas milhares de dúvidas e me auxiliar em grande parte dos experimentos. Uma pessoa extremamente importante na minha formação como cientista, da qual sempre irei lembrar.

Ao professor Dr. Francisco Guimarães, ou melhor, Chico. Obrigado por me acolher em seu laboratório, se fazer sempre presente e pronto para qualquer problema, pelas orientações e conselhos, assim como proporcionar um ambiente amigável e tranquilo. Agradeço também a todo o pessoal do laboratório, em conjunto

com o professor Felipe Gomes e seus alunos, que me fizeram companhia durante meus experimentos.

Às Prof. Dra. Sabrina Lisboa e Dra. Sâmia Joca, por terem me proporcionado realizar experimentos em seus laboratórios, assim como acompanhar os mais diversos protocolos. Conhecer ambientes diferentes foi de extrema importância em minha formação.

Ao Centro Acadêmico Moura Gonçalves, CAMG, e seus membros. Foram 4 anos de muitas polêmicas, fofocas e discussões. Certamente foi muito importante pelo meu desenvolvimento acadêmico, mas também pessoal. Foram tanto aprendizados que sou incapaz de mensurar.

À equipe Royal Penguins, meu maior achado de 2020. Todos os momentos que passamos juntos, seja jogando ou conversando, foram extremamente significativos. Todas as novas amizades que formei importam muito e me deram forças para continuar quando eu acreditei que não conseguiria. Obrigado pela companhia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento de minha pesquisa e pelo incentivo ao crescimento da tão renegada ciência no Brasil.

RESUMO

O canabidiol (CBD), principal constituinte não-psicotomimético da planta *Cannabis sativa*, tem demonstrado amplo potencial terapêutico para diferentes transtornos neuropsiquiátricos, incluindo depressão e ansiedade. No entanto, os mecanismos envolvidos nesses efeitos ainda não são completamente conhecidos. Resultados observados *in vitro* sugerem que, dentre os vários mecanismos descritos, o CBD pode também inibir a captação de adenosina. Diversos estudos sugerem que a sinalização adenosinérgica poderia estar envolvida em transtornos psiquiátricos como ansiedade e depressão. Por exemplo, o agonismo ou antagonismo de receptores de adenosina produz efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos, respectivamente. Entretanto, até o momento, o possível envolvimento de receptores adenosinérgicos nos efeitos tipo antidepressivo e ansiolítico do CBD ainda não foram investigados. Nesse sentido, o presente trabalho objetivou avaliar a hipótese de que o sistema adenosinérgico estaria envolvido nos efeitos comportamentais do CBD em diferentes modelos animais de depressão e ansiedade. Para tanto, camundongos machos receberam injeção sistêmica aguda de cafeína (antagonista não seletivo de receptores de adenosina: 2,5, 5, 10 e 20 mg/kg), SCH-58261 (antagonista seletivo do receptor adenosinérgico A2a: 0,5 e 1 mg/kg), CPT (antagonista seletivo do receptor adenosinérgico A1; 0,1, 0,5, 1 e 10 mg/kg), CBD (3, 10 e 30 mg/kg) e veículo (10 ml/kg). Os animais foram submetidos aos testes de campo aberto, nado forçado, labirinto em cruz elevado, suspensão pela cauda e transição claro-escuro. Os resultados demonstram que a cafeína, mas não o antagonista seletivo de receptores adenosinérgicos A1, apresenta efeitos tipo-ansiolíticos e tipo-antidepressivos nos testes comportamentais realizados. O pré-tratamento com cafeína, no entanto, não foi capaz de prevenir o efeito tipo-antidepressivo induzido pelo canabidiol no teste de nado forçado. Ainda, o tratamento com o antagonista seletivo do receptor A2a apresentou efeito tipo-ansiolítico no teste de transição claro escuro. Além disso, foi realizada administração sistêmica de canabidiol em camundongos fêmeas, nos quais produziu efeito do tipo antidepressivo nos testes de suspensão pela cauda e nado forçado.

Palavras-Chave: ansiedade, depressão, canabidiol, adenosina, sistema adenosinérgico

ABSTRACT

Cannabidiol (CBD), the main non-psychotomimetic constituent of the *Cannabis sativa* plant, has shown a wide therapeutic potential for different neuropsychiatric disorders, including depression and anxiety. However, the mechanisms involved in these effects are not fully understood. Results observed *in vitro* suggest that, among the various mechanisms described, CBD can also inhibit adenosine uptake. Several studies suggest that adenosinergic signaling could be involved in psychiatric disorders such as anxiety and depression. For example, adenosine receptor agonism or antagonism produces anxiolytic or anxiogenic effects, respectively. However, to date, the possible involvement of adenosinergic receptors in the antidepressant and anxiolytic-like effects of CBD has not been investigated. In this sense, the present work aimed to evaluate the hypothesis that the adenosinergic system would be involved in the behavioral effects of CBD in different animal models of depression and anxiety. For this purpose, mice received acute systemic injection of caffeine (non-selective adenosine receptor antagonist: 2.5, 5, 10 and 20 mg/kg), SCH-58261 (selective adenosine receptor A2a antagonist: 0.5 and 1 mg /kg), CPT (selective adenosinergic A1 receptor antagonist; 0.1, 0.5, 1 and 10 mg/kg), CBD (3, 10 and 30 mg/kg) and vehicle (10 ml/kg). The animals were submitted to open field, forced swimming, elevated plus maze, tail suspension and light-dark transition tests. The results demonstrate that caffeine, but not the selective antagonist of adenosinergic A1 receptors, has anxiolytic-like and antidepressant-like effects in the behavioral tests performed. Caffeine pretreatment, however, was not able to prevent the antidepressant-like effect induced by cannabidiol in the forced swim test. Furthermore, the treatment with the selective antagonist of the A2a receptor showed an anxiolytic-like effect in the light-dark transition test. In addition, systemic administration of cannabidiol was performed in female mice, which produced antidepressant-like effects in the tail suspension and forced swimming tests.

Keywords: anxiety, depression, cannabidiol, adenosine, adenosinergic system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planejamento Experimental – Tratamento Prolongado com CBD.

Figura 2. Efeitos comportamentais induzidos pela cafeína na distância total percorrida no TCA.

Figura 3. Efeitos comportamentais induzidos pela cafeína no tempo de imobilidade no TNF.

Figura 4. Efeitos comportamentais induzidos pela cafeína na porcentagem de tempo (A) e entradas (B) no braço aberto e número de entradas no braço fechado (C) no LCE.

Figura 5. Efeitos comportamentais induzidos pela cafeína no TSC.

Figura 6. Efeitos comportamentais induzidos pela cafeína no tempo total de permanência no compartimento claro (A) e na latência para a primeira entrada no compartimento escuro (B) no TCE.

Figura 7. Efeitos comportamentais induzidos pela associação de cafeína e CBD no TNF.

Figura 8. Efeitos comportamentais induzidos pela associação de cafeína e CBD na porcentagem de tempo (A) e entradas (B) no braço aberto e número de entradas no braço fechado (C) no LCE.

Figura 9. Efeitos comportamentais induzidos pelo CPT no TNF.

Figura 10. Efeitos comportamentais induzidos pelo CPT no TSC.

Figura 11. Efeitos comportamentais induzidos pelo CPT no TCA.

Figura 12. Efeitos comportamentais induzidos pelo CPT no número de entradas no braço fechado (A) e no tempo (B) e número de entradas (C) no braço aberto no LCE.

Figura 13. Efeitos comportamentais induzidos pelo CPT no tempo total de permanência no compartimento claro (A) e na latência para a primeira entrada no compartimento escuro (B) no TCE.

Figura 14. Efeitos comportamentais induzidos pelo SCH-58261 no TCA.

Figura 15. Efeitos comportamentais induzidos pelo SCH-58261 no TNF.

Figura 16. Efeitos comportamentais induzidos pelo SCH-58261 no TSC.

Figura 17. Efeitos comportamentais induzidos pelo SCH no número de entradas no braço fechado (A) e tempo (B) e número de entradas (C) no braço aberto no LCE.

Figura 18. Efeitos comportamentais induzidos pelo SCH no tempo total de permanência no compartimento claro (A) e na latência para a primeira entrada no compartimento escuro (B) no TCE.

Figura 19. Efeitos comportamentais induzidos pelo CBD no TCA.

Figura 20. Efeitos comportamentais induzidos pelo CBD no TNF.

Figura 21. Efeitos comportamentais induzidos pelo CBD no TNF.

Figura 22. Efeitos comportamentais induzidos pelo tratamento prolongado com CBD no TNF.

Figura 23. Efeitos comportamentais induzidos pelo CBD no braço fechado (A) e número de entradas (B) e tempo (C) no braço aberto no LCE.

Figura 24. Efeitos comportamentais induzidos pelo CBD no TSC.

Figura 25. Efeitos comportamentais induzidos pelo CBD e imipramina (IMI) no TCA.

Figura 26. Efeitos comportamentais induzidos pelo CBD e imipramina (IMI) no TNF.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Transtornos Psiquiátricos.....	12
1.2. Sistema Endocanabinóide e Canabidiol.....	13
1.3. Sistema Adenosinérgico.....	14
1.4. Interações Entre os Sistemas Adenosinérgico e Endocanabinóide.....	16
2. HIPÓTESE.....	17
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo Geral.....	17
3.2. Objetivos Específicos.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1. Animais.....	18
4.2. Fármacos.....	18
4.3. Procedimentos Experimentais.....	19
4.3.1. Teste do Nado Forçado.....	19
4.3.2. Teste do Campo Aberto.....	19
4.3.3. Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	19
4.3.4. Teste de Suspensão pela Cauda.....	19
4.3.5. Teste de Transição Claro-Escuro.....	20
4.4. Análise Estatística.....	20
4.5. Delineamento Experimental.....	21
4.5.1. Parte I: Efeitos da Administração Sistêmica de CBD, SCH e CPT no comportamento de camundongos machos.....	21
4.5.2. Parte II: Efeitos da Administração Sistêmica de CBD comportamento de camundongos fêmeas.....	25
5. RESULTADOS.....	26
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÃO.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtornos Psiquiátricos

O transtorno depressivo maior (TDM) é um transtorno psiquiátrico extremamente incapacitante caracterizado por sintomas como humor deprimido e anedonia (perda de interesse ou prazer em quase todas as atividades) ao longo de pelo menos duas semanas, acompanhados de alterações no sono, alimentares, psicomotoras, e sentimento de culpa, assim como, em casos mais graves, a presença de pensamentos suicidas (APA, 2015). A Organização Mundial da Saúde, em 2008, classificou o TDM como terceiro maior contribuinte para a carga global de doenças, e projetou que ocupará o primeiro lugar até 2030 (WHO, 2008). Só nos Estados Unidos, o fardo econômico da depressão é estimado em mais de US\$ 210 bilhões, dos quais aproximadamente 45% podem ser atribuídos a custos diretos, 5% podem ser atribuídos a custos relacionados ao suicídio e 50% podem ser atribuídos aos custos do local de trabalho (WHO, et al. 2017). Assim como os depressivos, transtornos de ansiedade são comuns e incapacitantes, frequentemente subdiagnosticados e subtratados, sendo o mais prevalente deles o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) (DEMARTINI et al., 2019). O TAG apresenta sintomas como ansiedade e preocupação crônicas e generalizadas, bem como sintomas físicos e psicológicos inespecíficos (irritabilidade, fadiga, desatenção, irritabilidade, tensão muscular e distúrbios do sono), e o tratamento pode incluir farmacoterapia com drogas antidepressivas (APA, 2015; DEMARTINI et al., 2019).

Embora existam tratamentos conhecidos e eficazes para transtornos mentais, aproximadamente apenas 25% da população alvo recebe tratamento adequado (EVANS-LACKO et al., 2017). Ademais, apesar da alta diversidade de fármacos antidepressivos clinicamente eficazes, ainda existe uma série de dificuldades nesse processo, tais como: elevado número de pacientes resistentes ao tratamento, essas drogas levarem de 4 a 6 semanas para produzirem melhoras significativas nos sintomas, bem como a grande maioria desses fármacos terem como alvo apenas os sistemas monoaminérgicos de neurotransmissão (CIPRIANI et al., 2018; HARMER et al., 2017; MASLEJ et al., 2020). À vista disso, a busca por novos fármacos multimodais e com alvos moleculares distintos, como os sistemas endocanabinóide e glutamatérgico, tem se intensificado (CESKOVA & SILHAN, 2018; GARAY et al., 2017). Nesse contexto, o canabidiol (CBD), principal constituinte não psicotomimético

da planta *Cannabis sativa*, aparenta ser uma molécula promissora de amplo espectro no tratamento de diferentes transtornos psiquiátricos (SILOTE et al., 2019).

1.2. Sistema Endocanabinóide e Canabidiol

O sistema endocanabinoide (ECS) compreende os receptores canabinóides do tipo 1 (CB1R) e 2 (CB2R), acoplados à proteína G (GPCRs), os quais são alvos do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), composto psicoativo encontrado na planta *Cannabis sativa*. Além disso, integra seus dois principais ligantes endógenos, derivados do ácido araquidônico, a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG); e enzimas responsáveis pela biossíntese [n-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE-PLD) e diacilglicerol lipases (DAGL), para a AEA e 2-AG, respectivamente], bem como degradação [hidrolase da amida de ácidos graxos (FAAH) e monoacilglicerol lipase (MAGL), para a AEA e 2-AG, respectivamente] desses ligantes “endocanabinóides”. (DEVANE et al., 1992; PIOMELLI, 2013; UEDA et al., 2011).

O receptor CB1 é encontrado principalmente nos terminais de neurônios centrais e periféricos, nos quais medeia a liberação de diferentes neurotransmissores através da ativação de proteínas $G_{i/o}$, levando a uma hiperpolarização da membrana por meio da inibição da enzima adenilato ciclase e ativação de canais de potássio (PERTWEE et al., 2010). No sistema nervoso central, apresenta altos níveis de expressão nos núcleos da base, hipocampo, córtex cerebral, cerebelo e hipotálamo, estando relacionados com seu papel fisiológico no controle motor, cognitivo, da memória e da analgesia (PERTWEE, 2015). De maneira similar, o receptor CB2 também se encontra acoplado a proteínas $G_{i/o}$, que inibem a adenilato ciclase e estimulam proteínas quinases ativadas por mitógenos (HOWLETT & ABOOD, 2017). No entanto, este encontra-se expresso principalmente em tecidos linfóides periféricos, assim como em monócitos e leucócitos circulantes. Enquanto no sistema nervoso central apresenta baixos níveis de expressão, ocorrendo majoritariamente na micróglia e em situações de neuroinflamação (ATWOOD et al., 2012).

