

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JÚLIA OLIVEIRA BILIBIO

Efeito do Canabidiol sobre as consequências da exposição ao isolamento social prolongado em camundongos fêmeas em diferentes idades: possível envolvimento da via do inflamassoma de NLRP3

Ribeirão Preto
2024

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JÚLIA OLIVEIRA BILIBIO

Efeito do Canabidiol sobre as consequências da exposição ao isolamento social prolongado em camundongos fêmeas em diferentes idades: possível envolvimento da via do inflamassoma de NLRP3

Versão original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Dra. Sabrina F. S. Lisboa.

Ribeirão Preto
2024

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

Bilibio, Júlia Oliveira.

Efeito do Canabidiol sobre as consequências da exposição ao isolamento social prolongado em camundongos fêmeas em diferentes idades: possível envolvimento da via do inflamassoma de NLRP3 / Júlia Oliveira Bilibio; orientadora: Sabrina Francesca de Souza Lisboa. Ribeirão Preto, 2024.

119 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Versão original

1. Estresse. 2. Adolescência. 3. Ansiedade. 4. Depressão. 5. Canabinoides.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BILIBIO, Júlia Oliveira.

Título: Efeito do Canabidiol sobre as consequências da exposição ao isolamento social prolongado em camundongos fêmeas em diferentes idades: possível envolvimento da via do inflamassoma de NLRP3.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.:

Instituição:

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.:

Instituição:

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profa. Dra.: Sabrina Francesca de Souza Lisboa

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP - USP)

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Ao Matheus, meu companheiro de vida,
por me mostrar, todos os dias,
o quanto ela é maravilhosa.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora, por me trazerem até aqui, e me sustentarem em cada passo do caminho. Obrigada por todas as bênçãos e dons concedidos, na forma de pessoas, lugares e momentos.

Ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia, por todas as oportunidades e auxílio.

À minha orientadora, Sabrina Lisboa, pela sua dedicação e esforço imensos. Obrigada por confiar na minha capacidade, por ser sempre compreensiva e me ajudar a ver o lado positivo das coisas.

Ao apoio técnico de Miriam e Flávia, muito obrigada pela disposição, apoio e dedicação para comigo durante esses anos.

Aos secretários do Departamento de Farmacologia - Ramón e Gislaine - pela eficiência, dedicação, paciência e atenção com que sempre me auxiliaram.

Aos membros do laboratório da Prof. Sâmia - Pedro, Gabriela, Kennia e Luana - por todo apoio e companheirismo.

A todos os colegas do NPPLab, Ana Paula, Antônio, Isabela, Bruna, Erika, Izabela, Anísia, Mylena, Arlindo, Laura, Fábio, Yurie, Arthur e Sávio. Obrigada por todo auxílio nos testes e técnicas realizados neste trabalho, e pelos momentos de descontração em meio à rotina corrida.

À Mariana Fronza, por toda ajuda tanto teórica quanto prática na realização deste trabalho. Gratidão pelos ensinamentos, conselhos, correções e risadas.

À Letícia Vieira, por tornar minha vida no laboratório tão mais alegre. Obrigada pelos conselhos e puxões de orelha, cafezinhos na escada, e por sua preciosa amizade nesses anos de pós-graduação.

À Livea Godoy, por todo incentivo, conversas, correções, sugestões e trocas de ideias. Muito obrigada por sua amizade.

Aos meus pais, Rosana e Sérgio, por todos os sacrifícios, incentivo e amor durante toda minha vida que me trouxeram até aqui, e ao meu irmão, João Gabriel, por todas as risadas, apoio e palavras de conforto quando eu me senti incapaz. Você é o melhor irmão que eu poderia pedir.

Ao meu marido, Matheus, obrigada por ser minha rocha, meu amigo e meu conselheiro. Obrigada por compreender minha rotina caótica, por me incentivar a persistir perante os

desafios, por me levar e buscar do laboratório, inclusive em horários inoportunos e finais de semana. Obrigada por me fazer acreditar que ficaria tudo bem, e por escolher fazer parte da minha vida.

Aos meus sogros, Vicente e Andrea, por todo cuidado e apoio, por me acolherem em sua casa e sua família, e pelo respeito à minha profissão. Vocês têm minha eterna gratidão por tudo que fizeram e fazem por mim.

Aos meus cunhados, Gabriel e Gabriela, pelos encontros divertidos, noites de jogos e por tornarem minha vida em Ribeirão Preto mais alegre.

Ao Matheus, meu grande amigo, colega de turma e ex-colega de apartamento, obrigada por sua amizade, pelas risadas, pelo companheirismo e por me incentivar a vir para Ribeirão Preto, esse foi um dos seus melhores conselhos.

Aos meus queridos amigos, cujo carinho me acompanha pelo mundo todo. Em especial, Ana Carolina, Leonardo, Gabriela, Adriano, Yasmin, Nathalia e Pedro.

A todos os meus familiares, pelo amor e apoio.

A todas as pessoas que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Direi isto suspirando
Em algum lugar, daqui a muito tempo:
Dois caminhos se separavam em um bosque
amarelo, e eu...
Eu escolhi o menos percorrido
E isso fez toda a diferença. ”

Robert Frost - O Caminho Não Trilhado

RESUMO

BILIBIO, J.O. Efeito do Canabidiol sobre as consequências da exposição ao isolamento social prolongado em camundongos fêmeas em diferentes idades: possível envolvimento da via do inflamassoma de NLRP3. 2024. 119 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

Diversas evidências sugerem que o estresse, como o isolamento social (IS), está relacionado ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, os quais acometem duas vezes mais mulheres do que homens. Além disso, a adolescência pode ser um período de maior suscetibilidade, visto que regiões cerebrais envolvidas no controle da resposta ao estresse ainda estão em desenvolvimento. Animais submetidos a modelos de estresse apresentam hiperativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e da neuroinflamação, que pode ser decorrente da ativação da via do inflamassoma de NLRP3. Em roedores, o canabidiol (CBD) induz efeitos tipo-ansiolítico/antidepressivo, além de atenuar o comportamento agressivo induzido pelo IS. Ademais, estudos recentes observaram a inibição do inflamassoma de NLRP3 pelo CBD em monócitos e micróglia humana infectada por HIV. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi investigar o envolvimento do inflamassoma de NLRP3 frente às alterações comportamentais induzidas pelo IS em fêmeas adolescentes e adultas, e o possível efeito terapêutico do CBD. Camundongos CD-1 fêmeas (4 e 9 semanas) foram isoladas durante 33 dias, e tratadas com CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg/10 mL) ou veículo (3% de Tween 80 em salina) a partir do 14º dia de IS até o final do experimento. Do 28º ao 33º dia, os animais foram submetidos aos seguintes testes comportamentais, para avaliação da locomoção, do comportamento tipo-ansioso/depressivo e da cognição: teste do campo aberto, teste de borrifagem de sacarose, teste de reconhecimento de objetos, teste de alimentação suprimida pela novidade, testes de preferência e de interação social, e teste do nado forçado. Imediatamente após a realização do teste do nado forçado, os animais foram eutanasiados, as glândulas adrenais, o baço e o córtex pré-frontal (PFC) foram coletados para análises posteriores. A expressão gênica do NLRP3, ASC, caspase-1 e IL-1 β dos animais adultos agrupados e isolados tratados com veículo ou CBD (10 mg/Kg; de acordo com os resultados comportamentais) foi avaliada por PCR em tempo real. O IS induziu hiperlocomoção e comportamento tipo-depressivo, caracterizado pela redução do tempo em autolimpeza no teste de borrifagem de sacarose em ambas as idades. O comportamento tipo-ansioso, caracterizado pelo aumento da latência para se alimentar no teste de alimentação suprimida pela novidade, aumento do tempo de interação e da preferência social, redução do tempo de imobilidade (nado forçado) e aumento do peso das glândulas adrenais foram observados apenas nas adultas. O CBD (10 mg/Kg) atenuou a hiperlocomoção

nas adolescentes e o comportamento tipo-ansioso nas adultas, induzidos pelo IS e reduziu a expressão gênica de NLRP3 e ASC, nas adultas de ambas as condições. Conclui-se, portanto, que o IS induziu mais alterações nas fêmeas adultas do que nas adolescentes, e ainda, que o CBD atenuou alguns comportamentos induzidos pelo IS, e reduziu a expressão gênica de NLRP3 e ASC, no PFC dos animais adultos das duas condições. Até onde se sabe, este é o primeiro estudo a reportar a atenuação da expressão gênica do NLRP3 e da ASC no PFC de camundongos tratados com CBD, dando suporte a estudos futuros sobre o envolvimento do estresse com esses componentes.

Palavras-chave: Estresse. Adolescência. Ansiedade. Depressão. Canabinoides.

ABSTRACT

BILIBIO, J.O. Effect of Cannabidiol on the consequences of exposure to prolonged social isolation in female mice at different ages: possible involvement of the NLRP3 inflammasome's pathway. 2024. 119 p. Dissertation (Master's) - Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo, 2024.

Numerous pieces of evidence suggest that stress, such as social isolation (SI), is related to the development of psychiatric disorders, which affect women twice as much as men. Moreover, adolescence may comprehend a period of greater susceptibility, considering brain regions involved in the regulation of the stress response are still under development. Animals submitted to stress models present hyperactivation of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis and increased neuroinflammation, which can be due to the activation of the NLRP3 inflammasome's pathway. In rodents, cannabidiol (CBD) induces anxiolytic/antidepressant-like effects and attenuates the SI-induced aggressive behavior. Furthermore, recent studies observed CBD induced the inhibition of the NLRP3 inflammasome in monocytes and human microglia infected by HIV. Thus, this work aimed to investigate the involvement of the NLRP3 inflammasome on behavioral alterations induced by SI in adult and adolescent female mice, and CBD's possible therapeutic effect. Female CD-1 mice (4 and 9 weeks old) were isolated for 33 days, and treated with CBD (3, 10 or 30 mg/Kg/10 mL) or vehicle (3% Tween 80 in saline) from the 14th day of SI until the end of the experiment. From the 28th to the 33rd day, animals were submitted to the following behavioral tests, to assess locomotor activity, depressive/anxious-like behavior and cognition: open field test, splash test, novel object recognition test, novelty suppressed feeding test, social preference and social interaction tests, and forced swimming test. Immediately after the forced swimming test, animals were euthanized and the adrenal glands, spleen and prefrontal cortex (PFC) were collected for subsequent analysis. The gene expression of NLRP3, ASC, caspase-1 and IL-1 β of adult grouped-housed and SI animals treated with vehicle or CBD (10 mg/Kg, according to the behavioral results) was assessed by real time PCR. SI induced hyperlocomotion and depressive-like behavior, characterized by the reduced grooming time in the splash test in both ages. Only adult animals displayed anxious-like behavior, characterized by the increased latency to feed in the novelty suppressed feeding test, increased social preference and social interaction time, reduced immobility time (forced swimming test) and increased adrenal glands' weights. CBD (10 mg/Kg) attenuated the SI induced hyperlocomotion in adolescent mice, and the anxious-like behavior in adults, and reduced the gene expression of NLRP3 and ASC, in adult mice from both conditions. In conclusion, SI induced more alterations in adult than adolescent

females, and CBD attenuated some behavioral alterations induced by SI and reduced the gene expression of NLRP3 and ASC in the PFC of adult animals from both conditions. To the best of the authors' knowledge, this is the first study to report the reduced gene expression of NLRP3 and ASC in the PFC of mice treated with CBD, which provides support to future studies about the relation of stress with these components.

Key-words: Stress. Adolescence. Anxiety. Depression. Cannabinoids.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação gráfica da arena utilizada para os testes de preferência e interação social.
- Figura 2.** Delineamento experimental do experimento 1.
- Figura 3.** Delineamento experimental do experimento 2.
- Figura 4.** Equação utilizada para o cálculo da estatística Z.
- Figura 5.** Equação do valor de Z geral.
- Figura 6.** Experimento 1 - Avaliação da atividade locomotora pelo OFT.
- Figura 7.** Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-ansioso pela distância percorrida na periferia, no OFT.
- Figura 8.** Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-ansioso pelo tempo no centro, no OFT.
- Figura 9.** Experimento 1 - Razão do tempo de permanência no centro no OFT.
- Figura 10.** Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-depressivo pelo ST.
- Figura 11.** Experimento 1 - Avaliação da memória de curto e longo-prazo pelo NOR.
- Figura 12.** Experimento 1 - Avaliação da preferência social pelo SPT.
- Figura 13.** Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-ansioso pela latência para alimentação na caixa teste, no NSFT.
- Figura 14.** Experimento 1 - Avaliação do comportamento alimentar pela latência para alimentação na caixa casa, no NSFT.
- Figura 15.** Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-ansioso pela razão da latência para alimentação na caixa teste pela caixa casa, no NSFT.
- Figura 16.** Experimento 1 - Avaliação da interação social pelo SIT.
- Figura 17.** Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-depressivo nos primeiros dois minutos do FST.
- Figura 18.** Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-depressivo nos últimos quatro minutos do FST.
- Figura 19.** Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-depressivo no tempo total do FST.
- Figura 20.** Experimento 1 - Avaliação da emocionalidade dos animais através do Z Score.
- Figura 21.** Experimento 1 - Avaliação do peso do baço.
- Figura 22.** Experimento 1 - Avaliação do peso das glândulas adrenais. Peso das glândulas adrenais normalizado pelo peso corporal.
- Figura 23.** Experimento 1 - Análise de correlação entre o peso corporal dos animais, tempo do experimento e tratamento com CBD.

Figura 24. Experimento 1 - *Heatmap* das fases do ciclo estral de cada grupo experimental ao longo do protocolo.

Figura 25. Experimento 1 - Valores do Z Score dos grupos selecionados para análise de expressão gênica.

Figura 26. Avaliação da expressão gênica de componentes da via do inflamassoma de NLRP3.

Figura 27. Experimento 2 - Avaliação da atividade locomotora e comportamento tipo-ansioso pelo OFT.

Figura 28. Experimento 2 - Avaliação do comportamento tipo-depressivo pelo ST.

Figura 29. Experimento 2 - Avaliação da memória de curto e longo-prazo pelo NOR.

Figura 30. Experimento 2 - Avaliação da preferência social pelo SPT.

Figura 31. Experimento 2 - Avaliação do comportamento tipo ansioso e comportamento alimentar pelo NSFT.

Figura 32. Experimento 2 - Avaliação da interação social pelo SIT. Tempo de interação com o animal-estímulo no SIT.

Figura 33. Experimento 2 - Avaliação do comportamento tipo-depressivo pelo FST.

Figura 34. Experimento 2 - Avaliação da emocionalidade dos animais pelo Z Score.

Figura 35. Experimento 2 - Avaliação do peso do baço.

Figura 36. Experimento 2 - Avaliação do peso das glândulas adrenais.

Figura 37. Experimento 2 - Análise de correlação entre o peso corporal dos animais, tempo do experimento e tratamento com CBD.

LISTA DE ABREVIATURAS

AEA - Anandamida

ANOVA - Análise de variância

ASC - proteína adaptadora associada à apoptose (do inglês *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain*)

ATP - Adenosina trifosfato

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *brain derived neurotrophic factor*)

CB1 - Receptor Canabinoide do tipo 1

CB2 - Receptor Canabinoide do tipo 2

CBD - Canabidiol

CBG - Globulina ligadora de corticosteroides (do inglês *corticosteroid binding globulin*)

CLRs - Receptores de lectina do tipo C (do inglês *C-type lectin receptors*)

CRH - Hormônio liberador de corticotrofina (do inglês *corticotropin releasing hormone*)

DAMP - Padrões moleculares associados a danos (do inglês *damage-associated molecular patterns*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EPM - Erro padrão da média

FST - Teste do nado forçado (do inglês *forced swimming test*)

GR - Receptores de glicocorticoides

HPA - Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (do inglês *hypothalamic-pituitary-adrenal*)

HPC - Hipocampo

IL-1 - Interleucina 1

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-18 - Interleucina 18

IL-1 β - Interleucina 1-beta

IL-6 - Interleucina 6

iNOS - Óxido-nítrico sintase induzível

I.P. - Injeção intraperitoneal

IS - Isolamento social

LRR - Repetições de leucina (do inglês *leucine-rich repeats*)

LTM - Memória a longo-prazo (do inglês *long-term memory*)

MR - Receptores de mineralocorticoides

NF- κ B - Fator de transcrição nuclear κ B (do inglês *nuclear factor κ B*)

NLR - Receptor do tipo NOD (do inglês, *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*)

NLRP3 - do inglês, *Nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3*

NO - Óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide*)

NOD - Domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização (do inglês, *Nucleotide-binding oligomerization domain*)

NOR - Teste de reconhecimento de objetos (do inglês, *novel object recognition test*)

NSFT - Teste de alimentação suprimida pela novidade (do inglês, *novelty suppressed feeding test*)

OFT - Teste do campo aberto (do inglês, *open field test*)

P2X7 - Receptor purinérgico do subtipo 7 (do inglês, *Purinergic receptor subtype 7*)

PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *Pathogen-associated molecular patterns*)

pCREB - Proteína de ligação responsiva ao AMPc fosforilada (do inglês, *phosphorylated cAMP response element-binding protein*)

PFC - Córtex pré-frontal (do inglês, *prefrontal cortex*)

PKA - Proteína quinase A (do inglês, *protein kinase A*)

PRR - Receptores de reconhecimento padrão (do inglês, *pattern recognition receptors*)

PSD95 - Proteína de densidade pós-sináptica 95 (do inglês, *postsynaptic density protein 95*)

PSU - Polissulfona

RNA - Ácido ribonucleico

RNA_m - RNA mensageiro

RLR - Receptor do tipo RIG (do inglês, Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors)

RT-qPCR - PCR em tempo real (do inglês, *real time quantitative polymerase chain reaction*)

SERT - Transportador de serotonina (do inglês *serotonin transporter*)

SIT - Teste de interação social (do inglês, *social interaction test*)

SNC - Sistema nervoso central

SPT - Teste de preferência social (do inglês, *social preference test*)

ST - Teste de borrifagem de sacarose (do inglês, *splash test*)

STM - Memória a curto prazo (do inglês, *short-term memory*)