De fato, há evidências de que os endocanabinóides e receptores CB1 estão amplamente distribuídos em áreas cerebrais associadas aos transtornos afetivos incluindo hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala e diversos núcleos hipotalâmicos (DEVANE et al., 1988; LUTZ et al., 2015), e que a sua expressão é regulada por drogas antidepressivas (HILL et al., 2008). Além disso, a administração de fármacos

inibidores da captação ou metabolismo de anandamida, assim como agonistas de receptores CB1, induzem efeito do tipo-antidepressivo em diferentes modelos animais (HILL e GORZALKA, 2005; ADAMCZYK et al., 2008).

Além dos endocanabinóides, componentes não endógenos também são capazes de interferir no sistema endocanabinóide (SCHUBART et al., 2014). É sabido que o CBD, principal constituinte não psicotomimético da *Cannabis sativa*, apresenta amplo espectro de ação farmacológica benéfica em transtornos neuropsiquiátricos, incluindo propriedades do tipo ansiolítica, antipsicótica, neuroprotetora e antidepressiva (CAMPOS et al., 2016; LIGRESTI et al., 2016). Efetivamente, estudos demonstram que o tratamento com CBD é capaz de induzir efeito tipo-antidepressivo e ansiolítico em diferentes modelos animais (EL-ALFY et al., 2010; ZANELATI et al., 2010; LINGE et al., 2016; REUS et al., 2011; SARTIM et al., 2016; SCHIAVON et al., 2016; SHOVAL et al., 2016; FOGAÇA et al., 2018). No entanto, os mecanismos responsáveis por esses efeitos ainda não foram completamente elucidados. O CBD pode inibir processos responsáveis pela inativação de endocanabinóides, tais quais a captação celular de anandamida e seu metabolismo pela FAAH (BISOGNO et al., 2001; DE FILIPPIS et al., 2008), e assim melhorar indiretamente a ação desse endocanabinóide nos receptores CB1 e CB2, além de outros receptores associados ao ECS, como o receptor transiente com potencial vanilóide 1 (TRPV1) (BISOGNO et al., 2001) e TRPV2 (DE PETROCELLIS et al., 2011). Ainda, existem evidências de que o CBD possa agir sobre outros alvos além do ECS, como em receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A}, facilitando assim a neurotransmissão serotoninérgica (MISHIMA et al., 2005; MAGEN et al., 2010; ZANELATI et al., 2010; GOMES et al., 2011). Ademais, diversos estudos têm demonstrado uma íntima relação entre endocanabinóides e outros sistemas envolvidos em diferentes transtornos neuropsiquiátricos, incluindo o sistema adenosinérgico (LERNER et al., 2010; ROSSI et al., 2010).

1.3. Sistema Adenosinérgico

A adenosina é um nucleosídeo endógeno ubíquo constituinte do espaço extra e intracelular, sendo principalmente um produto da desfosforilação do trifosfato, difosfato e monofosfato de adenosina por uma série de ectoenzimas. (HASKO & CRONSTEIN, 2004). Este composto é uma purina que atua como mensageiro celular e regula processos fisiológicos em diversos tecidos, como cérebro, coração, vasos sanguíneos, rins, pulmões e trato gastrointestinal (DUNWIDDIE & MASINO, 2001;

HAYNES et al., 1995; OYARZÚN et al., 2017; COLGAN et al., 2013). Os primeiros efeitos biológicos da adenosina foram estabelecidos em 1929, quando Drury e Szent-Gyorgyi demonstraram que este composto é capaz de causar alterações na frequência cardíaca quando injetado por via endovenosa. No sistema nervoso central (SNC), a adenosina existe em condições basais e é responsável pela modulação da excitabilidade neuronal, neuroplasticidade, podendo regular a atividade de células microgliais e astrócitos (D'ALCANTARA P et al., 2001; ORR et al., 2009). As concentrações extracelulares basais de adenosina no SNC são determinadas pela hidrólise de ATP liberado de neurônios ou astrócitos e pelo transportador equilibrativo de nucleosídeo (como o ENT 1), responsável pela sua recaptação (KING et al., 2006). No entanto, em situações patológicas como isquemia, hipóxia ou danos celulares, sua concentração eleva-se rapidamente. Dessa forma, o sistema adenosinérgico tem sido correlacionado a diferentes condições, como neuroinflamação e epilepsia (BEAMER et al., 2016; BOISON, 2016). Ademais, apresenta um papel importante nas dinâmicas de neurodegeneração e neuroproteção (BURNSTOCK, 2015).

O sistema adenosinérgico é composto por quatro receptores diferentes acoplados a proteínas G (GPCRs): A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Esses receptores são responsáveis por mediar os efeitos fisiológicos da adenosina e são expressos em diferentes células e tecidos em todo o corpo (FREDHOLM et al., 2001). Metilxantinas, como a cafeína, promovem a maioria de seus efeitos biológicos ao antagonizar receptores de adenosina (RIBEIRO & SEBASTIÃO, 2010). Os receptores A₁ e A₃ ativam proteínas do tipo G_{i/o}, reduzindo a atividade da enzima adenilato ciclase (AC) e, consequentemente, a concentração intracelular de AMP cíclico, enquanto os receptores A_{2A} e A_{2B} ativam as proteínas do tipo G_s, estimulando os níveis de AC e aumentando os níveis de AMP cíclico (BOREA et al., 2018). O receptor A₁ é expresso em altos níveis no cérebro, especialmente em terminações nervosas excitatórias, sendo responsável por reduzir a atividade neuronal (CHEN, ELTZSCHIG & FREDHOLM, 2013). Enquanto o mRNA de receptor A₃ tem baixos níveis de expressão em todo o corpo, os órgãos com maior expressão em humanos são fígado e pulmões. No entanto, também foi observado expresso em altos níveis em certas linhagens de células cancerosas (BOREA et al., 2015). O subtipo A_{2A} é amplamente presente e expresso de diferentemente em tecidos cardiovasculares, cérebro, sistema imunológico, pulmões, rins e células endoteliais. No SNC, é altamente expresso no

estriado e, em níveis mais baixos, no córtex cerebral e hipocampo (Al-ATTRAQCHI et al., 2019). Por fim, o receptor A2_B é expresso em diversos tecidos, como cardiovascular, trato intestinal, cérebro, bexiga urinária e sistema imunológico (SUN & HUANG, 2016).

Portanto, considerando o papel da adenosina e seus receptores na regulação de diferentes processos no SNC, a correlação desse mensageiro purinérgico com distúrbios neuropsiquiátricos, como depressão e ansiedade tem sido estudada. Assim como a sua função como um potencial alvo de efeitos terapêuticos (DOMENICI et al., 2019). Os efeitos tipo-antidepressivos resultantes da ativação de receptores A1 foram os primeiros sugeridos (VAN CALKER & BIBER, 2005). Serchov e colaboradores (2015) demonstraram, por exemplo, que camundongos nocautes para o receptor A1 apresentam comportamento do tipo-depressivo. Ainda, a administração de agonista e antagonista de receptores A1 resulta, respectivamente, em efeitos ansiolíticos (FLORIO et al., 1998; JAIN et al., 1995; VINCENZI et al., 2016) e ansiogênicos (FLORIO et al., 1998), enquanto antagonistas não seletivos, como a cafeína, parecem apresentar perfil ansiogênico em altas doses e ansiolítico em doses menores (CHARNEY et al., 1985; KULKARNI et al., 2007; LOPEZ-CRUZ et al., 2014). Além disso, o antagonismo de receptores A1 pela cafeína parece aumentar os níveis de catecolaminas e serotonina no sistema nervoso central, de forma semelhante a antidepressivos convencionais (ACQUAS, et al. 2002; FREDHOLM, 1995). Estes resultados sugerem que o antagonismo desses receptores seria capaz de reverter as alterações monoaminérgicas presentes em transtornos como depressão e ansiedade (EL YACOUBI et al., 2001; DECKERT, 1998; LEDENT et al., 1997; GIMENEZ-LLORT et al., 2002; JOHANSSON et al., 2001).

1.4. Interações Entre os Sistemas Adenosinérgico e Endocanabinóide

Estudos demonstram que os receptores do sistema adenosinérgico são capazes de formar heterômeros com diversos receptores acoplados a proteína G (FERRE et al., 2007; 2010; 2008). A interação de receptores A2_A, D₁ e D₂, componentes do sistema dopaminérgico, é amplamente estudada no contexto de doenças neurodegenerativas (FERRÉ et al., 2018; JORG et al., 2014). Além disso, os receptores A2_A também são capazes de formar heterômeros com diversos receptores acoplados a proteína G incluindo receptores CB1 (TEBANO et al., 2012; CHIODI et al., 2016), sugerindo uma possível interação entre os sistemas adenosinérgico e

endocanabinóide em diversas vias de sinalização intracelulares (FERRE et al, 2010; TEBANO et al., 2012). Ambos os receptores estão altamente expressos no estriado e a interação entre eles influencia o funcionamento dos gânglios da base, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (TEBANO et al., 2012). Dentre os mecanismos propostos para o CBD, a partir de estudos *in vitro*, foi sugerido que seria capaz de inibir o transportador ENT-1, responsável pela captação de adenosina, atuando como um agonista indireto de receptores A2a (CARRIER et al., 2006; LIOU et al., 2008). No entanto, poucos estudos têm explorado o envolvimento da adenosina nos efeitos do CBD em diferentes transtornos neuropsiquiátricos. Este trabalho se propôs a investigar essa possibilidade em camundongos submetidos a modelos animais sensíveis a drogas antidepressivas e ansiolíticas.

2. HIPÓTESE

Os efeitos comportamentais do tipo-antidepressivo e ansiolítico induzidos pela administração sistêmica de canabidiol são mediados pela ativação de receptores adenosinérgicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a hipótese de que os efeitos comportamentais tipo antidepressivo e ansiolítico induzidos pela administração sistêmica de canabidiol poderiam ser mediados pela ativação de receptores adenosinérgicos.

3.2. Objetivos Específicos

-Investigar os efeitos da administração sistêmica dos antagonistas adenosinérgicos não seletivo (caféina) e seletivos (SCH-58261 e CPT) sobre o comportamento de animais submetidos aos testes de campo aberto, nado forçado, labirinto em cruz elevado, suspensão pela cauda e transição claro-escuro. Este primeiro objetivo visou estabelecer as doses inefetivas destes compostos a serem empregadas nos experimentos posteriores

-Investigar os efeitos da administração sistêmica de canabidiol (CBD) sobre o comportamento de animais submetidos aos testes de campo aberto, nado forçado, labirinto em cruz elevado, suspensão pela cauda e transição claro-escuro. Estes

estudos visaram confirmar as doses efetivas de CBD a serem empregadas nos experimentos posteriores

-Investigar os efeitos da administração sistêmica de antagonistas adenosinérgicos (cafeína, SCH-58261 e CPT) previamente ao CBD sobre o comportamento de animais submetidos aos testes de campo aberto, nado forçado, labirinto em cruz elevado, suspensão pela cauda e transição claro-escuro.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos e fêmeas, 8 semanas, provenientes do Biotério Central do Campus da USP-RP. Os animais foram mantidos agrupados (4 camundongos/caixa) em gaiolas de acrílico (600 cm²) no biotério do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, em condições controladas: temperatura (24° + 1°C), luz (12h de luz, com ciclo claro iniciando as 06h00), com livre acesso a água e alimento. Os procedimentos ocorreram de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento sobre os cuidados com animais de laboratório, que estão de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) dispostas na lei Arouca (11.794/08).

4.2. Fármacos

Para o tratamento farmacológico utilizamos as seguintes drogas: 1) Canabidiol (CBD; >99% de pureza, BSPG, Reino Unido), nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, dissolvido em Tween 80 2% / solução de NaCl 0,9% estéril (SALES et al, 2019); 2) Cafeína (1,3,7-trimethylxanthine; Sigma-Aldrich, Poland), uma metilxantina estimulante do sistema nervoso central e antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos, nas doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/kg, dissolvido em solução de NaCl 0,9% estéril (SZOPA et al., 2016); 3) SCH 58261 (7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-pyrimidine; Sigma-Aldrich, Poland), um antagonista seletivo de receptores adenosinérgicos A2a, nas doses de 0,5 e 1 mg/kg, dissolvido em DMSO 10% / solução de NaCl 0,9% estéril (PAGNUSSAT et al., 2015; KOVÁCS et al., 2020); 4) 8-cyclopentyl 1,3 dimethylxanthine (CPT; Sigma-Aldrich, Poland), um antagonista seletivo de receptores adenosinérgicos A1, nas doses de (0.1; 0,5; 1 e 10 mg/kg), dissolvido em Tween 80 1% / solução de NaCl 0,9% estéril (SAUDI et al., 2018; HERBET et al, 2018).

4.3. Procedimentos Experimentais

4.3.1. Teste do Nado Forçado

Os animais foram individualmente colocados em um cilindro de vidro (altura de 25 cm e diâmetro de 17 cm) contendo água até a altura de 20 cm e submetidos a uma sessão de 6 minutos de natação forçada (PORSOLT et al., 1977). Os camundongos foram filmados e o tempo de imobilidade (caracterizado por suaves movimentos necessários para mantê-los respirando sem afundar) avaliado durante os 4 últimos minutos. A água foi trocada para cada animal a fim de manter sua temperatura a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ e prevenir a influência de substâncias de alarme (ABEL e BILITZKE, 1990). No Experimento 4, o protocolo do teste foi alterado, no qual, a fim de reduzir variabilidades no tempo de imobilidade basal entre os animais, cada camundongo foi exposto à uma sessão de pré-teste (natação forçada durante 5 minutos), um dia antes da sessão de teste (com igual duração de 5 minutos) (SARTIM et al., 2021).

4.3.2. Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto ou arena foi utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais (ZANELATI et al., 2010). Um grupo independente de camundongos foi colocado individualmente numa arena circular (diâmetro de 40 cm com paredes transparentes de 50 cm de altura) durante 6 minutos. A atividade exploratória foi filmada e a distância total percorrida pelo animal analisada utilizando o software AnyMaze (version 4.5, Stoelting, Wood Dale-USA). Após cada teste, o local foi limpo com solução de álcool 70%.

4.3.3. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O aparato utilizado é feito de madeira (assoalho e parede dos braços fechados de madeira) e consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), unidos por uma plataforma central comum (5 x 5 cm) e elevado 38,5 cm do solo por um suporte. Cada animal submetido ao LCE foi colocado sobre a plataforma central, com a cabeça voltada para um dos braços abertos podendo explorar o aparato por um período de 5 minutos. Os seguintes parâmetros foram analisados: a porcentagem de entradas e o tempo nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados, utilizando o software AnyMaze (version 4.5, Stoelting, Wood Dale-USA).