TLRs - Receptores do tipo Toll (do inglês, *Toll-like receptors*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	22
1.1. Transtornos psiquiátricos	22
1.2. Estresse	23
1.2.1. Isolamento social	27
1.2.2. Relação entre adolescência, sexo biológico e estresse.....	29
1.3. Canabidiol.....	31
1.4. Inflamassoma de NLRP3	34
2. HIPÓTESE	37
3. OBJETIVOS	38
3.1. Objetivo geral	38
3.2. Objetivos específicos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1. Animais.....	39
4.2. Drogas.....	39
4.3. Modelos animais	39
4.3.1. Protocolo de isolamento social crônico	40
4.3.2. Protocolo de tratamento	40
4.3.3. Acompanhamento de peso	40
4.3.4. Acompanhamento de ciclo estral	40
4.3.5. Testes comportamentais.....	41
4.3.5.1. Teste do campo aberto (OFT, do inglês <i>open field test</i>)	41
4.3.5.2. Teste de borrifagem de sacarose (ST, do inglês <i>splash test</i>)	41
4.3.5.3. Teste de reconhecimento de objetos (NOR, do inglês <i>novel object recognition test</i>).....	42
4.3.5.4. Teste de preferência social (SPT, do inglês <i>social preference test</i>) e teste de interação social (SIT, do inglês <i>social interaction test</i>).....	42

4.3.5.5. Teste de alimentação suprimida pela novidade (NSFT, do inglês <i>novelty suppressed feeding test</i>)	43
4.3.5.6. Teste do nado forçado (FST, do inglês <i>forced swimming test</i>).....	44
4.3.6. Coleta de órgãos e estruturas	44
4.4. Análises moleculares	44
4.4.1. Análise de PCR em tempo real (RT-qPCR)	44
4.5. Delineamento experimental	45
4.5.1. Experimento 1 - Animais adultos	45
4.5.2. Experimento 2 - Animais adolescentes	46
4.6. Análise estatística	47
4.6.1. Análise comportamental através da estatística Z	48
5. RESULTADOS.....	50
5.1. Experimento 1 - Avaliação dos efeitos do estresse de isolamento social e do tratamento com CBD em camundongos fêmeas adultas	50
5.1.1. Testes comportamentais	50
5.1.1.1. Teste do campo aberto (OFT, do inglês <i>open field test</i>)	50
5.1.1.2. Teste de borrifagem de sacarose (ST, do inglês <i>splash test</i>)	54
5.1.1.3. Teste de reconhecimento de objetos (NOR, do inglês <i>novel object recognition test</i>).....	55
5.1.1.4. Teste de preferência social (SPT, do inglês <i>social preference test</i>)	56
5.1.1.5. Teste de alimentação suprimida pela novidade (NSFT, do inglês <i>novelty suppressed feeding test</i>)	57
5.1.1.6. Teste de interação social (SIT, do inglês <i>social interaction test</i>)	61
5.1.1.7. Teste do nado forçado (FST, do inglês <i>forced swimming test</i>).....	62
5.1.2. Z Score dos testes comportamentais	65
5.1.3. Avaliação do peso de órgãos.....	66
5.1.3.1. Peso do baço	66
5.1.3.2. Peso das glândulas adrenais	67

5.1.4. Análise de correlação entre o peso corporal dos animais e o tratamento com CBD ou o tempo do protocolo.....	68
5.1.5. Acompanhamento do ciclo estral.....	69
5.1.6. Análise da expressão gênica	70
5.2. Experimento 2 - Avaliação dos efeitos do estresse de isolamento social e do tratamento com CBD em camundongos fêmeas adolescentes	73
5.2.1. Testes comportamentais.....	73
5.2.1.1. Teste do campo aberto (OFT, do inglês <i>open field test</i>).....	73
5.2.1.2. Teste de borrifagem de sacarose (ST, do inglês <i>splash test</i>)	74
5.2.1.3. Teste de reconhecimento de objetos (NOR, do inglês <i>novel object recognition test</i>).....	75
5.2.1.4. Teste de preferência social (SPT, do inglês <i>social preference test</i>)	76
5.2.1.5. Teste de alimentação suprimida pela novidade (NSFT, do inglês <i>novelty suppressed feeding test</i>)	77
5.2.1.6. Teste de interação social (SIT, do inglês <i>social interaction test</i>)	78
5.2.1.7. Teste do nado forçado (FST, do inglês <i>forced swimming test</i>).....	79
5.2.2. Z Score dos testes comportamentais	80
5.2.3. Avaliação do peso de órgãos.....	81
5.2.3.1. Peso do baço	81
5.2.3.2. Peso das glândulas adrenais	82
5.2.4. Análise de correlação entre o tratamento com CBD ou o tempo com o peso corporal dos animais	82
6. DISCUSSÃO.....	84
7. CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹	96
ANEXOS	119

Anexo A - Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP - USP) para realização dos experimentos em animais.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Transtornos psiquiátricos

De acordo com a versão mais recente do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais: DSM-5-TR, um transtorno mental é uma síndrome que compreende distúrbios clinicamente significativos na cognição, regulação emocional ou comportamento de um indivíduo, a qual reflete uma disfunção em processos psicológicos, biológicos ou de desenvolvimento subjacente ao funcionamento mental (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2022). Dados recentes da Organização Mundial da Saúde estimam que cerca de 970 milhões de pessoas no mundo, aproximadamente 1 em cada 8 pessoas, sejam acometidas por um transtorno psiquiátrico, sendo os transtornos depressivos e de ansiedade os tipos mais comuns (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

O transtorno depressivo maior é uma forma de transtorno depressivo, a qual acomete cerca de 3,8% da população mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023) e se manifesta através de diversos sinais e sintomas, tais como sentimentos de tristeza, vazio ou culpa, acompanhados de alterações no apetite, sono e na cognição, agitação psicomotora, perda significativa de interesse em atividades anteriormente consideradas agradáveis ou prazerosas, definido como anedonia e, em casos mais extremos, ideação suicida (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2022). Já transtornos de ansiedade são caracterizados pelo medo e ansiedade excessivos e as alterações comportamentais associadas a eles. Enquanto o medo se refere a uma resposta emocional a uma ameaça real ou percebida, a ansiedade se refere à antecipação de uma ameaça futura. Sintomas físicos desses transtornos envolvem dores de cabeça e de estômago e tensão muscular, enquanto alterações comportamentais costumam se manifestar como preocupação excessiva e persistente acerca de eventos futuros ou que resultem em separação, bem como uma relutância ou recusa em se expor a situações ansiogênicas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2022).

Estudos epidemiológicos apontam que as mulheres são duas vezes mais propensas a desenvolver transtornos psiquiátricos, em comparação aos homens (FERRARI et al., 2013; KUEHNER, 2017), no entanto a explicação para esse fenômeno permanece inconclusiva. Nesse contexto, divergências na constituição fisiológica, como a maior densidade de receptores de serotonina do tipo 5-HT1A e menor densidade de transportadores de serotonina (SERT, do inglês *serotonin transporter*) observada em mulheres (JOVANOVIC et al., 2008) e diferenças na resposta adaptativa ao estresse entre os sexos podem ser alguns dos mecanismos

responsáveis pela diferença na prevalência desses transtornos. Ademais, os hormônios sexuais femininos, estrogênio e progesterona, também apresentam associações com transtornos psiquiátricos e com a eficácia de fármacos utilizados para seu tratamento (KHAN et al., 2005; MA et al., 2019; THASE et al., 2005). Estudos em animais observaram que o efeito antidepressivo da sertralina, um inibidor da receptação de serotonina, variou em função do ciclo estral (KOKRAS et al., 2015) e que o estrogênio aumentou a eficácia do escitalopram, outro fármaco da mesma classe, em ratas ovariectomizadas (IBRAHIM et al., 2016). Ainda, a ratos machos e fêmeas com níveis reduzidos de estrogênio não responderam ao tratamento com fluoxetina (GÓMEZ et al., 2014).

Um estudo sistemático sobre o impacto da pandemia de COVID-19 em 204 países identificou uma relação entre os eventos vivenciados e o aumento da prevalência de transtorno depressivo maior e transtornos de ansiedade, e ainda, que as mulheres e jovens foram os grupos mais afetados comparado a homens e idosos, respectivamente (COVID-19 MENTAL DISORDERS COLLABORATORS, 2021). Além do impacto direto sobre a saúde física dos indivíduos, esse cenário contribuiu para o surgimento e/ou agravamento de problemas sociais, econômicos e políticos (HOSSEINZADEH et al., 2022; NASEER et al., 2023; PEREIRA; MEDEIROS; BERTHOLINI, 2020). Buscando conter a transmissão viral, medidas de redução do contato próximo entre indivíduos foram adotadas, as quais, embora necessárias, levaram a um cenário de isolamento social (IS) global, cujas consequências abrangem o aumento de casos de violência doméstica (TELLES et al., 2021; VIEIRA; GARCIA; MACIEL, 2020) e de transtornos psiquiátricos (HOLM-HADULLA et al., 2023), tornando esse um importante foco de estudo.

1.2. Estresse

O conceito de homeostase foi introduzido em 1926 pelo fisiologista estadunidense Walter Cannon, de modo a descrever a habilidade de manter os sistemas fisiológicos direcionados a um equilíbrio dinâmico (DAVIES, 2016; PACÁK; PALKOVITS, 2001), o qual é essencial para a sobrevivência do indivíduo tendo caráter adaptativo (CHROUSOS, 2009). Dez anos depois, Hans Selye introduziu o termo “estresse” no campo da Medicina, até então utilizado no campo da Física, para descrever uma “resposta inespecífica do corpo a qualquer demanda” (DAVIES, 2016; PACÁK; PALKOVITS, 2001; TAN; YIP, 2018). Posteriormente, Chrousos e Gold expandiram o conceito de estresse, definindo-o como um estado de desarmonia ou de ameaça à homeostase, o qual evoca respostas tanto específicas quanto

inespecíficas (CHROUSOS; GOLD, 1992). Assim, atualmente entende-se que todos os organismos vivos mantêm um estado de homeostase, o qual é constantemente desafiado por fatores adversos, tanto intrínsecos quanto extrínsecos, os quais são denominados “estressores”.