4.3.4. Teste de Suspensão pela Cauda

Os camundongos foram colocados em uma plataforma sendo suspensos pela cauda a uma altura elevada do chão (50 cm) utilizando uma fita adesiva colocada a aproximadamente 1 cm da ponta da cauda durante 6 minutos. O tempo total de imobilidade do animal, nos últimos 4 minutos foi mensurado. É proposto que substâncias com atividade antidepressiva diminuem o tempo de imobilidade dos animais neste teste, sem alterar a atividade locomotora (CRYAN et al., 2002).

4.3.5. Teste de Transição Claro-escuro

O aparato é constituído por uma caixa acrílica, dimensões de 45 x 27 x 27 cm, dividida em dois compartimentos, um de cor branca (30 x 27 x 27 cm) e outro de cor preta (15 x 27 x 27 cm), estando a parte branca iluminada com 400 lux. O animal foi colocado no compartimento claro, com a cabeça voltada para a entrada que dá acesso ao compartimento escuro. Os registros foram efetuados durante 5 min após a primeira entrada no lado escuro da caixa. Sendo os parâmetros registrados: a latência para a primeira entrada no lado escuro da caixa, tempo total de permanência no compartimento claro e o número de transições entre eles. Drogas ansiolíticas podem aumentar o número de cruzamentos, assim como o tempo de permanência na parte clara da caixa, além da latência para passagem para o lado escuro (COSTALL et al., 1989).

4.4. Análise Estatística

Os resultados comportamentais de animais submetidos aos testes de campo aberto, nado forçado, labirinto em cruz elevado, suspensão pela cauda e transição claro-escuro foram comparados utilizando o teste de ANOVA uma via seguido do pós-teste de Dunnett. No caso de duas injeções, os resultados foram comparados usando o teste de ANOVA duas vias seguido, caso indicado, pelo pós-teste de Newman-Keuls (fatores: primeira injeção e segunda injeção). As análises estatísticas foram realizadas usando o programa IBM SPSS Statistics 20.0. Diferenças com $P < 0,05$ foram consideradas significativas em todos os casos. Os gráficos foram construídos no programa GraphPad Prism 8.0.

4.5. Delineamento experimental

4.5.1. Parte I: Efeitos da Administração Sistêmica de CBD, SCH e CPT no comportamento de camundongos machos.

Experimento 1: Identificação da dose inefetiva de cafeína em camundongos machos a ser utilizada nos experimentos seguintes.

Testes de Campo Aberto e Nado Forçado: Os animais receberam administração de veículo (10 ml/kg) ou cafeína (2,5, 5, 10 mg/kg) e, trinta minutos depois, foram submetidos ao teste do campo aberto (TCA), onde a distância total percorrida foi registrada. Imediatamente depois, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado (TNF), onde tiveram o tempo de imobilidade registrado.

Testes de Labirinto em Cruz Elevado e Suspensão pela Cauda: Os animais receberam administração de veículo (10 ml/kg), cafeína (2,5, 5, 10 mg/kg) e, trinta minutos depois, foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE), onde o número e tempo de entradas nos braços abertos e fechados foram registrados. Imediatamente após, os animais foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC), onde tiveram o tempo de imobilidade registrado.

Teste de Transição Claro Escuro: Grupos independentes de animais receberam administração de veículo (10 ml/kg) ou cafeína (2,5, 5 e 10 mg/kg) e, 1h depois, foram submetidos ao teste de transição claro escuro (TCE), no qual a latência para a primeira entrada no lado escuro da caixa e o tempo total de permanência no compartimento claro foram registrados.

Experimento 2: Associação da dose inefetiva de cafeína com dose efetiva de canabidiol em camundongos machos.

Teste de Nado Forçado: Os animais receberam administração de veículo (10 ml/kg) ou cafeína (2,5 mg/kg, dose inefetiva determinada no experimento 1) e, dez minutos após, foram submetidos a uma segunda injeção i.p. de CBD (10 mg/kg) ou veículo. Trinta minutos após a última administração, foram submetidos ao teste do nado forçado e o tempo de imobilidade dos animais foi registrado.

Teste de Labirinto em Cruz Elevado: Os animais receberam administração de veículo (10 ml/kg) ou cafeína (5 mg/kg; dose determinada no experimento 1) e, dez minutos após, foram submetidos a uma segunda injeção i.p. de CBD (10 mg/kg) ou veículo. Uma hora após a última administração, foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado e o número e tempo de entradas nos braços abertos e fechados foram registrados.

Experimento 3: Identificação da dose inefetiva de CPT em camundongos machos a ser utilizada nos experimentos seguintes.

Teste do Nado Forçado: Os animais receberam administração de veículo (10 ml/kg) ou CPT (0.1; 0.5; 1 e 10 mg/kg) e, trinta minutos depois, foram submetidos ao teste do nado forçado (TNF) onde tiveram o tempo de imobilidade registrado.

Teste de Suspensão pela Cauda: Os animais receberam administração de veículo (10 ml/kg) ou CPT (1 e 10 mg/kg) e, trinta minutos depois, foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC), onde tiveram o tempo de imobilidade registrado.

Teste de Campo Aberto: Os animais receberam administração de veículo (10 ml/kg) ou CPT (1 e 10 mg/kg) e, trinta minutos depois, foram submetidos ao teste de campo aberto (TCA), onde tiveram a distância total percorrida registrada.

Testes de Labirinto em Cruz Elevado e Transição Claro Escuro: Os animais receberam administração de veículo (10 ml/kg) ou CPT (1 e 10 mg/kg) e, 1h depois, foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado, no qual o número de entradas e o tempo no braço aberto, assim como o número de entradas no braço fechado foram registrados. Imediatamente após, os animais foram submetidos ao teste de transição claro escuro (TCE), no qual a latência para a primeira entrada no lado escuro da caixa e o tempo total de permanência no compartimento claro foram registrados.

Após o período crítico da pandemia, durante o qual a oferta de animais de experimentação foi suspensa, nosso grupo passou a observar uma grande variabilidade na resposta dos animais aos testes comportamentais. Frente a isso, decidimos avaliar algumas modificações nos protocolos experimentais, bem como realizar uma nova curva de dose-resposta ao CBD, detalhadas a seguir.

Experimento 4: Identificação da dose inefetiva de SCH-58261 em camundongos machos a ser utilizada nos experimentos seguintes.

Testes de Campo Aberto e Nado Forçado: Os animais foram pré-expostos a uma sessão de natação forçada de 5 minutos a fim de reduzir variabilidades no tempo de imobilidade basal entre os animais (sessão de pré-teste) um dia antes da sessão de teste. No dia do teste, foi realizada a administração de veículo (10 ml/kg) ou SCH-58261 (0,5, e 1 mg/kg) e, trinta minutos depois, foram submetidos ao teste do campo aberto (TCA) durante 5 minutos, nos quais a distância total percorrida foi registrada. Imediatamente após, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado (TNF) durante 5 minutos, nos quais tiveram o tempo de imobilidade registrado (SARTIM et al., 2021).

Teste de Suspensão Pela Cauda: Os animais receberam administração de veículo (10 ml/kg) ou SCH-58261 (0,5 e 1 mg/kg) e, trinta minutos depois, foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC), onde tiveram o tempo de imobilidade registrado.

Testes de Labirinto em Cruz Elevado e Transição Claro Escuro: Os animais receberam administração de veículo (10 ml/kg) ou SCH-58261 (0,1, 0,5 e 1 mg/kg) e, 1h depois, foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado (LCE), no qual o número de entradas e o tempo no braço aberto, assim como o número de entradas no braço fechado foram registrados. Imediatamente após, os animais foram submetidos ao teste de transição claro escuro (TCE), no qual a latência para a primeira entrada no lado escuro da caixa e o tempo total de permanência no compartimento claro foram registrados.

Experimento 5: Identificação da dose efetiva de CBD em camundongos machos a ser utilizada nos experimentos seguintes.

Testes de Campo Aberto e Nado Forçado: Neste protocolo buscamos identificar a dose de canabidiol a ser utilizada nos experimentos seguintes. Os animais foram pré-expostos a uma sessão de natação forçada de 5 minutos a fim de reduzir variabilidades no tempo de imobilidade basal entre os animais (sessão de pré-teste)

um dia antes da sessão de teste. No dia do teste, foi realizada a administração de veículo (10 ml/kg) ou CBD (10 e 30 mg/kg), 30 ou 60 minutos após, foram submetidos ao teste de campo aberto (TCA) durante 5 minutos, no qual a distância total percorrida foi registrada. Imediatamente após, os animais foram submetidos ao teste de nado forçado (TNF) durante 5 minutos, nos quais tiveram o tempo de imobilidade registrado (SARTIM et al., 2021).

Experimento 6: Identificação da dose efetiva prolongada de CBD em camundongos machos.

Tratamento Prolongado e Teste de Nado Forçado: Neste experimento, foi utilizado um protocolo de tratamento prolongado com o CBD a fim de avaliar o possível efeito do tipo antidepressivo produzido no teste de nado forçado, como já demonstrado na literatura (SALES et al., 2019). No primeiro dia, os animais foram pré-expostos a uma sessão de natação forçada de 5 minutos a fim de reduzir variabilidades no tempo de imobilidade basal entre os animais (sessão de pré-teste). Nos cinco dias seguintes, a cada 24h, foram tratados com CBD durante 5 dias (30mg/kg), veículo durante 4 dias + CBD (30mg/kg) na última injeção ou veículo durante os 5 dias. Por fim, os animais foram submetidos, 1h ou 24h após a última injeção, ao TNF durante 5 minutos.

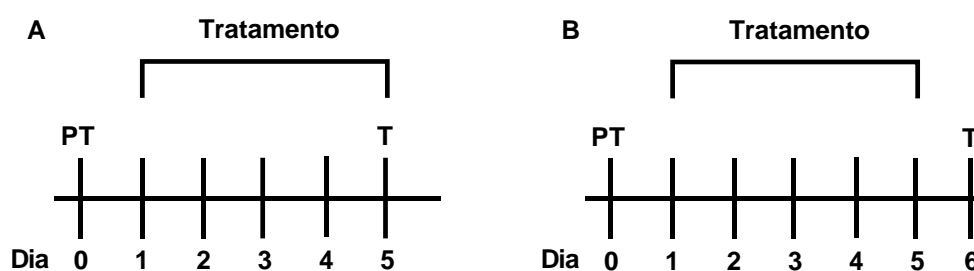


Figura 1. Planejamento Experimental – Tratamento Prolongado com CBD. Animais submetidos ao teste de nado forçado 1h após a última injeção (A). Animais submetidos ao teste de nado forçado 24h após a última injeção (B). Os grupos presentes foram: animais tratados com veículo; animais tratados os primeiros 4 dias com veículo e CBD no dia 5 (veí+CBD); animais tratados durante os 5 dias com CBD. PT: sessão de pré-teste; T= teste de nado forçado.

4.5.2. Parte II: Efeitos da Administração Sistêmica de CBD no comportamento de camundongos fêmeas.

Experimento 7: Identificação da dose efetiva de CBD em camundongos fêmeas a ser utilizada nos experimentos seguintes.

Teste de Labirinto em Cruz Elevado: Os animais receberam administração de veículo (10 ml/kg) ou CBD (5, 10 e 30 mg/kg). Uma hora após, foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado e o número e tempo de entradas nos braços abertos e fechados foram registrados.

Teste de Suspensão Pela Cauda: Os animais receberam administração de veículo (10 ml/kg) ou CBD (5, 10 e 30 mg/kg) e, trinta minutos depois, foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC), onde tiveram o tempo de imobilidade registrado.

Testes de Campo Aberto e Nado Forçado: Os animais receberam administração de veículo (10 ml/kg), imipramina (30 mg/kg) ou CBD (5, 10 e 30 mg/kg) e, trinta minutos depois, foram submetidos ao teste do campo aberto (TCA) onde a distância total percorrida foi registrada. Imediatamente depois, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado (TNF) onde tiveram o tempo de imobilidade registrado.

5. RESULTADOS

Experimento 1: Identificação da dose inefetiva de cafeína a ser utilizada nos experimentos seguintes.

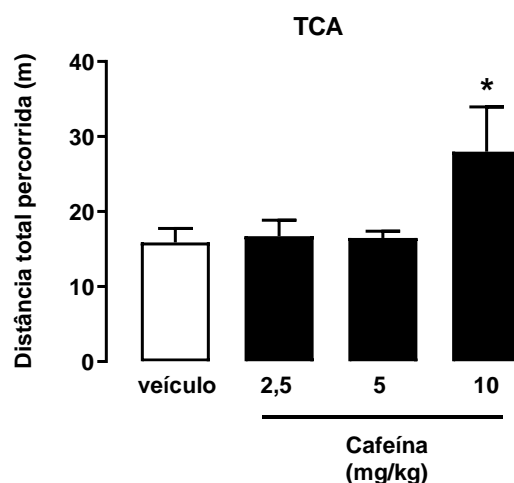


Figura 2. Efeitos comportamentais induzidos pela cafeína na distância total percorrida no TCA. Foram utilizados de 6-8 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA seguida de Dunnet).

No TCA (Figura 2), apenas a distância total percorrida pelos animais do grupo tratado com a maior dose de cafeína (10mg/kg) apresentou diferença estatística entre os demais grupos ($F_{(3, 24)} = 3,046$; $P=0,0482$) pelo teste de ANOVA de uma via. Isso indica que a cafeína, na maior dose utilizada, induziu efeito hiper locomotor.

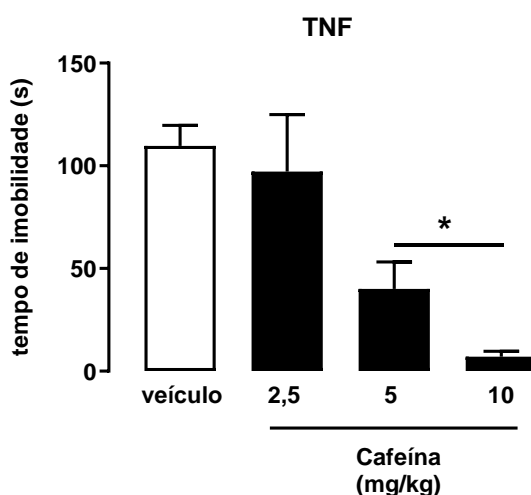
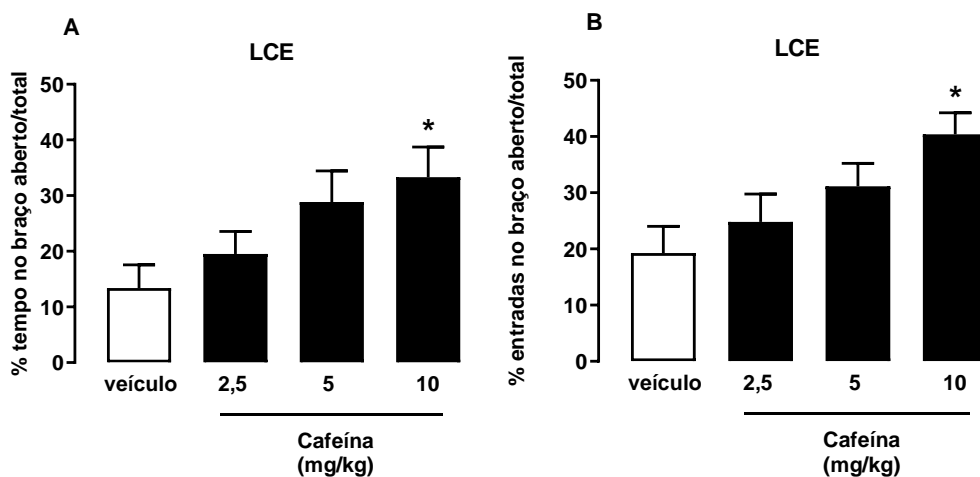


Figura 3. Efeitos comportamentais induzidos pela cafeína no tempo de imobilidade no TNF. Foram utilizados de 6-8 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA seguida de Dunnet).

No TNF (Figura 3), os grupos tratados com as doses de 5 e 10 mg/kg apresentaram diferença estatística em comparação aos demais grupos ($F_{(3, 24)} = 8,888$; $P=0,0004$). Tais resultados indicam efeito do tipo antidepressivo induzido pela cafeína nas doses de 5 e 10 mg/kg.



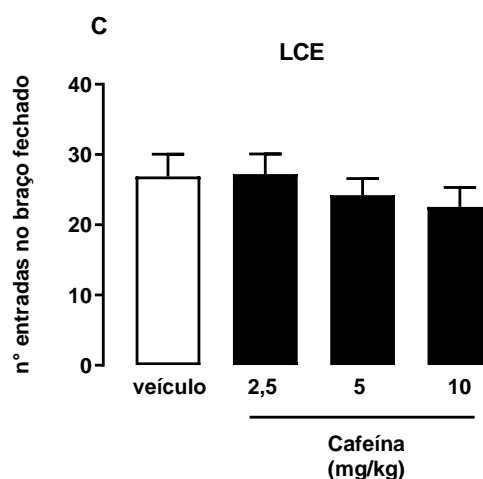


Figura 4. Efeitos comportamentais induzidos pela cafeína na porcentagem de tempo (A) e entradas (B) no braço aberto e número de entradas no braço fechado (C) no LCE. Foram utilizados 9 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA seguida de Dunnet).

No LCE (Figura 4), a porcentagem de tempo e entradas nos braços abertos (4A e 4B) e o número de entradas nos braços fechados (4C) foram avaliados. O grupo tratado com a dose de 10 mg/kg apresentou diferença significativa entre os demais grupos nas porcentagens de tempo ($F_{(3, 32)} = 3,408$; $P=0,0292$) e entradas nos braços abertos ($F_{(3, 32)} = 4,193$; $P=0,0131$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais no número de entradas nos braços fechados ($F_{(3, 32)} = 0,6318$; $P=0,5999$), sugerindo que nas doses empregadas a cafeína não produziu um aumento não específico da atividade exploratória. Ainda, a cafeína na dose de 10 mg/kg produziu efeito do tipo ansiolítico.

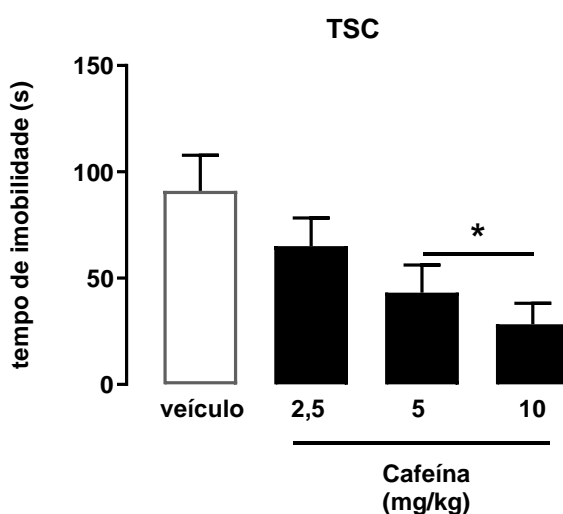


Figura 5. Efeitos comportamentais induzidos pela cafeína no TSC. Foram utilizados 9 animais por grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM. *p < 0,05 em relação ao grupo veículo (ANOVA seguida de Dunnet).

No TSC (Figura 5), os grupos de animais tratados com as doses de 5 e 10 mg/kg de cafeína apresentaram diferenças significativas entre os demais ($F_{(3, 32)} = 4,168$; $P=0,0134$) no tempo de imobilidade pelo teste ANOVA de uma via, o que indica efeito do tipo antidepressivo.

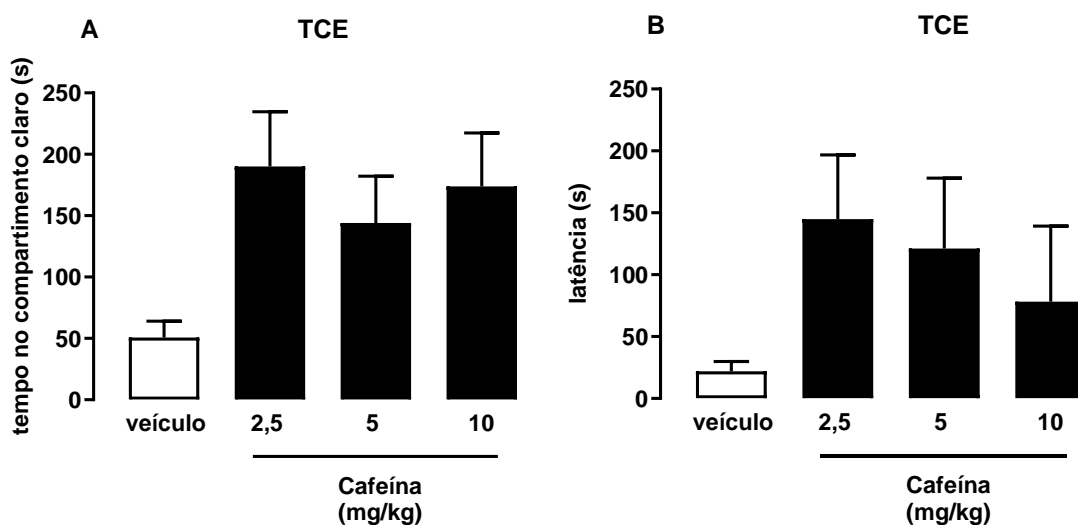


Figura 6. Efeitos comportamentais induzidos pela cafeína no tempo total de permanência no compartimento claro (A) e na latência para a primeira entrada no compartimento escuro (B) no TCE. Foram utilizados de 4-6 animais por grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM.

No TCE (Figura 6), apesar da tendência gráfica, o teste ANOVA de uma via não indicou uma diferença significativa entre os grupos no tempo total de permanência no compartimento claro ($F_{(3, 16)} = 2,122$; $P=0,1376$) e na latência para a primeira entrada no compartimento escuro ($F_{(3, 16)} = 0,9780$; $P=0,4276$).

Experimento 2: Associação da dose inefetiva de cafeína com dose efetiva de canabidiol.

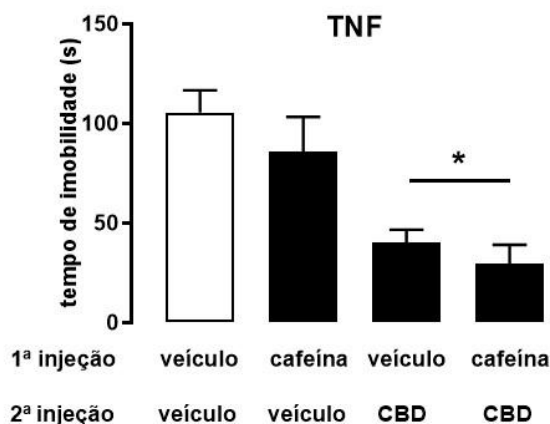


Figura 7. Efeitos comportamentais induzidos pela associação de cafeína (2,5 mg/kg) e CBD (10 mg/kg) no TNF. Foram utilizados de 8-12 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA seguida de Dunnet).

No TNF (Figura 7), ambos os grupos tratados com o CBD (veículo + CBD e cafeína + CBD) apresentaram diferenças significativas entre os demais grupos ($F_{(3, 48)} = 9,317$; $P < 0,0001$). No entanto, não foi possível observar diferenças significativas entre o grupo tratado com veículo + CBD e o grupo tratado com cafeína + CBD. Tais resultados indicam efeito do tipo antidepressivo produzido pelo CBD na dose de 10mg/kg, o qual não foi alterado pela combinação com a cafeína.

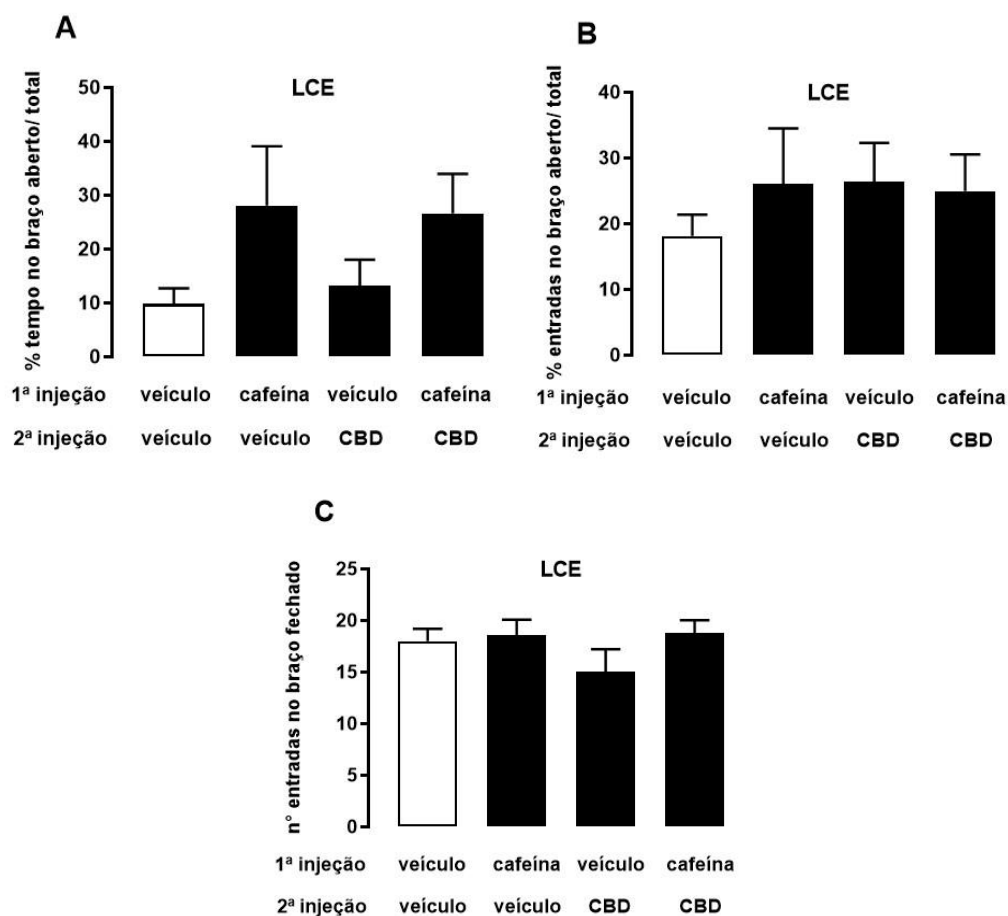


Figura 8. Efeitos comportamentais induzidos pela associação de cafeína (5 mg/kg) e CBD (10 mg/kg) na porcentagem de tempo (A) e entradas (B) no braço aberto e número de entradas no braço fechado (C) no LCE. Foram utilizados de 6-8 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM.

No LCE (Figura 8), não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos na porcentagem de tempo e entradas ($F_{(3, 19)} = 0,5946$; $P=0,6262$) no braço aberto e no número de entradas no braço fechado. Sendo assim, não pudemos observar efeito de nenhum dos tratamentos no LCE.

Experimento 3: Identificação da dose inefetiva de CPT a ser utilizada nos experimentos seguintes.

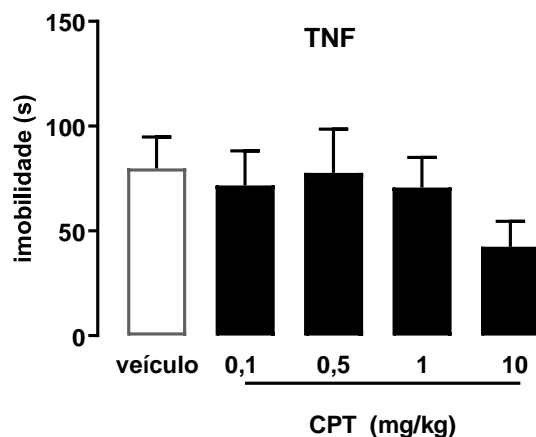


Figura 9. Efeitos comportamentais induzidos pelo CPT no TNF. Foram utilizados de 7-10 animais por grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM.

No TNF (Figura 9), não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos no tempo de imobilidade dos animais ($F_{(4, 38)} = 0,9704$; $P=0,4350$) pelo teste de ANOVA de uma via.

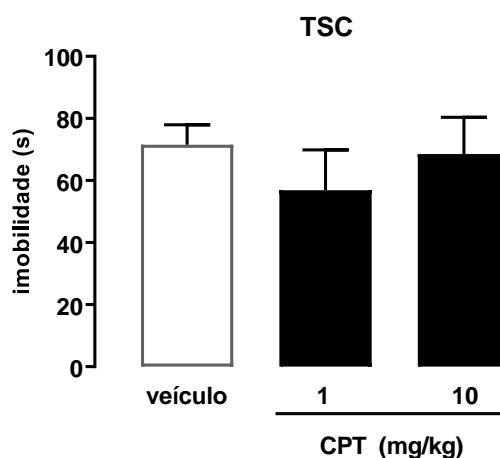


Figura 10. Efeitos comportamentais induzidos pelo CPT no TSC. Foram utilizados 7-8 animais por grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM.