Dentre a vasta gama de estressores, encontram-se fatores físicos e psicológicos, reais ou aparentes, cuja magnitude e duração provocam consequências diferentes no organismo (CHROUSOS, 2009). O sistema nervoso central (SNC) é responsável por iniciar e regular muitas das respostas ao estresse, de acordo com a natureza dos estressores. Substratos neurais reagem tanto a estressores físicos quanto psicológicos, no entanto, ao passo que estressores físicos, como perda de sangue, infecção e dor induzem respostas sistêmicas imediatas, modificando a homeostase, estressores psicológicos, tais como estressores sociais, induzem respostas cerebrais baseadas em experiências prévias ou comportamentos inatos (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Os estressores também podem diferir quanto à sua duração, a qual pode ser aguda, através de exposições únicas ou limitadas, ou crônica, como exposições intermitentes ou prolongadas (PACAK et al., 1998; PACÁK; PALKOVITS, 2001).

Visando reestabelecer a homeostase, o organismo desencadeia um repertório de respostas fisiológicas e comportamentais mediadas por mecanismos celulares, neuroendócrinos e moleculares, através de diversos órgãos e sistemas, tanto centrais quanto periféricos, caracterizando a resposta adaptativa ao estresse. A ativação dessas respostas, bem como as subsequentes alterações geradas, variam em função do tipo e duração do estímulo apresentado, podendo resultar no reestabelecimento da homeostase, ou a respostas deficientes ou exacerbadas (CHROUSOS, 2009; MCEWEN, 1999; MILISAV; POLJSAK; ŠUPUT, 2012; PACÁK; PALKOVITS, 2001; PITTENGER; DUMAN, 2008).

Diversos componentes hormonais, celulares e moleculares estão relacionados à resposta adaptativa ao estresse. Dentre os fatores hormonais, encontram-se as catecolaminas adrenalina (ou epinefrina) e noradrenalina (ou norepinefrina), secretadas pela medula das glândulas adrenais, e reguladas pelo sistema nervoso simpático sistêmico, e os glicocorticoides, como o cortisol, em seres-humanos, e corticosterona, em roedores, os quais são secretados pelo córtex das glândulas adrenais mediante o estímulo do hormônio adrenocorticotrófico, regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA, do inglês *hypothalamus-pituitary-adrenal axis*). Esses hormônios possuem diferentes funções a depender do contexto de sua secreção, porém, na resposta aguda ao estresse, são responsáveis pela mobilização energética a favor de órgãos essenciais, como os envolvidos na atividade locomotora, cardiovascular e nervosa, através da

estimulação de processos como gliconeogênese e glicogenólise, e aumento do tônus vascular. Além disso, eles são capazes de inibir temporariamente funções não-essenciais, como as relacionadas ao crescimento, reprodução e funções imunes, para reagir ao desafio apresentado (PACÁK; PALKOVITS, 2001; ROBERTS; LOPEZ-DURAN, 2019).

O estresse e o eixo HPA promovem diversos efeitos sobre o sistema imunológico, tanto inato quanto adquirido. Em condições fisiológicas, a ativação do eixo HPA promove o recrutamento de células imunes como macrófagos e leucócitos e regula a produção e liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios, como as citocinas e as quimiocinas, os quais regulam uns aos outros através de diferentes vias, bem como do próprio eixo HPA, mantendo a retroalimentação negativa (CHROUSOS, 2009; MCEWEN, 2008). De forma geral, a produção de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-18, é estimulada pelas catecolaminas, e inibida pelos glicocorticoides (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000), no entanto, a observação de efeitos diversos induzidos por esses hormônios indica relações não-lineares relacionadas a outros mecanismos modulatórios. Por exemplo, em situações de estresse crônico, a ativação do eixo HPA e a consequente liberação de glicocorticoides pode resultar em efeitos contrários aos fisiológicos, como o aumento da resposta inflamatória, particularmente através da indução de mediadores inflamatórios e redução de proteínas imunorregulatórias, o estímulo da proliferação de micróglias, células do sistema imune inato residentes no cérebro, e a redução da capacidade de retroalimentação negativa dos glicocorticoides, levando ao aumento ou redução significativa da concentração plasmática de glicocorticoides, condição que já foi relacionada à depressão e ao transtorno de estresse pós-traumático em humanos (BAUER et al., 2003; BELLAVANCE; RIVEST, 2014; FRANK; WATKINS; MAIER, 2013; MCEWEN, 2008).

Como mencionado anteriormente, a relação entre esses elementos é complexa, e as consequências de suas interações dependem grandemente de fatores como o tipo e duração do estresse, a concentração de glicocorticoides liberada e os tecidos e células afetados (DINKEL; MACPHERSON; SAPOLSKY, 2003). Nesse sentido, a observação de que respostas inflamatórias no SNC de roedores submetidos a estímulos imunológicos, como a administração de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), foram exacerbadas pela exposição prévia a estressores agudos ou crônicos corrobora a hipótese neuroinflamatória do estresse, a qual sugere que a exposição a estressores induz o aumento da resposta inflamatória, podendo levar ao desenvolvimento de patologias como o transtorno depressivo ou transtorno de ansiedade (FRANK et al., 2010; MUNHOZ et al., 2006). De fato, camundongos submetidos a estressores

físicos, como o estresse de restrição, apresentaram aumento de mediadores inflamatórios como TNF- α , óxido-nítrico sintase induzível (iNOS) e IL-1 β , bem como redução de proteínas imunorregulatórias e da proliferação de micróglia (BLANDINO et al., 2009; GARCÍA-BUENO et al., 2008; MADRIGAL et al., 2002). Assim, uma das hipóteses acerca da modulação da resposta imunológica pelo estresse sugere que a exposição a altos níveis de glicocorticoides, como ocorrido na resposta ao estresse, é capaz de sensibilizar as células microgliais a uma injúria subsequente (FRANK; WATKINS; MAIER, 2013), podendo, assim, favorecer a neuroinflamação. Ademais, a sinalização simultânea por glicocorticoides e padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *damage associated molecular patterns*) é capaz de acentuar a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como demonstrado pela exposição de células mielóides humanas e murinas ao LPS, seguido por dexametasona junto de adenosina trifosfato (ATP), resultando no aumento da produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 (BUSILLO; AZZAM; CIDLOWSKI, 2011).

No que se refere ao SNC, a ativação aguda do eixo HPA leva à facilitação da formação de memórias e à promoção de ajustes comportamentais direcionados. Glicocorticoides, monoaminas e peptídeos também facilitam um processo essencial para o armazenamento de memórias (JOËLS, 2008), a potenciação a longo-prazo em regiões do hipocampo (HPC) como a CA1. Contudo, o estresse crônico ou durante períodos críticos de desenvolvimento pode comprometer a estrutura e função de células neurais, como a indução da atrofia dendrítica de neurônios localizados no córtex pré-frontal (PFC, do inglês *prefrontal cortex*) e na região CA3 do HPC de roedores (RADLEY et al., 2006; SOUSA et al., 2000), bem como a inibição da neurogênese no giro denteado (MCEWEN, 1999) e a redução da plasticidade sináptica hipocampal (BODNOFF et al., 1995). Sendo assim, a ativação excessiva e/ou durante períodos de desenvolvimento do eixo HPA, bem como as alterações morfológicas e estruturais induzidas pelo estresse podem contribuir para o surgimento de transtornos psiquiátricos (SMITH; VALE, 2006), através de alterações comportamentais relacionadas à memória (CERQUEIRA et al., 2007) e emoções, como a ansiedade (ROS-SIMÓ; VALVERDE, 2012; SMITH et al., 2020; WALLACE et al., 2009; ZELIKOWSKY et al., 2018), as quais podem modular comportamentos futuros e respostas psicológicas a eventos estressantes (HANDA; WEISER, 2014; MCCORMICK et al., 2010; MCCORMICK; MATHEWS, 2010).

1.2.1. *Isolamento social*

A definição de IS é tida como o estado objetivo de se ter contato mínimo com outros indivíduos (WENGER et al., 1996), enquanto que a solidão é descrita na literatura como um fenômeno subjetivo desagradável, caracterizado pela discrepância entre a quantidade desejada de relações sociais e a que é efetivamente alcançada (PERLMAN; PEPLAU, 1981), a percepção de privação social (ROOK, 1984) ou ainda como o estado subjetivo de sentimentos negativos associados à essa percepção (WENGER et al., 1996). O IS pode se apresentar de diversas formas, tanto para animais quanto para seres humanos, como exclusão, discriminação, rejeição, morte, ou negligência, todas capazes de induzir resposta de estresse e produzir impactos significativos sobre a saúde e o bem-estar do indivíduo (MATTHEWS; TYE, 2020).

Nesse sentido, a vida em conjunto é crucial para a sobrevivência da maior parte das espécies sociais e, portanto, o IS predispõe o indivíduo a maiores riscos, como prejuízos na saúde física e mental e até mesmo maiores índices de mortalidade, inclusive em seres humanos. Estudos longitudinais identificaram que o IS em humanos está relacionado ao desenvolvimento de condições como depressão e demência, e o agravamento de doenças cardiovasculares, como hipertensão e acidente vascular cerebral (HAWKLEY; CACIOPPO, 2003; KARELINA et al., 2009), além de ser identificado como um fator de risco para mortalidade em diversos estudos (HOLT-LUNSTAD; SMITH; LAYTON, 2010; NAITO et al., 2023; UMBERSON; MONTEZ, 2010).

Uma das hipóteses para esse cenário, a teoria evolutiva da solidão, criada por Cacioppo, pressupõe que o impacto físico e mental do IS seja mediado por mecanismos neurofisiológicos evolutivamente conservados, uma vez que a sobrevivência do indivíduo dependia do restante do grupo (CACIOPPO; CACIOPPO, 2018; CACIOPPO; CACIOPPO; BOOMSMA, 2014). Para tanto, a percepção da solidão/isolamento atua como um sinal aversivo, promovendo adaptação de diferentes sistemas visando reduzir vulnerabilidades devido a essa condição, e motivando a busca por contato social e reconexão (CACIOPPO; CACIOPPO; BOOMSMA, 2014).

A teoria de Cacioppo propõe diversas alterações induzidas pelo déficit social, sendo a principal delas o comportamento de hipervigilância, através do aumento de respostas associadas à ansiedade de modo a promover autopreservação, como a maior ativação do eixo HPA, redução da qualidade do sono, aumento do tônus simpático, da resposta inflamatória e de sintomas

depressivos (CACIOPPO; CACIOPPO, 2018). Nesse contexto, uma relação entre aumentos pontuais nos níveis de cortisol plasmático em adultos após queixas de solidão foi observada (DOANE; ADAM, 2010), embora os resultados em roedores sejam mais controversos (IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016; STEVENSON et al., 2019; WEISS et al., 2004). Além desses efeitos, em humanos observou-se alterações no volume de regiões encefálicas como o corpo caloso, amígdala e HPC de adolescentes após privação social durante a infância (MEHTA et al., 2009; TOTTENHAM et al., 2010), indicando que o IS é capaz de promover alterações no SNC, assim como alterações periféricas.

Apesar das evidências existentes, estudos em seres humanos sobre os efeitos decorrentes do IS e os mecanismos por trás desses, muitas vezes se tornam difíceis ou inviáveis. Portanto, a utilização de modelos animais se torna uma alternativa valiosa, possibilitando investigações detalhadas através da mimetização de contextos e condições humanas, aliado ao controle de variáveis, algo difícil de se realizar em ensaios clínicos. Considerando que camundongos, assim como os seres-humanos, são animais sociais, modelos animais de IS constituem um método válido para investigar o impacto da privação social no comportamento e em substratos neurais relacionados a transtornos depressivo e de ansiedade, em especial após o contexto da pandemia de COVID-19.

Na literatura, modelos animais de IS são utilizados para diversos fins, com diferentes protocolos, principalmente quanto à sua duração, resultando em comportamentos tipo-depressivos (HAJ-MIRZAIAN et al., 2015; IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016), tipo-ansiosos (DIMONTE et al., 2023; KUMARI et al., 2016; LUKKES et al., 2009) e até mimetizando sintomas de esquizofrenia (POWELL; SWERDLOW, 2023). De maneira geral, camundongos submetidos ao IS demonstraram diversas alterações comportamentais, tais como maior reatividade a choques elétricos e maior resposta de medo a estímulos sonoros ameaçadores (SMITH et al., 2020; ZELIKOWSKY et al., 2018), prejuízos cognitivos (LI et al., 2021b; LIU et al., 2020b; NIU et al., 2020), comportamentos tipo-depressivos e ansiosos (KUMARI et al., 2016; LI et al., 2021b; ROS-SIMÓ; VALVERDE, 2012; SULLENS et al., 2021) e um comportamento agressivo característico, denominado agressão induzida por IS (MICZEK et al., 2001). Quanto às alterações moleculares, camundongos socialmente isolados apresentaram alterações na resposta do eixo HPA, com níveis basais de corticosterona plasmática reduzidos, com aumento significativo após a exposição ao teste da caixa claro-escuro (ROS-SIMÓ; VALVERDE, 2012), redução da densidade de espinhas, de prolongamentos dendríticos de neurônios hipocâmpais, bem como da expressão de proteínas envolvidas na neuroplasticidade,

como a proteína de densidade pós-sináptica 95 (PSD-95, do inglês *postsynaptic density protein 95*), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain derived neurotrophic factor*), a proteína quinase A (PKA), a proteína de ligação responsiva ao AMPc fosforilada (pCREB, do inglês *phosphorylated cAMP response element-binding protein*) e a sinaptofisina (LIU et al., 2020b). Estudos reportaram ainda nesses animais expansão da população de monócitos, maior ativação do sistema nervoso simpático, aumento da expressão de genes pró-inflamatórios (POWELL et al., 2013) e dos níveis proteicos hipocâmpais das interleucinas IL-1 β e IL-18, e do inflamassoma NLRP3, um complexo multiproteico envolvido em respostas inflamatórias que será melhor descrito adiante (LI et al., 2021b; NIU et al., 2020).

Em suma, essas evidências demonstram que o IS é capaz de induzir resposta de estresse, e modular diversos componentes da resposta imune e inflamatória, tanto periférica quanto do SNC, e, assim, induzir alterações comportamentais significativas. No entanto, apesar do crescente número de estudos, os mecanismos exatos pelos quais o estresse por IS induz as alterações observadas ainda não foram completamente elucidados, e apesar das evidências de que o sexo biológico é capaz de influenciar a resposta ao estresse, estudos da literatura, incluindo a maioria dos trabalhos citados, utilizam apenas animais machos, o que resulta em uma lacuna nesse conhecimento.

1.2.2. *Relação entre adolescência, sexo biológico e estresse*

Tanto em humanos quanto em roedores, a caracterização precisa do início e fim do período da adolescência é complexa, sendo frequentemente associada ao período que compreende a puberdade. No entanto, enquanto a puberdade se refere à maturação sexual e gonadal, a adolescência compreende o período de transição da infância à vida adulta, durante o qual ocorrem diversos processos e eventos moleculares, anatômicos, hormonais e comportamentais (MCCORMICK; MATHEWS, 2007; ROMEO, 2010; SPEAR, 2000). Uma das caracterizações mais detalhadas para esse período em roedores divide-o em três fases: adolescência aguda (do inglês *early adolescence*) ou fase pré-púbere, a qual se estende do dia pós-natal 21 ao 34, adolescência média (do inglês *middle adolescence*) ou fase periadolescente, do dia 34 ao 46 e adolescência tardia (do inglês *late adolescence*) ou fase jovem-adulta, do dia 46 ao 59 (MARCO et al., 2011). Assim como ocorre durante os períodos pré e neonatal, as alterações e adaptações pelas quais o organismo passa durante a adolescência são intensas e complexas, podendo programar ou modular processos posteriores de desenvolvimento (BILBO; SCHWARZ, 2009; SPEAR, 2000).

Dentre essas alterações, o SNC recebe destaque, passando por extensas reorganizações neurais, com um intenso aumento de sinapses e receptores, seguido pela poda sináptica, processo que está diretamente ligado ao amadurecimento cognitivo e emocional que ocorre antes da vida adulta (ANDERSEN, 2003). Além disso, regiões cerebrais criticamente envolvidas no aprendizado, memória e processos emocionais, como o mPFC, HPC e amígdala, as quais apresentam elevada expressão de receptores de glicocorticoides, são extensivamente remodeladas durante a adolescência (MCCORMICK; MATHEWS, 2010). Nesse contexto, entende-se que períodos intensos de desenvolvimento, como a adolescência, apresentam maior sensibilidade ao estresse.

Além do SNC, outro elemento importante na resposta ao estresse a passar por intensas adaptações durante a adolescência é o eixo HPA (MCCORMICK et al., 2010; ROBERTS; LOPEZ-DURAN, 2019). Brevemente, em animais, algumas de suas características, como a expressão gênica de receptores de glicocorticoides (GR) e mineralocorticoides (MR) e do hormônio liberador de corticotrofina (CRH, do inglês *corticotropin releasing hormone*), são semelhantes às do indivíduo adulto já no desmame. No entanto, parâmetros importantes como o aumento das concentrações plasmáticas de globulina ligadora de corticosteroides (CBG, do inglês *corticosteroid binding globulin*) e de células responsivas a CRH na hipófise continuam a amadurecer ao longo da adolescência (MCCORMICK et al., 2010). A imaturidade desse eixo confere diferenças na resposta ao estresse entre animais adultos e adolescentes, particularmente no período pré-adolescência, sendo observados aumentos mais expressivos e prolongados na liberação de corticosterona após um estresse agudo (CRUZ; DELUCIA; PLANETA, 2008; MCCORMICK et al., 2010; ROMEO et al., 2004; ROMEO; KARATSOREOS; MCEWEN, 2006).