No TSC (Figura 10), o teste de ANOVA de uma via não indicou diferenças significativas entre os grupos no tempo de imobilidade dos animais ($F_{(2, 20)} = 0,4833$; $P=0,6238$).

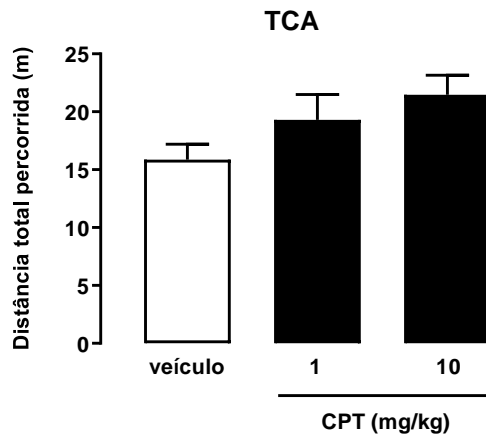


Figura 11. Efeitos comportamentais induzidos pelo CPT no TCA. Foram utilizados 7-8 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM.

No TCA (Figura 11), também não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos tratados na distância total percorrida pelos animais ($F_{(2, 20)} = 2,771$; $P=0,0867$) pelo teste de ANOVA de uma via.

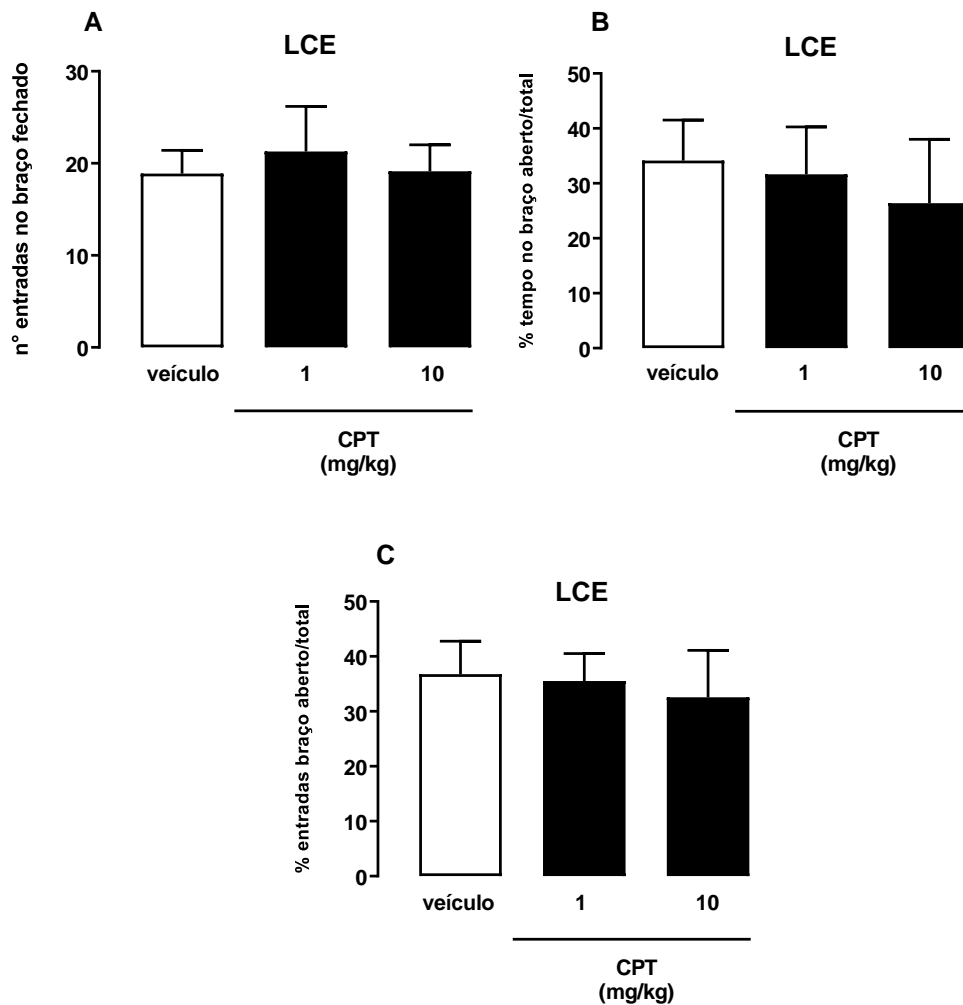


Figura 12. Efeitos comportamentais induzidos pelo CPT no número de entradas no braço fechado (A) e no tempo (B) e número de entradas (C) no braço aberto no LCE. Foram utilizados 7-8 animais por grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM.

No LCE (Figura 12), o número de entradas nos braços fechados (12A) e a porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos (12B e 12C) foram avaliados. Não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos no número de entradas nos braços fechados ($F_{(2, 19)} = 0,1398$; $P=0,8705$), assim como nas porcentagens de tempo ($F_{(2, 19)} = 0,1854$; $P=0,8323$) e entradas nos braços abertos ($F_{(2, 19)} = 0,1052$; $P=0,9007$).

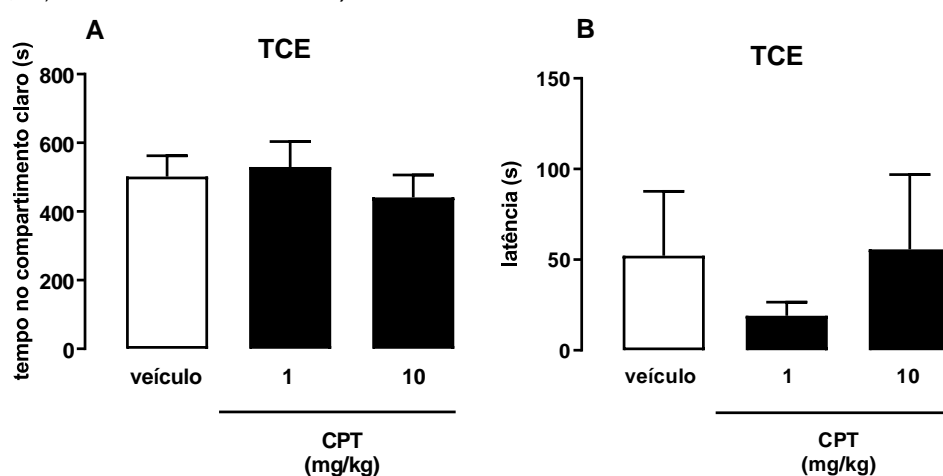


Figura 13. Efeitos comportamentais induzidos pelo CPT no tempo total de permanência no compartimento claro (A) e na latência para a primeira entrada no compartimento escuro (B) no TCE. Foram utilizados de 7-8 animais por grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM

No TCE (Figura 13), não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos no tempo total de permanência no compartimento claro ($F_{(2, 19)} = 0,4500$; $P=0,6443$) e na latência para a primeira entrada no compartimento escuro ($F_{(2, 19)} = 0,3829$; $P=0,6870$).

Experimento 4: Identificação da dose inefetiva de SCH-58261 a ser utilizada nos experimentos seguintes.

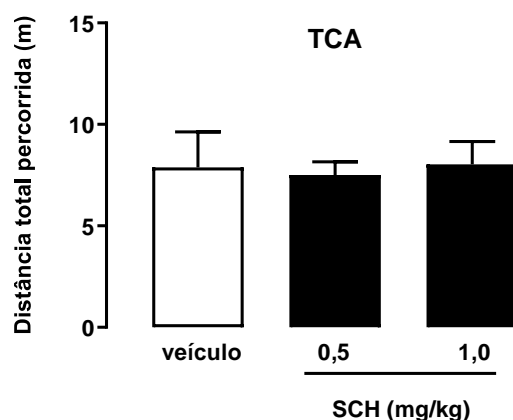


Figura 14. Efeitos comportamentais induzidos pelo SCH-58261 no TCA. Foram utilizados 7-8 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM.

No TCA (Figura 14), não pudemos observar diferenças significativas entre os grupos na distância total percorrida pelos animais ($F_{(2, 22)} = 0,05011$; $P=0,9512$) pelo teste de ANOVA de uma via.

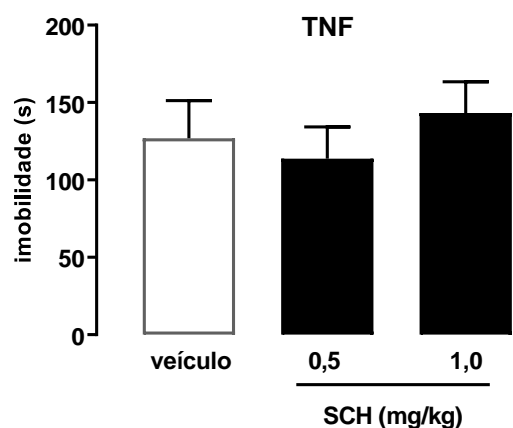


Figura 15. Efeitos comportamentais induzidos pelo SCH-58261 no TNF. Foram utilizados 7-8 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM.

No TNF (Figura 15), também não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos no tempo de imobilidade dos animais ($F_{(2, 22)} = 0,4719$; $P=0,6300$), de acordo com o teste ANOVA de uma via.

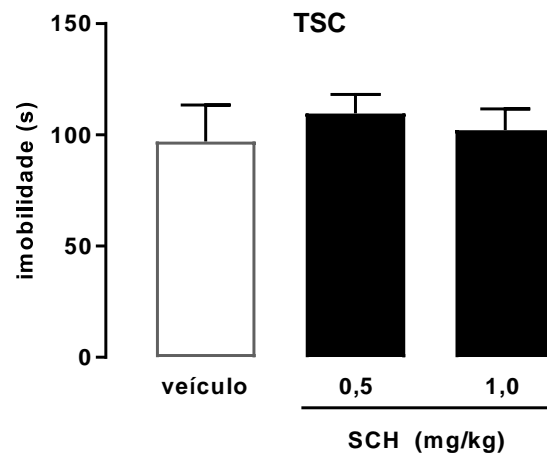


Figura 16. Efeitos comportamentais induzidos pelo SCH-58261 no TSC. Foram utilizados 5-6 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM.

No TSC (Figura 16), o teste de ANOVA de uma via não indicou diferenças significativas entre os grupos no tempo de imobilidade dos animais ($F_{(2, 13)} = 0,3119$; $P=0,7374$).

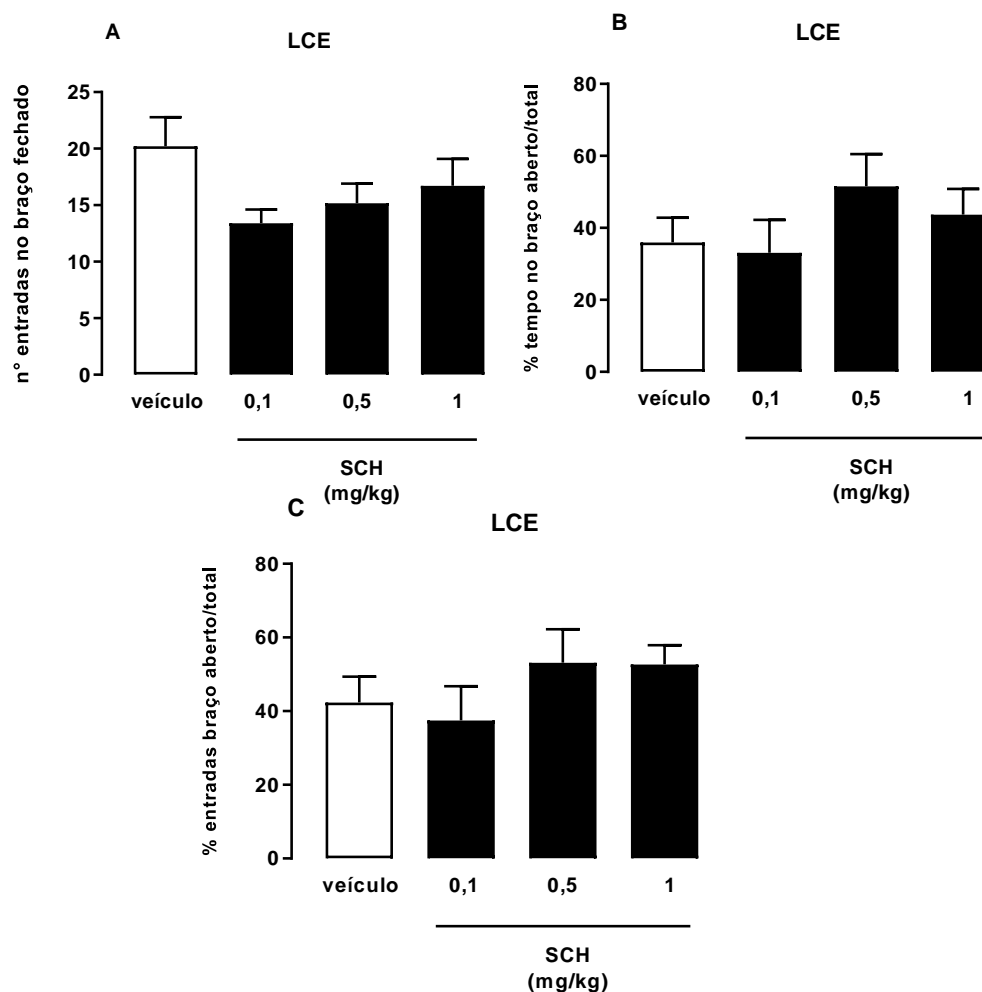


Figura 17. Efeitos comportamentais induzidos pelo SCH no número de entradas no braço fechado (A) e tempo (B) e número de entradas (C) no braço aberto no LCE. Foram utilizados 5-9 animais por grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM.

No LCE (Figura 17), o número de entradas nos braços fechados (17A) e a porcentagem de tempo e entradas nos braços abertos (17B e 17C) foram avaliados. Não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos no número de entradas nos braços fechados ($F_{(3,23)} = 1,646$; $P=0,2064$), assim como nas porcentagens de tempo ($F_{(3, 23)} = 1,006$; $P=0,4080$) e entradas nos braços abertos ($F_{(3, 23)} = 0,9438$; $P=0,4357$).