De fato, ratos púberes submetidos a alguns tipos de estressores apresentaram maiores concentrações de corticosterona plasmática, comparados a ratos adultos (ROMEO et al., 2004). Diversos estudos reportaram que a resposta hormonal a um estresse agudo, como choque nas patas ou estresse de restrição, levou mais tempo para retornar aos níveis basais em ratos machos e fêmeas pré-púberes (28 dias de vida) comparados a adultos (ROMEO, 2010; ROMEO et al., 2004; ROMEO; LEE; MCEWEN, 2004). Aliado a isso, evidências de que a exposição do cérebro a citocinas durante períodos críticos de desenvolvimento é capaz de sensibilizar os substratos neurais, alterando a maneira como as células da glia respondem a injúrias subsequentes, sugerem que o estresse durante a adolescência pode tornar o cérebro mais

vulnerável a condições neuropsiquiátricas como Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia e autismo (BILBO; SCHWARZ, 2009; BRENHOUSE; SCHWARZ, 2016).

Por outro lado, a intensa plasticidade de estruturas encefálicas observada na adolescência também pode conferir características resilientes ao indivíduo. Estudos recentes têm buscado compreender os mecanismos que levam alguns indivíduos a não desenvolverem transtornos psiquiátricos após a exposição a estressores ou traumas, como fatores intrínsecos de composição genética e traços de personalidade (MALHI et al., 2019), semelhantemente à teoria da diátese-estresse, a qual pressupõe que transtornos psiquiátricos, como a depressão, resultam de predisposições genéticas aliadas à fatores ambientais como o estresse (INGRAM, 2003). Embora a promoção de fenótipos resilientes após a exposição ao estresse durante a adolescência tenha sido reportada em modelos animais (COTELLA et al., 2023; KLINGER et al., 2019; ZHU; GRACE, 2023), as circunstâncias que medeiam esse desfecho, tanto em animais quanto em seres humanos, ainda estão pouco elucidadas, destacando uma importante lacuna no conhecimento atual.

Além das diferenças no desenvolvimento cerebral relacionadas à idade, o sexo biológico é um fator importante para esses processos tanto em roedores quanto em seres humanos. De maneira geral, foram observadas diferenças no processo de hiperprodução e internalização de receptores e sinapses dopaminérgicas no corpo estriado de ratos machos e fêmeas adolescentes (ANDERSEN et al., 1997), assim como de substância branca e cinzenta no cérebro de adolescentes humanos (GIEDD et al., 1999). O volume, tamanho e a mielinização de determinadas regiões também passam a diferir entre os sexos quando os indivíduos adentram a adolescência (GIEDD et al., 1996). Interessantemente, enquanto algumas dessas divergências persistem até a vida adulta, outras ocorrem exclusivamente durante a adolescência. É relevante mencionar que nem todos esses eventos ocorrem devido ao pico de ação de hormônios sexuais, visto que não foram observadas diferenças na densidade de receptores dopaminérgicos estriatais entre ratos machos e fêmeas submetidos à castração e ovariectomia, respectivamente (ANDERSEN et al., 2002). Em suma, esses dados indicam a importância de trabalhos que avaliem alterações tanto em animais adolescentes machos quanto fêmeas, considerando as diferenças estruturais e de neurodesenvolvimento observadas entre os sexos biológicos durante esse período (SHANSKY; MURPHY, 2021).

1.3. Canabidiol

Registros históricos encontrados na China indicam que a planta *Cannabis sativa* vem sendo utilizada há séculos antes de Cristo para fins medicinais, em particular como analgésico, anti-inflamatório, anticonvulsivante e antiemético (MECHOULAM, 2019; ZOU; KUMAR, 2018; ZUARDI, 2006). Dentre os mais de 100 fitocanabinoides presentes na *Cannabis sativa*, o canabidiol (CBD) é considerado um de seus principais componentes, e seu principal componente não-psicotomimético (BITENCOURT; TAKAHASHI; CARLINI, 2021). Isolado em 1940, o CBD possui propriedades anti-inflamatórias (ARIAS et al., 2023; NAGARKATTI et al., 2009) e imunorregulatórias (NICHOLS; KAPLAN, 2020), além de induzir efeito ansiolítico em pacientes saudáveis submetidos a situações ansiogênicas (BOLSONI et al., 2022a, 2022b; ZUARDI et al., 1993, 2017a), bem como em pacientes com ansiedade social (BERGAMASCHI et al., 2011) e promover efeitos anti-psicóticos em pacientes com esquizofrenia (LEWEKE et al., 2012; MCGUIRE et al., 2018). Ademais, estudos pré-clínicos demonstraram efeitos terapêuticos em diversos modelos, destacando-se efeitos tipo-antidepressivo (LINGE et al., 2016; ZANELATI et al., 2010), tipo-ansiolítico (CAMPOS et al., 2013a; FOGAÇA et al., 2018; GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2020; GUIMARÃES et al., 1990), anti-compulsivo (CASAROTTO et al., 2010) e na redução de comportamentos defensivos em modelos de transtorno de estresse pós-traumático (CAMPOS; GUIMARÃES, 2009a) e de pânico (URIBE-MARIÑO et al., 2012), bem como de comportamento agressivo induzido por IS (HARTMANN et al., 2019).

Essa ampla variedade de efeitos pode ser atribuída aos diversos mecanismos de ação do CBD, o qual atua tanto direta quanto indiretamente sobre diversos receptores do SNC, tais como os receptores canabinoides (CB) do tipo 1 e 2, receptor de potencial transiente vaniloide 1 (TRPV1, do inglês *transient receptor potential vanilloid 1*) e do receptor de serotonina 5-HT_{1A} (BURSTEIN, 2015; CAMPOS; GUIMARÃES, 2009b; CASAROTTO et al., 2010; FOGAÇA et al., 2018; HARTMANN et al., 2019; RESSTEL et al., 2009). Os receptores CB₁ são amplamente expressos em células do SNC, tais como micróglias, astrócitos e oligodendróticos (LISBOA et al., 2016), e são, possivelmente, os receptores metabotrópicos mais expressos no cérebro de mamíferos (BUSQUETS-GARCIA; BAINS; MARSICANO, 2018). Também expressos em micróglias, os receptores CB₂ desempenham funções importantes na regulação da resposta imune cerebral, através da mediação da migração, proliferação, e liberação de mediadores pró-inflamatórios das micróglias, e de sua função fagocítica e estado de ativação (LISBOA et al., 2016; MECHA et al., 2015; STELLA, 2009).

Além desses receptores, o CBD modula o sistema endocanabinoide, um importante regulador do eixo HPA (HILLARD, 2014), através da inibição da enzima amida hidrolase de ácido graxo (FAAH, do inglês *fatty acide amide hydrolase*), a qual é responsável pela degradação do endocanabinoide anandamida (AEA), resultando no aumento de seus níveis, o qual, por sua vez, ativa receptores-alvo de endocanabinoides, como os receptores CB1 e CB2 (BISOGNO et al., 2001). Além dos efeitos sobre receptores, o CBD também promove efeitos neuroplásticos, como o aumento da neurogênese hipocampal e da densidade de espinhas dendríticas no giro denteado do hipocampo (CAMPOS et al., 2013a, 2017; FOGAÇA et al., 2018; MORI et al., 2017), bem como do BDNF e da sinaptogênese no PFC (SALES et al., 2019). Ressalta-se que a modulação do sistema endocanabinoide pelo CBD possui grande importância no combate ao estresse, uma vez que o sistema endocanabinoide regula estruturas envolvidas na regulação do eixo HPA (HILL; MCEWEN, 2010), como o HPC e o PFC, os quais são implicados na resposta adaptativa ao estresse (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

O potencial anti-inflamatório do CBD foi documentado por diversos estudos, sendo observada redução de mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1 β em cultura de micróglia murina estimulada com LPS (DOS-SANTOS-PEREIRA et al., 2020), bem como da produção de óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) induzida por LPS em cultura de micróglia da linhagem BV-2 e cultura primária de micróglia de ratos (MARTÍN-MORENO et al., 2011). De maneira similar, modelos *in vivo* demonstraram que o tratamento com CBD reduziu os níveis proteicos de TNF- α no PFC de camundongos infectados por *S. pneumoniae* (BARICHELLO et al., 2012) e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS, do inglês *inducible nitric oxide synthase*) e de IL-1 β no hipocampo de camundongos inoculados com o peptídeo β -amiloide (ESPOSITO et al., 2007). Ademais, diferentes estudos demonstraram que o CBD induz o aumento dos níveis de IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória (BORRELLI et al., 2009; ESPOSITO et al., 2007; LIU et al., 2010).

Embora os mecanismos supracitados sejam de fundamental importância para o efeito anti-inflamatório do CBD, estudos recentes vêm investigando sua relação com a via do inflamassoma de NLRP3 (HARTMANN et al., 2022). Por exemplo, o tratamento com CBD reduziu a expressão gênica e os níveis proteicos da caspase-1 e IL-18 em células-tronco mesenquimais derivadas da gengiva de humanos (LIBRO et al., 2017), assim como a expressão gênica de mediadores como IL-6, IL-8, caspase-1 e NLRP3 em cultura de micróglia humana infectadas com o vírus HIV-1 (ARIAS et al., 2023) e inibiu a ativação do inflamassoma NLRP3 em monócitos humanos (LIU et al., 2020a). Também foi observada indução da autofagia em

células neurais tratadas com CBD (VRECHI et al., 2021), processo que está relacionado à neuroproteção e à inibição do inflamassoma de NLRP3 (BIASIZZO; KOPITAR-JERALA, 2020). Ademais, uma redução significativa da expressão gênica de IL-1 β e TNF- α e dos níveis proteicos dos componentes do inflamassoma de NLRP3, como NLRP3, ASC, caspase-1 ativa, pró-IL-1 β e IL-1 β foi observada nos hepatócitos de camundongos submetidos a uma dieta rica em lipídeos e colesterol, após o tratamento com CBD (HUANG et al., 2019). Além dessas evidências, foi demonstrado recentemente que o CBD é capaz de se ligar diretamente à enzima caspase-1, inibindo sua atividade em 15,7% (LIU et al., 2021). Esses dados sugerem uma importante relação entre o CBD e a via do inflamassoma de NLRP3 no que diz respeito à inflamação, que ainda permanece pouco investigada.

1.4. Inflamassoma de NLRP3

O sistema imune inato é considerado a primeira linha de defesa do organismo contra estímulos danosos que representam perigo. Para isso, diversas células do sistema imune, tais como macrófagos, monócitos, neutrófilos, células dendríticas e micróglias, expressam proteínas capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen associated molecular patterns*) e a danos (DAMPs, do inglês *damage associated molecular patterns*), chamados receptores de reconhecimento padrão (PRR, do inglês *pattern recognition receptors*). Embora cruciais para a defesa do organismo, a ativação dos PRRs pode resultar em uma extensa produção de citocinas, capazes de induzir respostas inflamatórias e causar danos teciduais (KELLEY et al., 2019; LI; WU, 2021; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Atualmente, quatro famílias de PRRs foram identificadas: receptores extracelulares como os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll like receptors*) e receptores de lectina do tipo C (CLRs, do inglês *C-type lectin receptors*), e receptores intracelulares, como os receptores do tipo RIG (RLRs, do inglês, *Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors*) e os receptores do tipo NOD (NLRs, do inglês *Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Os PRRs induzem respostas imunológicas e inflamatórias através de diversas vias, sendo uma delas a formação de complexos multiproteicos citosólicos chamados de inflamassomas (KELLEY et al., 2019; UNTERHOLZNER et al., 2010). Identificados em 2002, os inflamassomas atuam como sensores intracelulares e plataformas para a ativação da enzima inflamatória caspase-1, -4 e -5 em seres humanos e -1 e -11 em camundongos, induzindo respostas inflamatórias potentes. Nesse contexto, embora diversos PRRs sejam capazes de identificar ambos PAMPs e DAMPs,

apenas algumas famílias, como os NLRs, por exemplo, são capazes de formar inflamassomas (KELLEY et al., 2019; SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

Os receptores do tipo NLR são caracterizados por sua estrutura contendo três domínios: um domínio carboxi-terminal rico em repetições de leucina (LRR, do inglês *leucine-rich repeats*), um domínio central ligante de nucleotídeo (NOD, do inglês *nucleotide oligomerization domain*), responsável pela ativação do inflamassoma através da oligomerização dependente de ATP e um domínio amino-terminal de pirina (PYD, do inglês *pyrin domain*) ou recrutador de caspase (CARD, do inglês *caspase recruitment domain*), cuja função é mediar interações proteína-proteína (SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Em sua conformação inativa, as regiões efetoras são bloqueadas pelo domínio LRR, o qual, ao se ligar a moléculas ativadoras, altera sua estrutura, expondo o domínio NOD e permitindo sua ligação ao ATP, culminando na oligomerização e ativação do inflamassoma (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002).

Dentre as subfamílias dos NLRs, o NLRP3, foco do presente estudo, foi identificado como um mediador essencial da ativação da IL-1 β e da IL-18 e relacionado à diferentes alterações comportamentais e moleculares induzidas pelo estresse (HARTMANN et al., 2022; IWATA et al., 2016; KELLEY et al., 2019). Presente em macrófagos e micróglia, esse complexo é constituído por um receptor do tipo NOD (NLRP3), uma proteína adaptadora associada à apoptose (ASC, do inglês *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain*) e a enzima efetora, caspase-1, em sua isoforma inativa, pró-caspase-1 (SCHRODER; TSCHOPP, 2010; SHEEDY et al., 2013). A ASC é um componente essencial para a atividade do inflamassoma de NLRP3, uma vez que a interação proteína-proteína entre seu domínio PYD com o domínio PYD do receptor NLRP3 é crítica para a ativação do inflamassoma (STUTZ et al., 2017; VAJJHALA; MIRAMS; HILL, 2012), e por ser responsável pelo recrutamento da caspase-1 (FRANCHI et al., 2009; MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002).

Diversos PAMPs e DAMPs podem desencadear a ativação do inflamassoma de NLRP3, tais como o ATP, baixas concentrações de potássio intracelular, espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), além de alguns vírus e toxinas bacterianas (IWATA; OTA; DUMAN, 2013; MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002; SCHRODER; TSCHOPP, 2010), através de diferentes vias. A via canônica consiste em duas etapas: a etapa de *priming* e a de ativação, sendo necessários dois sinais para induzir a ativação do inflamassoma. Na etapa de *priming*, PAMPs e DAMPs estimulam o aumento da expressão gênica dos componentes do

inflamassoma de NLRP3 através da via do fator nuclear κ B (NF- κ B, do inglês *nuclear factor κ B*) ou vias não-transcricionais (BAUERNFEIND et al., 2009; FRANCHI; EIGENBROD; NÚÑEZ, 2009; HARDER et al., 2009; LAMKANFI; KANNEGANTI, 2010; SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Já na etapa de ativação, PAMPs e DAMPs induzem a junção dos componentes do inflamassoma, permitindo sua oligomerização e o recrutamento da pró-caspase-1, a qual se auto-cliva em sua isoforma ativa e, por sua vez, cliva as interleucinas pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas ativas, IL-1 β e IL-18, respectivamente (KELLEY et al., 2019; SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

A neuroinflamação mediada por interleucinas, em especial a IL-1 β , tem sido relacionada com transtornos psiquiátricos e, dessa forma, o inflamassoma de NLRP3, como um modulador dessa citocina, também vem sendo estudado nesse contexto. Pacientes não tratados diagnosticados com transtorno depressivo maior apresentaram aumento da expressão gênica e proteica do NLRP3 e de caspase-1 em células mononucleares sanguíneas, bem como dos níveis séricos de IL-1 β e IL-18 (ALCOCER-GÓMEZ et al., 2014), enquanto pacientes em tratamento com antidepressivos de diferentes classes apresentaram reduções desses efeitos (ALCOCER-GÓMEZ et al., 2017). Similarmente, camundongos machos submetidos a 8 semanas de IS apresentaram alterações comportamentais como prejuízo cognitivo e comportamento tipo-depressivo e ansioso associados ao aumento dos níveis proteicos de NLRP3, caspase-1, IL-1 β e IL-18 no HPC (LI et al., 2021b; NIU et al., 2020). Ademais, a administração de MCC950, um inibidor seletivo do inflamassoma de NLRP3, durante as 3 últimas semanas do protocolo de IS atenuou tanto as alterações moleculares quanto as comportamentais (LI et al., 2021b).

Resultados semelhantes foram observados em camundongos e ratos submetidos a outros protocolos de estresse, como estresse de restrição (ALCOCER-GÓMEZ et al., 2016; FENG et al., 2019), estresse crônico variado (ASHRAF et al., 2019; CAI et al., 2020; DENG et al., 2015; GENG et al., 2019; IWATA et al., 2016), e em modelo de privação de sono (LI et al., 2018) sugerindo que o NLRP3 consiste em um componente de grande importância para os processos de neuroinflamação decorrentes do estresse, tornando-o um alvo interessante de estudos acerca da neurobiologia de transtornos psiquiátricos e na busca de novos alvos terapêuticos para o tratamento desses transtornos.

2. HIPÓTESE

Considerando a possível suscetibilidade da adolescência ao estresse, o dimorfismo sexual nos efeitos do estresse, aliado às evidências da ativação do inflamassoma de NLRP3 em regiões do SNC de camundongos submetidos ao IS crônico e aos efeitos do CBD nas respostas ao estresse e na atenuação de respostas neuroinflamatórias, a hipótese do presente trabalho foi a de que o IS seria capaz de promover alterações comportamentais através da via do inflamassoma de NLRP3 no SNC de camundongos fêmeas adolescentes e adultas, processo que poderia ser atenuado pelo tratamento crônico com CBD.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar se há alteração da via do inflamassoma de NLRP3 induzida pelo IS na adolescência ou vida adulta e se os possíveis efeitos do CBD em atenuar as alterações comportamentais do IS envolvem a modulação dessa via.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar as alterações comportamentais decorrentes do IS em camundongos fêmeas.
- Comparar as diferenças entre a exposição ao IS durante a adolescência e a vida adulta.
- Avaliar a expressão gênica do NLRP3, ASC, caspase-1 e IL-1 β , no PFC de animais submetidos a estresse por IS.
- Analisar os efeitos induzidos pelo tratamento com CBD frente às alterações provocadas pelo IS.
- Investigar o efeito do tratamento com CBD sobre a expressão gênica do NLRP3, ASC, caspase-1 e IL-1 β , no PFC dos animais submetidos ao IS.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos fêmeas da linhagem CD-1 (n=9-16/grupo) adultas (8 semanas, 26-33 g) ou adolescentes (4 semanas, 12-18 g), provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), foram utilizados para os experimentos 1 e 2, respectivamente. Os animais adultos foram habituados ao biotério da Disciplina de Farmacologia do Departamento de Ciências BioMoleculares da FCFRP/USP (biotério de manutenção para experimentação) durante uma semana, antes do início dos protocolos experimentais. Em virtude da curta duração da adolescência em roedores, período de interesse do estudo, e da impossibilidade de obter os animais adolescentes antes de 4 semanas de idade, esses não passaram por período de habituação.