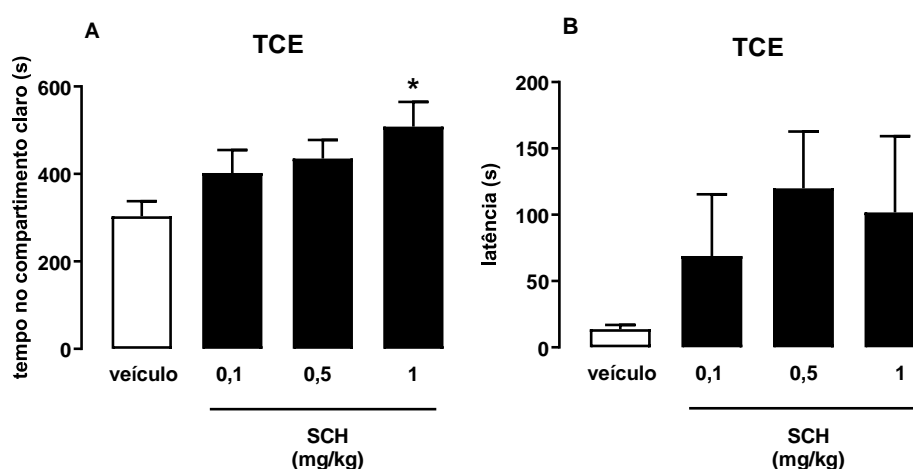


Figura 18. Efeitos comportamentais induzidos pelo SCH no tempo total de permanência no compartimento claro (A) e na latência para a primeira entrada no compartimento escuro (B) no TCE. Foram utilizados de 5-9 animais por grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA seguida de Dunnet).

No TCE (Figura 18), apenas o grupo tratado com a dose de 1,0mg/kg apresentou diferenças significativas ($F_{(3, 21)} = 3,66$; $P=0,0288$) entre os demais no tempo total de permanência no compartimento claro (18A). No entanto, não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos ($F_{(3, 21)} = 1,534$; $P=0,2336$) na latência para a primeira entrada no compartimento escuro (17B). Tal resultado indica efeito ansiolítico do SCH, na dose de 1,0mg/kg, ao aumentar o tempo de permanência no compartimento claro.

Experimento 5: Identificação da dose efetiva de CBD a ser utilizada nos experimentos seguintes.

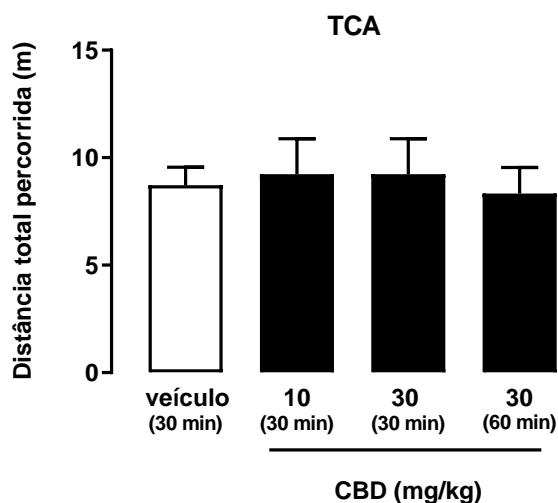


Figura 19. Efeitos comportamentais induzidos pelo CBD no TCA. Foram utilizados 7-8 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM.

Não pudemos observar diferenças significativas, pelo teste de ANOVA de uma via ($F_{(3, 27)} = 0,09371$; $P=0,9629$), na distância total percorrida pelos animais entre os grupos no TCA (Figura 19). Isso indica que o canabidiol não foi capaz de induzir alterações locomotoras.

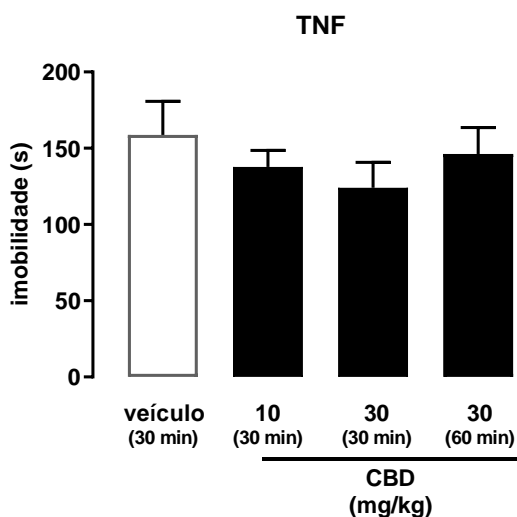


Figura 20. Efeitos comportamentais induzidos pelo CBD no TNF. Foram utilizados 7-8 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM.

Assim como no TCA, também não pudemos observar diferenças significativas entre os grupos no tempo de imobilidade dos animais no TNF (Figura 20), de acordo com o teste de ANOVA de uma via ($F_{(3,27)} = 0,7390$; $P=0,5380$). Tal resultado indica que o CBD não foi capaz de induzir efeito do tipo antidepressivo.

Teste de Nado Forçado

Neste protocolo tentamos padronizar apenas o teste de nado forçado, uma vez que não obtivemos resultado significativo no experimento anterior. Nesse sentido, os animais foram pré-expostos a uma sessão de natação forçada de 5 minutos a fim de reduzir variabilidades no tempo de imobilidade basal entre os animais (sessão de pré-teste) um dia antes da sessão de teste. No dia do teste, foi realizada a administração de veículo (10 ml/kg) ou CBD (10 e 30 mg/kg), e apenas 30 minutos após, foram submetidos ao TNF durante 5 minutos, nos quais tiveram o tempo de imobilidade registrado (SARTIM et al., 2021).

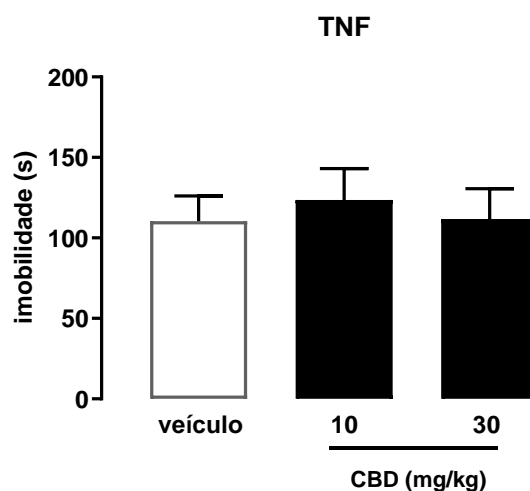


Figura 21. Efeitos comportamentais induzidos pelo CBD no TNF. Foram utilizados 8 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM.

No TNF (Figura 21), novamente não pudemos observar diferenças significativas entre os grupos no tempo de imobilidade dos animais, pelo teste de ANOVA de uma via ($F_{(2,21)} = 0,1619$; $P=0,8516$). Isso também indica que o CBD não foi capaz de produzir efeito do tipo antidepressivo como já descrito na literatura (SALES et al., 2019; SARTIM et al., 2021; ZANELATI et al., 2010).

Experimento 6: Identificação da dose efetiva prolongada de CBD.

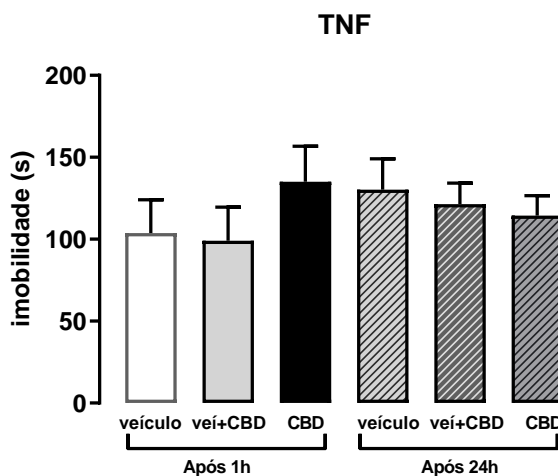


Figura 22. Efeitos comportamentais induzidos pelo tratamento prolongado com CBD no TNF. Foram utilizados 8-9 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM.

No TNF (Figura 22), não pudemos observar diferenças significativas entre nenhum dos grupos no tempo de imobilidade dos animais, de acordo com o teste de ANOVA de uma via ($F_{(5, 44)} = 0,6226$; $P = 0,6832$). Tal resultado indica que o tratamento prolongado de 5 dias com o CBD não foi capaz de induzir efeito do tipo antidepressivo no teste de nado forçado.

Experimento 7: Identificação da dose efetiva de CBD em camundongos fêmeas a ser utilizada nos experimentos seguintes.

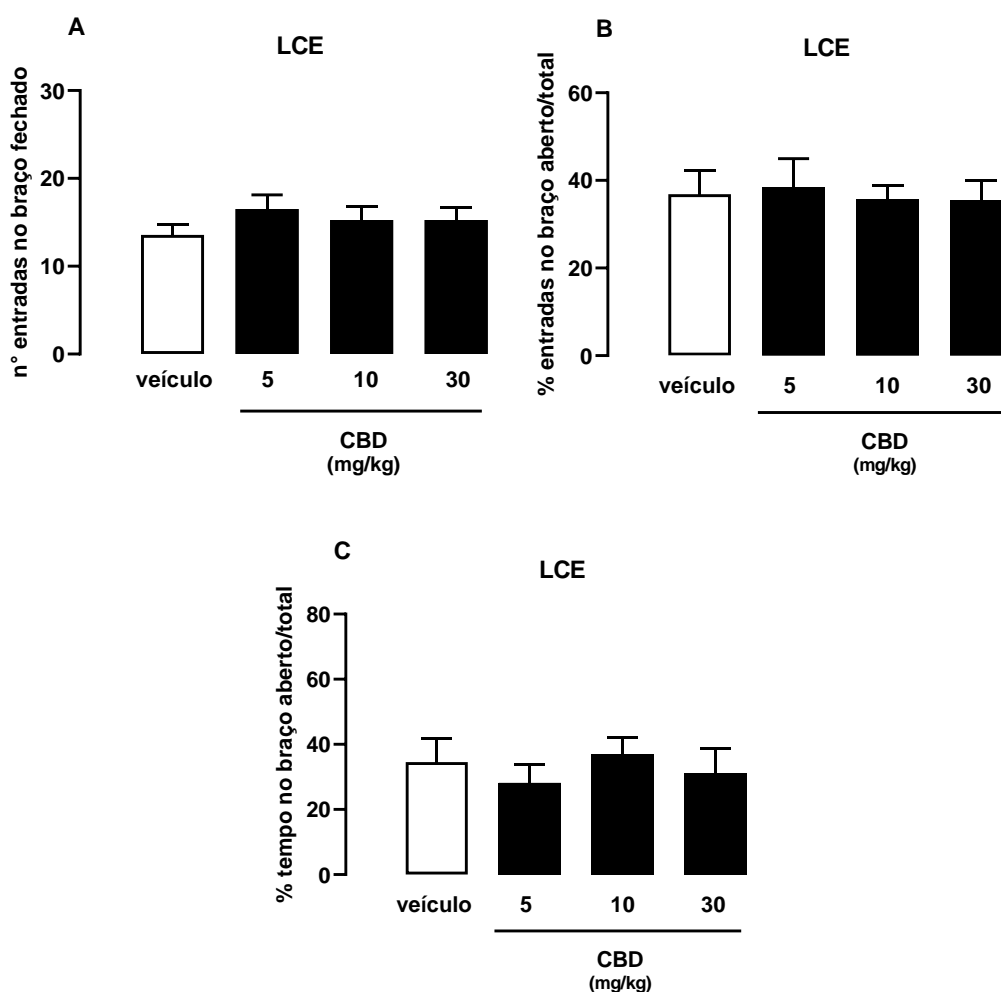


Figura 23. Efeitos comportamentais induzidos pelo CBD no número de entradas no braço fechado (A) e número de entradas (B) e tempo (C) no braço aberto no LCE. Foram utilizados 8-9 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM.

No LCE (Figura 23), o número de entradas nos braços fechados (23A) e a porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos (23B e 23C) foram avaliados. Não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos no número de entradas nos braços fechados ($F_{(3, 29)} = 0,7351$; $P=0,5396$), assim como nas porcentagens de entradas ($F_{(3, 29)} = 0,07434$; $P=0,9733$) e tempo nos braços abertos ($F_{(3, 23)} = 0,3429$; $P=0,7945$).

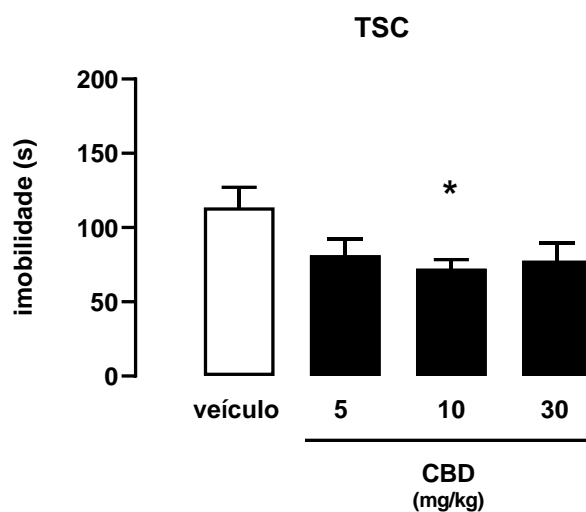


Figura 24. Efeitos comportamentais induzidos pelo CBD no TSC. Foram utilizados 6-8 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA seguida de Dunnet).

No TSC (Figura 24), apenas o grupo tratado com a dose de 10 mg/kg apresentou diferença significativa ($F_{(3, 25)} = 3,033$; $P=0,0479$) entre os demais grupos no tempo de imobilidade dos animais, o que indica efeito do tipo antidepressivo do CBD em tal dose.

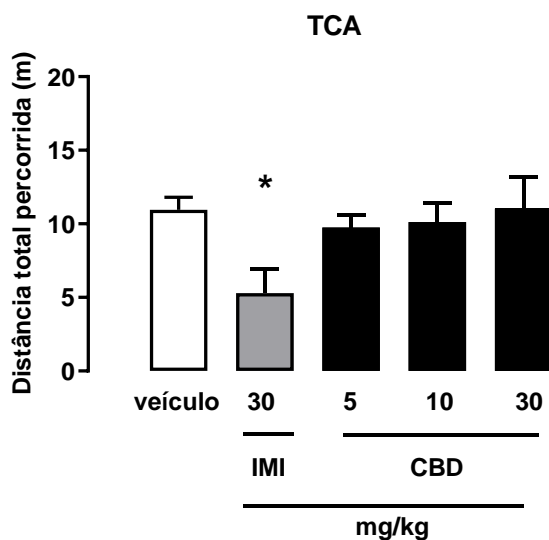


Figura 25. Efeitos comportamentais induzidos pelo CBD e imipramina (IMI) no TCA. Foram utilizados 6-8 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA seguida de Dunnet).

O grupo tratado com imipramina (30 mg/kg) apresentou diferença significativa ($F_{(4, 31)} = 2,730$; $P=0,0468$) entre os demais grupos na distância total percorrida no TCA (Figura 25). Tal resultado demonstra efeito hipolocomotor da imipramina.

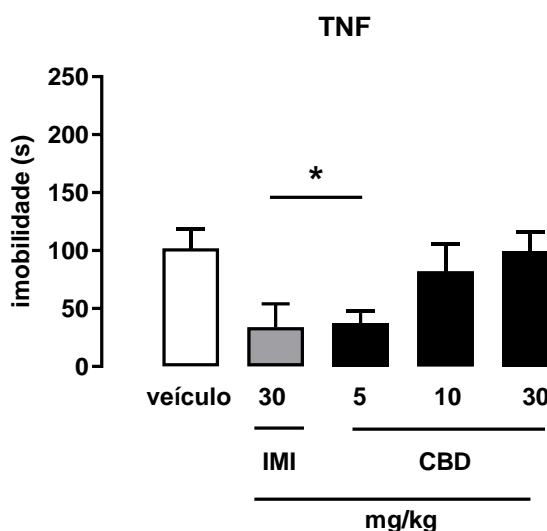


Figura 26. Efeitos comportamentais induzidos pelo CBD e imipramina (IMI) no TNF. Foram utilizados 6-8 animais por grupo. Os dados são representados pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA seguida de Dunnet).

No TNF (Figura 26), apenas os grupos tratados com imipramina (30 mg/kg) e CBD (5 mg/kg) apresentaram diferenças significativas ($F_{(4, 33)} = 3,357$; $P=0,0207$) entre os demais grupos no tempo de imobilidade dos animais, o que indica efeito do tipo antidepressivo produzido pelas drogas.

6. DISCUSSÃO

O CBD é capaz de interferir no sistema endocanabinoide (ECS), no qual encontram-se os seus principais alvos moleculares (SILOTE et al., 2019). No entanto, os mecanismos responsáveis pelos seus efeitos ainda não são completamente elucidados. Nesse sentido, tem sido proposto que o CBD também é capaz de interagir com diversos outros sistemas de neurotransmissão, incluindo o adenosinérgico e seus receptores (CARRIER et al., 2006; PANDOLFO et al., 2011). Além disso, os receptores adenosinérgicos relacionam-se com receptores do ECS, formando heterômeros (ASO et al., 2019), o que indica potenciais interações em diferentes vias intracelulares entre esses sistemas (CHIODI et al., 2016; FERRE et al., 2010;

TEBANO et al., 2012). Dessa forma, considerando dados da literatura que correlacionam a sinalização adenosinérgica em transtornos psiquiátricos como ansiedade e depressão (DOMENICI et al., 2019), as relações entre os sistemas adenosinérgico e endocanabinoide e a suas interações com o canabidiol, buscamos investigar a participação de receptores adenosinérgicos nos efeitos comportamentais induzidos pelo canabidiol em modelos animais de depressão e ansiedade.

Estudos pré-clínicos sugerem que a cafeína apresenta efeito do tipo-antidepressivo em diferentes testes comportamentais, como o teste de Nado Forçado e Suspensão pela Cauda (KALE & ADDEPALLI, 2014; SZOPA et al., 2016). Além disso, estudos clínicos sugerem efeito protetor da cafeína em transtornos depressivos, estando o consumo da mesma associado a menores riscos de desenvolvimento de depressão (GROSSO et al., 2015; WANG et al., 2015). Ainda, em doses moderadas, a cafeína reduz o risco de suicídio (KAWACHI et al., 1996; LUCAS et al., 2013; TANSKANEN et al., 2000), enquanto em doses elevadas relaciona-se com risco aumentado (TANSKANEN et al., 2000). Nossos resultados apresentados indicam que a cafeína, nas doses de 5 e 10 mg/kg, é capaz de induzir efeito tipo-antidepressivo em camundongos machos submetidos aos testes de nado forçado e suspensão pela cauda, o que está de acordo com dados já presentes na literatura. Ademais, também foi possível observar um aumento na distância total percorrida pelos animais tratados com a cafeína na dose de 10mg/kg no teste de campo aberto, o que indica uma possível indução de hiper locomoção, fenômeno também já demonstrado anteriormente (FISIONE et al., 2004; WALDECK, 1975).

Posteriormente, pudemos observar que o CBD, na dose de 10 mg/kg, foi capaz de induzir efeito tipo-antidepressivo no teste de nado forçado, corroborando achados anteriores de nosso grupo (SALES et al., 2019). No entanto, tal efeito não foi alterado pelo pré-tratamento com a cafeína. Como mencionado anteriormente, a cafeína é um antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos com diferentes alvos moleculares (FREDHOLM, 1995), o que dificulta a avaliação do papel desses receptores e a interação com o canabidiol. Portanto, para melhor compreensão, se deu necessária a realização de experimentos com drogas antagonistas mais seletivas (SCH-58261 e CPT).

Os dados presentes na literatura indicam que o antagonismo do receptor adenosinérgico A1 é capaz de produzir efeitos ansiogênicos nos testes de labirinto em cruz elevado, transição claro escuro e campo aberto (PREDIGER et al., 2004; YAMADA et al., 2014). No entanto, nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda, que avaliam o perfil antidepressivo do fármaco, não foi capaz de induzir alterações comportamentais (HERBET et al., 2018; MINOR et al., 2015). Em nossos experimentos não pudemos observar esse efeito ansiogênico do CPT, nas doses testadas, nos testes de labirinto em cruz elevado, transição claro escuro e campo aberto. Além disso, também não observamos alterações comportamentais nos testes de suspensão pela cauda e nado forçado. Sendo assim, determinamos a dose de 10mg/kg como subefetiva e a ser utilizada nas combinações com o canabidiol. Estudos demonstram que o antagonismo de receptores A2A com o SCH-58261 produz efeitos do tipo-antidepressivo nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda ao reduzir o tempo de imobilidade dos animais (EL YACOUBI et al., 2001), o que não pode ser observado em nossos experimentos, nos quais o antagonista não produziu efeitos do tipo-antidepressivo. Em modelos animais de ansiedade, o SCH produziu efeito tipo-ansiolítico na maior dose testada (1.0mg/kg) no teste de transição claro escuro, sem nenhuma alteração significativa em animais submetidos ao labirinto em cruz elevado. Dado já presente na literatura indica que essa droga, nas dosagens testadas, não é capaz de induzir alterações comportamentais nos testes realizados (EL YACOUBI et al., 2000). Dessa forma, pudemos determinar a dose subefetiva de 0.5 mg/kg a ser utilizada nas combinações com o canabidiol.

O desenvolvimento do projeto, infelizmente, foi prejudicado pela atual pandemia de COVID-19. Além da interrupção do fornecimento de animais por um período prolongado, após o seu retorno passamos a ter dificuldades na reprodução de resultados já muito bem estabelecidos na literatura por estudos em diversos laboratórios do Brasil e do exterior (EL-ALFY et al., 2010; LINGE et al., 2016; SALES et al., 2019; SARTIM et al., 2021; ZANELATI et al., 2010). Com isso, como descrito acima, estamos tentando, sem sucesso até o momento, introduzir modificações nos protocolos que aumentem a sensibilidade dos testes para detectar efeitos do CBD como um pré-requisito para testar a hipótese original do projeto.

Além disso, dentre estas alterações, também buscamos avaliar o efeito desse fármaco em camundongos fêmeas. A incidência de transtornos de humor e ansiedade

é muito maior em indivíduos do sexo feminino (ALTEMUS et al., 2014; ASHER et al., 2017; PARKER & BROTHIE, 2010). No entanto, a maioria dos estudos clínicos e pré-clínicos da área desconsidera diferenças entre os gêneros (DALLA et al., 2010; MA et al., 2019). Ademais, estudos sugerem que existem assimetrias terapêuticas na resposta ao tratamento da depressão entre homens e mulheres (MA et al., 2019; SRAMEK & CUTLER, 2011), mas que os mecanismos envolvidos nessas diferenças são pouco compreendidos e estudados, uma vez que estudos pré-clínicos tendem a excluir o uso de fêmeas (BANGASSER & CUARENTA, 2021). Nesse sentido, buscamos avaliar os efeitos do canabidiol e, futuramente, antagonistas adenosinérgicos em camundongos fêmeas. Pudemos observar que o CBD, na dose de 5 mg/kg, foi capaz de induzir efeito tipo-antidepressivo de maneira similar ao induzido pela imipramina, antidepressivo tricíclico amplamente utilizado na clínica, no teste de nado forçado, assim como demonstrado em camundongos machos, corroborando também achados anteriores (SALES et al., 2019; ZANELATI et al., 2010). Além disso, também demonstrou efeito do tipo-antidepressivo, na dose de 10 mg/kg, ao reduzir o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste de suspensão pela cauda, resultado já caracterizado na literatura (EL-ALFY et al., 2010).

7. CONCLUSÃO

Devido às dificuldades apontadas acima, ainda não foi possível concluir a proposta inicial do projeto. Os resultados obtidos até o momento indicam que a cafeína, mas não o SCH e CPT, apresenta efeito do tipo-antidepressivo nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda em camundongos machos. No entanto, não foi capaz de atenuar ou alterar os efeitos comportamentais do tipo-antidepressivo induzidos pelo canabidiol no teste de nado forçado. Além disso, em camundongos machos, o tratamento com SCH resultou em efeito tipo-ansiolítico no teste de transição claro-escuro. Ainda, o tratamento com o canabidiol induz efeito do tipo-antidepressivo nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda também em camundongos fêmeas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, E.L. & BILITZKE, P.J. (1990) A possible alarm substance in the forced swimming test. *Physiology & behavior* 48:233-239.

ACQUAS, E.; TANDA, G.; DI, C.G. (2002) Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naïve and caffeine-pretreated rats. *Neuropsychopharmacology* 27:182 – 193.

ADAMCZYK, P. et al. (2008) Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society* 59:217-228.

AI-ATTRAQCHI, O., ATTIMARAD, M., VENUGOPALA, K. N., NAIR, A., & AL-ATTRAQCHI, N. (2019). Adenosine A2A Receptor as a Potential Drug Target - Current Status and Future Perspectives. *Current pharmaceutical design*, 25(25), 2716–2740.

ALTEMUS, M., SARVAIYA, N., & NEILL EPPERSON, C. (2014). Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. *Frontiers in neuroendocrinology*, 35(3), 320–330.

ASHER, M., ASNAANI, A., & ADERKA, I. M. (2017). Gender differences in social anxiety disorder: A review. *Clinical psychology review*, 56, 1–12.

ASO, E., FERNÁNDEZ-DUEÑAS, V., LÓPEZ-CANO, M., TAURA, J., WATANABE, M., FERRER, I., ... CIRUELA, F. (2019). Adenosine A2A-Cannabinoid CB1 Receptor Heteromers in the Hippocampus: Cannabidiol Blunts Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-Induced Cognitive Impairment. *Molecular Neurobiology*.

ATWOOD, B. K., STRAIKER, A., & MACKIE, K. (2012). CB2: Therapeutic target-in-waiting. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 38(1), 16–20.

BANGASSER, D. A., & CUARENTA, A. (2021). Sex differences in anxiety and depression: circuits and mechanisms. *Nature reviews. Neuroscience*, 22(11), 674–684.

BEAMER, E. et al. (2016) Purinergic mechanisms in neuroinflammation: Na update from molecules to behavior. *Neuropharmacology* 104:94-104.

BISOGNO, T. et al. (2001) Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British journal of pharmacology* 134:845-852.

BOISON, D. (2016) Adenosinergic signaling in epilepsy. *Neuropharmacology* 104:131-9.

BOREA, P. A., GESSI, S., MERIGHI, S., VICENZI, F., & VARANI, K. (2018). Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiological Reviews*, 98(3), 1591–1625.

BOREA, P. A., VARANI, K., VINCENZI, F., BARALDI, P. G., TABRIZI, M. A., MERIGHI, S., & GESSI, S. (2015). The A3 adenosine receptor: history and perspectives. *Pharmacological reviews*, 67(1), 74–102.

BURNSTOCK, G. (2015) Purinergic signaling in neurodegeneration. *Neural Regen Res* 10(12):1919.

CAMPOS, A.C. et al. (2016) Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Res* 112: 119-127.

CARRIER, E.J., AUCHAMPACH, J.A., HILLARD, C.J. (2006) Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 7895–7900. 10.1073/pnas.0511232103.

CESKOVA, E., & SILHAN, P. (2018). Novel treatment options in depression and psychosis. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, Volume 14, 741–747.

CIPRIANI, A., FURUKAWA, T. A., SALANTI, G., CHAIMANI, A., ATKINSON, L. Z., OGAWA, Y., ... GEDDES, J. R. (2018). Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet*, 391(10128), 1357–1366.

CHARNEY, D.S.; HENINGER, G.R.; JATLOW, P.I. (1985) Increased anxiogenic effects of caffeine in panic disorders. *Arch Gen Psychiatry* 42(3):233-43.

CHEN, J.-F., ELTZSCHIG, H. K., & FREDHOLM, B. B. (2013). Adenosine receptors as drug targets — what are the challenges? *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(4), 265–286.

CHIODI, V. et al. (2016) Striatal adenosine-cannabinoid receptor interactions in rats overexpressing adenosine A2A receptors. *J Neurochem* 136(5):907-17.

COLGAN, S. et al. (2013) Adenosine and gastrointestinal inflammation. *J Mol Med (Berl)* 91(2):157–164.

COSTALL, B. et al. (1989) Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 32(3):777-85.

CRYAN, J.F. et al.; MARKOU, A.; LUCKI, I. (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23(5):238-45.

DALLA, C., PITYCHOUTIS, P. M., KOKRAS, N., & PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. (2010). Sex Differences in Animal Models of Depression and Antidepressant Response. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 106(3), 226–233.

DE FILIPPIS, D. et al. (2008) Effect of cannabidiol on sepsis-induced motility disturbances in mice: involvement of CB receptors and fatty acid amide hydrolase. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 20:919-927.

DE PETROCELLIS, L. et al. (2011) Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *British journal of pharmacology* 163:1479-1494.

DECKERT, J. (1998) The adenosine A(2A) receptor knockout mouse: a model for anxiety? *Int J Neuropsychopharmacology* 1(2):187-190.

DEMARTINI, J., PATEL, G., & FANCHER, T. L. (2019). Generalized Anxiety Disorder. *Annals of Internal Medicine*, 170(7), ITC49.

DEVANE, W.A. et al. (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology* 34:605-613.

DOMENICI, M. R. et al. (2019) Adenosine A2A receptor as potential therapeutic target in neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Res.* 2019 Sep; 147:104338.

DRURY, A. N. & SZENT-GYORGYI, A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68(3):213-237

DUNWIDDIE, T.V. & MASINO, S.A. (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31 – 55

EL YACOUBI, M. et al. (2001) Adenosine A 2A receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A2A receptor knockout mice. *Br J Pharmacol* 134:68 – 77.

D'ALCANTARA P., LEDENT C., SWILLENS S. and SCHIFFMANN S. N. (2001) Inactivation of adenosine A2A receptors impairs long term potentiation in the accumbens nucleus without altering basal synaptic transmission. *Neuroscience* 107, 455–464.

EL-ALFY, A.T. et al. (2010) Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from Cannabis sativa L. *Pharmacol Biochem Behav* 95: 434-442.

EL YACOUBI, M., COSTENTIN, J., & VAUGEOIS, J. M. (2003). Adenosine A2A receptors and depression. *Neurology*, 61(11 Suppl 6), S82–S87.

EL YACOUBI, M., LEDENT, C., PARMENTIER, M., BERTORELLI, R., ONGINI, E., COSTENTIN, J., et al. (2001). Adenosine A2A receptor antagonists are potential antidepressants: Evidence based on pharmacology and A2A receptor knockout mice. *British Journal of Pharmacology*, 134(1), 68–77

EL YACOUBI, M., LEDENT, C., PARMENTIER, M., COSTENTIN, J., & VAUGEOIS, J.-M. (2000). The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A2A adenosine receptor antagonists. *Psychopharmacology*, 148(2), 153–163.

EVANS-LACKO, S., AGUILAR-GAXIOLA, S., AL-HAMZAWI, A., ALONSO, J., BENJET, C., BRUFFAERTS, R., ... THORNICROFT, G. (2017). Socio-economic variations in the mental health treatment gap for people with anxiety, mood, and substance use disorders: results from the WHO World Mental Health (WMH) surveys. *Psychological Medicine*, 48(09), 1560–1571.

FERRÉ, S., BONAVENTURA, J., ZHU, W., HATCHER-SOLIS, C., TAURA, J., QUIROZ, C., CAI, N. S., MORENO, E., CASADÓ-ANGUERA, V., KRAVITZ, A. V., THOMPSON, K. R., TOMASI, D. G., NAVARRO, G., CORDOMÍ, A., PARDO, L., LLUÍS, C., DESSAUER, C. W., VOLKOW, N. D., CASADÓ, V., CIRUELA, F., ... ZWILLING, D. (2018). Essential Control of the Function of the Striatopallidal Neuron by Pre-coupled Complexes of Adenosine A2A-Dopamine D2 Receptor Heterotetramers and Adenylyl Cyclase. *Frontiers in pharmacology*, 9, 243.

FERRÉ, S. et al (2007). Adenosine Receptor Heteromers and their Integrative Role in Striatal Function. *The Scientific World JOURNAL*, 7, 74–85.

FERRÉ, S. et al (2008). Adenosine A1-A2A receptor heteromers: new targets for caffeine in the brain. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 13, 2391–2399.

FERRÉ, S. et al (2010) G protein-coupled receptor heteromers as new target for drug development. *Prog Mol Biol Transl Sci* 91:41-52.

FISONE, G.; BORGKVIST, A.; USIELLO, A. (2004) Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Mol Life Sci* 61(7-8):857-72.

FLORIO, C. et al. (1998) Adenosine A1 receptors modulate anxiety in CD1 mice. *Psychopharmacology* 136(4):311-9.

FOGAÇA, M.V. et al. (2018) The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: Role of neurogenesis and dendritic remodeling. *Neuropharmacology* 135:22-33.

FREDHOLM, B.B. (1995) Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacol Toxicol* 76:93 – 101

FREDHOLM, B.B. (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53 527–552

FREDHOLM, B.B. (2005) Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drug *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:385-412.

GARAY, R. P., ZARATE, C. A., CHARPEAUD, T., CITROME, L., CORRELL, C. U., HAMEG, A., & LLORCA, P.-M. (2017). Investigational drugs in recent clinical trials for treatment-resistant depression. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 17(6), 593–609.

GIMÉNEZ-LLORT, L. et al. (2002) Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur J Neurosci* 16(3):547-50.

GOMES, F.V.; RESSEL, L.B.; GUIMARAES, F.S. (2011) The anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis are mediated by 5-HT1A receptors. *Psychopharmacology* 213:465-473.

GROSSO, G., MICEK, A., CASTELLANO, S., PAJAK, A., & GALVANO, F. (2015). Coffee, tea, caffeine and risk of depression: A systematic review and dose-response meta-analysis of observational studies. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(1), 223–234.

HARMER, C. J., DUMAN, R. S., & COWEN, P. J. (2017). How do antidepressants work? New perspectives for refining future treatment approaches. *The Lancet Psychiatry*, 4(5), 409–418.

HASKO, G. CRONSTEIN, BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*. 2004;25(1):33–39

HAYNES JR, J. et al. (1995) Adenosine-induced vasodilation: receptor characterization in pulmonary circulation. *Am. J. Physiol.* 268 (Heart Circ. Physiol. 37):1862-1868

HERBERT, M. et al. (2018) 8-Cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine enhances effectiveness of antidepressant in behavioral tests and modulates redox balance in the cerebral cortex of mice. *Saudi Pharm J* 26(5):694-702

HILL, M.N. et al. (2008) Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment. *Journal of neurochemistry* 106:2322-2336.

HILL, M.N. & GORZALKA, B.B. (2005) Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? *Behavioural pharmacology* 16:333-352.

HOWLETT, A. C., & ABOOD, M. E. (2017). CB 1 and CB 2 Receptor Pharmacology. *Advances in Pharmacology*, 169–206.

JAIN, N. et al. (1995) Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. *Br J Pharmacol* 116(3):2127-33.

JOHANSSON, B. et al. (2001) Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(16):9407-12.

JORG, M., SCAMMELLS, P. J., & CAPUANO, B. (2014). The dopamine D2 and adenosine A2A receptors: past, present and future trends for the treatment of Parkinson's disease. *Current medicinal chemistry*, 21(27), 3188–3210.

KALE, P. P., & ADDEPALLI, V. (2014) Augmentation of antidepressant effects of duloxetine and bupropion by caffeine in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124, 238–244.

KAWACHI, I., WILLETT, W. C., COLDITZ, G. A., STAMPFER, M. J., & SPEIZER, F. E. (1996). A prospective study of coffee drinking and suicide in women. *Archives of internal medicine*, 156(5), 521–525.

KING, A.E. et al. (2006) Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* 27(8):416-25.

KULKARNI, S. K., SINGH, K., & BISHNOI, M. (2007). Involvement of adenosinergic receptors in anxiety related behaviours. *Indian journal of experimental biology*, 45(5), 439–443.

LEDENT, C. et al. (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 388(6643):674-8.

LERNER, T.N. et al. (2010). Endocannabinoid signaling mediates psychomotor activation by adenosine A2A antagonists. *J Neurosci* 30: 2160–2164.

LIGRESTI, A.; DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V. (2016) From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiol Rev* 96: 1593- 1659.

LINGE, R. et al. (2016) Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT1A receptors. *Neuropharmacology* 103: 16-26.

LIU, G.I. et al. (2008) Mediation of cannabidiol anti-inflammation in the retina by equilibrative nucleoside transporter and A2A adenosine receptor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 5526–5531 [10.1167/iovs.08-2196](https://doi.org/10.1167/iovs.08-2196).

LÓPEZ-CRUZ, L. et al. (2014) Differences between the nonselective adenosine receptor antagonists caffeine and theophylline in motor and mood effects: studies using medium to high doses in animal models. *Behav Brain Res* 270:213-22.

LUCAS, M., O'REILLY, E. J., PAN, A., MIRZAEI, F., WILLETT, W. C., OKEREKE, O. I., & ASCHERIO, A. (2013). Coffee, caffeine, and risk of completed suicide: Results from three prospective cohorts of American adults. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 15(5), 377–386.

LUSARDI, T.A. (2009) Adenosine neuromodulation and traumatic brain injury. *Curr Neuropharmacol* 7(3):228-37.

LUTZ, B., et al. (2015). The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety, and stress. *Nat Rev Neurosci.*;16:705–18.

MA, L., XU, Y., WANG, G., & LI, R. (2019). What do we know about sex differences in depression: a review of animal models and potential mechanisms. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 89, 48–56.

MAGEN, I. et al. (2010) Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT_{1A} receptor activation. *British journal of pharmacology* 159:950-957.

MASLEJ, M. M., FURUKAWA, T. A., CIPRIANI, A., ANDREWS, P. W., & MULSANT, B. H. (2020). Individual Differences in Response to Antidepressants. *JAMA Psychiatry*, 77(6), 607.

MISHIMA, K. et al. (2005) Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-dependent mechanism. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 36:1077-1082.

MUBAGWA, K. & FLAMENG, W. (2001) Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res* 52(1):25-39

ORR, A. G.; ORR, A. L.; Li, X. J.; GROSS, R. E.; TRAYNELIS, S. F. (2009) Adenosine A_{2A} receptor mediates microglial process retraction. *Nat. Neurosci.* 12, 872–878.

OYARZÚN, C. et al. (2017) Adenosine contribution to normal renal physiology and chronic kidney disease. *Molecular Aspects of Medicine* 55:75-89

PANDOLFO, P., SILVEIRINHA, V., DOS SANTOS-RODRIGUES, A., VENANCE, L., LEDENT, C., TAKAHASHI, R. N., CUNHA, R. A., & KÖFALVI, A. (2011) Cannabinoids inhibit the synaptic uptake of adenosine and dopamine in the rat and mouse striatum. *European journal of pharmacology*, 655(1-3), 38–45.

PARKER, G., & BROTHIE, H. (2010). Gender differences in depression. *International review of psychiatry* (Abingdon, England), 22(5), 429–436.

PIOMELLI, D. (2013). Endocannabinoids. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 194–196.

PERTWEE, R. G., HOWLETT, A. C., ABOOD, M. E., ALEXANDER, S. P. H., DI MARZO, V., ELPHICK, M. R., ... ROSS, R. A. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacological Reviews*, 62(4), 588–631.

PREDIGER, S., BATISTA, C., & TAKAHASHI, N. (2004). Adenosine A₁ receptors modulate the anxiolytic-like effect of ethanol in the elevated plus-maze in mice. *European Journal of Pharmacology*, 499(1-2), 147–154.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 229:327-336.

REUS, G.Z. et al. (2011) Administration of cannabidiol and imipramine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases brain-derived neurotrophic factor levels in the rat amygdala. *Acta Neuropsychiatr* 23: 241-248.

RIBEIRO, J. A., & SEBASTIÃO, A. M. (2010). Caffeine and adenosine. *Journal of Alzheimer's disease. JAD*, 20 Suppl 1, S3–S15.

ROSSI, S. et al. (2010) Effects of caffeine on striatal neurotransmission: focus on cannabinoid CB1 receptors. *Mol Nutr Food Res* 54(4):525-31.

SALES, A.J., et al. (2019) Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex. *Mol Neurobiol*. 56(2):1070-1081.

SARTIM, A.G., et al. (2021). Co-administration of cannabidiol and ketamine induces antidepressant-like effects devoid of hyperlocomotor side-effects. *Neuropharmacology*, 195, 108679.

SARTIM, A.G.; GUIMARAES, F.S.; JOCA, S.R. (2016) Antidepressant-like effect of cannabidiol injection into the ventral medial prefrontal cortex-Possible involvement of 5-HT_{1A} and CB1 receptors. *Behav Brain Res* 303: 218-227.

SCHIAVON, A.P. et al. (2016) Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 64: 27-34.

SCHUBART, C. D., SOMMER, I. E. C., FUSAR-POLI, P., DE WITTE, L., KAHN, R. S., & BOKS, M. P. M. (2014). Cannabidiol as a potential treatment for psychosis. *European Neuropsychopharmacology*, 24(1), 51–64.

SERCHOV, T. et al. (2015) Increased signaling via adenosine A1 receptors, sleep deprivation, imipramine, and ketamine inhibit depressive-like behavior via induction of Homer1a. *Neuron* 5;87(3):549-62.

SILOTE, G.P., et al. (2019) Emerging evidence for the antidepressant effect of cannabidiol and the underlying molecular mechanisms. *Journal of chemical neuroanatomy*, 98, 104–116.

SHOVAL, G. et al. (2016) Prohedonic Effect of Cannabidiol in a Rat Model of Depression. *Neuropsychobiology* 73: 123-129.

SRAMEK, J. J., & CUTLER, N. R. (2011). The impact of gender on antidepressants. *Current topics in behavioral neurosciences*, 8, 231–249.

SUN, Y., & HUANG, P. (2016). Adenosine A2B Receptor: From Cell Biology to Human Diseases. *Frontiers in chemistry*, 4, 37.

SZOPA, A. et al. (2016) Caffeine enhances the antidepressant-like activity of common antidepressant drugs in the forced swim test in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2016) 389:211 – 221.

TANSKANEN, A., TUOMILEHTO, J., VIINAMÄKI, H., VARTIAINEN, E., LEHTONEN, J., & PUSKA, P. (2000). Heavy coffee drinking and the risk of suicide. *European Journal of Epidemiology*, 16(9), 789–791.

TEBANO, M.T., MARTIRE, A., POPOLI, P. (2012) Adenosine A(2^a)-cannabinoid CB(1) receptor interaction: an integrative mechanism in striatal glutamatergic neurotransmission. *Brain research*, 1476, 108–118.

UEDA, N. et al (2011) Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *BioFactors* 37:1-7.

VALLON, V.; MÜHLBAUER, B.; OSSWALD, H. (2006) Adenosine and kidney function. *Physiol Rev* 86(3):901-40.

VAN CALKER, D. & BIBER, K. (2005) The role of glial adenosine receptors in neural resilience and the neurobiology of mood disorders. *Neurochem Res* 30(10):1205-17.

VINCENZI, F. et al. (2016) Positive allosteric modulation of A1 adenosine receptors as a novel and promising therapeutic strategy for anxiety. *Neuropharmacology* 111:283-292.

WALDECK, B. (1975) Effect of caffeine on locomotor activity and central catecholamine mechanisms: a study with special reference to drug interaction. *Acta pharmacologica et toxicologica*, 36(Suppl 4), 1–23.

WANG, L., SHEN, X., WU, Y., & ZHANG, D. (2015). Coffee and caffeine consumption and depression: A meta-analysis of observational studies. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*, 50(3), 228–242.

YAMADA, K., KOBAYASHI, M., & KANDA, T. (2014). Involvement of Adenosine A2A Receptors in Depression and Anxiety. *Adenosine Receptors in Neurology and Psychiatry*, 373–393.

ZANELATI, T.V. et al. (2010) Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. *British journal of pharmacology* 159:122-128.