Todos os animais foram mantidos em gaiolas ventiladas, feitas de polissulfona (PSU), com água potável e ração *ad libitum*, sob condições padronizadas de temperatura (24 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 6h). Os animais agrupados foram alocados em gaiolas conjuntas (38,6 x 25,1 x 24 cm; Alesco, Brasil) em grupos de 5-6 animais por gaiola, enquanto os animais isolados foram mantidos em gaiolas individuais (31,6 x 21,6 x 20,7 cm; Alesco, Brasil). Todos os esforços para minimizar o sofrimento animal foram realizados e todos os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética da FCFRP/USP (n° 21.1.522.60.3) (Anexo A).

4.2. Drogas

Os animais receberam Canabidiol (CBD; BSPG Pharma) nas doses de 3, 10 ou 30 mg/Kg ou veículo, ambos dissolvidos em 3% de Tween 80 em salina isotônica estéril e administrados no volume final de 10 mL/Kg, por via intraperitoneal (i.p.) durante 19 dias (HARTMANN et al., 2019).

4.3. Modelos animais

Os modelos animais permitem mimetizar contextos e condições humanas, e possuem a grande vantagem de elucidar efeitos e mecanismos que seriam difíceis de serem estudados em seres-humanos. A qualidade desses modelos é avaliada, principalmente, através dos critérios de validade, os quais vêm sendo utilizados desde 1960 (BELZUNG; LEMOINE, 2011).

4.3.1. *Protocolo de isolamento social crônico*

O protocolo de IS consistiu em alocar os animais em gaiolas transparentes de PSU, em grupos de 5-6 animais por gaiola (38,6x25,1x24cm), ou individualmente (31,6x21,6x20,7cm), durante um período de 33 dias (LUKKES et al., 2009; WALKER et al., 2019). O protocolo de tratamento teve início no 14º dia de IS e os testes comportamentais, realizados ao longo de 6 dias, tiveram início no 28º dia de protocolo, durante os quais o IS não foi interrompido.

4.3.2. *Protocolo de tratamento*

Como demonstrado nas Figuras 1 e 2, após 14 dias de IS, os animais passaram a receber veículo ou CBD nas doses de 3, 10 ou 30 mg/Kg/10 mL, diariamente, por via intraperitoneal. O tratamento foi realizado até o final do experimento, para evitar possível efeito de retirada, entre as 14h e 16h, para evitar efeitos agudos da droga nos testes. Os animais foram pesados em dias alternados, para correção do volume de administração.

4.3.3. *Acompanhamento de peso*

A partir de sua chegada no biotério da Disciplina de Farmacologia do Departamento de Ciências Biomoleculares da FCFRP/USP, todos os animais passaram por avaliações semanais de peso corporal, ao longo do protocolo experimental, para identificar alterações no peso corporal induzidas pelo estresse ou pelo tratamento.

4.3.4. *Acompanhamento de ciclo estral*

Considerando evidências de que protocolos de estresse são capazes de induzir alterações no ciclo estral de roedores (BREEN et al., 2012; XU et al., 2018), os animais adultos passaram por análises semanais de ciclo estral, através da técnica de lavado vaginal. A coleta consistiu, primeiramente, em injetar e aspirar 30 µL de salina isotônica estéril na abertura do canal vaginal das fêmeas. Logo em seguida, o líquido coletado foi depositado sobre uma lâmina de vidro e analisado a fresco. As fases do ciclo estral (pró-estro, estro, metaestro e diestro) foram identificadas em microscópio de luz de acordo com a diferenciação celular (CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015). A decisão de realizar as análises de ciclo estral semanalmente, e não diariamente, teve como base a referência de que coletas repetidas induzem comportamento tipo-depressivo em camundongos (VAROL; ESEN; KOÇAK, 2022). Dessa forma, as coletas foram realizadas em dias distantes para evitar interferências com o modelo de estresse investigado.

4.3.5. Testes comportamentais

4.3.5.1. Teste do campo aberto (OFT, do inglês *open field test*)

O estresse pode levar a alterações psicomotoras nos animais através de alterações na sua locomoção. Nesse sentido, o OFT é um modelo amplamente utilizado para avaliar possíveis efeitos na atividade locomotora induzidos por drogas ou pelo estresse. O OFT também pode ser utilizado para avaliar o comportamento tipo-ansioso, uma vez que a arena utilizada no teste consiste em um ambiente novo para o animal (BECKER; PINHASOV; ORNOY, 2021).

Os animais foram colocados individualmente na periferia de uma arena circular cercada por paredes de acrílico (30cm de diâmetro e 50cm de altura), e permitidos explorá-la livremente durante 20 minutos. A duração de 20 minutos foi utilizada para constituir a sessão de habituação do teste de reconhecimento de objetos (NOR, do inglês *novel object recognition test*) a ser realizado no dia seguinte, sendo que apenas os primeiros 5 minutos foram considerados para as análises comportamentais referentes ao OFT. As sessões foram gravadas e a distância total percorrida (m), tempo (s) no centro e a razão da distância percorrida na periferia (m) pela distância total percorrida (m) dos 5 primeiros minutos foram analisados através do software Any-Maze (V. 4.5, Stoelting, IL, USA). Ao fim de cada teste, as arenas foram limpas com álcool 70% a fim de eliminar pistas olfatórias.

4.3.5.2. Teste de borrifagem de sacarose (ST, do inglês *splash test*)

A anedonia, definida como a redução da capacidade de sentir prazer frente a estímulos usualmente prazerosos, é um dos principais sintomas do transtorno depressivo (GORWOOD, 2008) e pode ser avaliada, em roedores, através do ST. Esse modelo se baseia no comportamento de autocuidado induzido pela aplicação de uma solução de sacarose (10% diluída em água) no dorso dos animais. A redução do comportamento de autolimpeza é associada ao comportamento motivacional e de autocuidado reduzido, semelhante ao observado no fenótipo depressivo (BECKER; PINHASOV; ORNOY, 2021).

Para avaliação desse comportamento, a solução contendo sacarose foi aplicada no dorso dos animais com o auxílio de um pincel, os quais foram colocados, em seguida, em caixas de acrílico individuais contendo 25g de maravalha oriunda de suas respectivas caixas-casa, durante 6 minutos. O teste foi gravado e o tempo total de autolimpeza foi cronometrado por experimentador cego aos grupos experimentais.

4.3.5.3. Teste de reconhecimento de objetos (NOR, do inglês *novel object recognition test*)

O NOR é um teste amplamente utilizado para avaliação da capacidade de aprendizado e memória dos animais através do reconhecimento de um objeto novo inserido no ambiente, o qual se baseia na natureza exploratória inata dos roedores (ANTUNES; BIALA, 2012). O teste consiste em 3 sessões: aquisição, memória de curto prazo (STM, do inglês *short-term memory*), e memória de longo prazo (LTM, do inglês *long-term memory*). Durante a sessão de aquisição, os animais foram colocados individualmente em uma arena, por 5 minutos, onde foram previamente habituados, contendo 2 objetos idênticos (A+A). Após 1 hora, foi realizada a sessão de STM: os animais foram novamente colocados na arena, em que um dos objetos foi substituído (A+B), e permitidos explorá-los livremente por 5 minutos. Da mesma forma, após 24 horas, a sessão de LTM foi realizada como a de STM, novamente substituindo um dos objetos (A+C). Para eliminar pistas olfatórias, a arena e os objetos foram limpos com álcool 70% entre os testes de cada animal. O tempo de interação do animal com cada objeto foi analisado pelo software Any-Maze (V. 4.5, Stoelting, IL, USA) e o índice de discriminação foi calculado através da fórmula: $ID = (\text{objeto novo} - \text{objeto familiar}) / (\text{objeto familiar} + \text{objeto novo})$. A redução do tempo de interação com o objeto novo é associada ao *déficit* cognitivo, uma vez que quando expostos a um objeto novo e um familiar, os animais tendem a passar mais tempo explorando o objeto novo (ANTUNES; BIALA, 2012).

4.3.5.4. Teste de preferência social (SPT, do inglês *social preference test*) e teste de interação social (SIT, do inglês *social interaction test*)

Um importante aspecto comportamental dos animais é a motivação social, a qual pode ser influenciada por eventos estressores, particularmente estresses sociais, como o IS (NIESINK; VAN REE, 1982; RAMSEY et al., 2022). Nesse sentido, modelos como o SIT, o qual se baseia na busca por interação social na ausência de outros estímulos ou reforços, e o SPT, que avalia a preferência por interagir com um parceiro social ao invés de outro estímulo, como a comida, podem ser utilizados para avaliação da motivação social.

Nesses testes, foi utilizada uma arena retangular (57x40x25cm) dividida em 3 câmaras idênticas (19x40x25cm), cujas câmaras laterais continham uma gaiola de metal (10x10x9cm), conforme ilustrado na Figura 1. As gaiolas de metal foram deixadas vazias durante a sessão de habituação, enquanto que no SPT, uma das gaiolas continha um animal-estímulo desconhecido

de mesma linhagem, idade e sexo, e a outra, 5 pellets de ração. Já no SIT, uma das gaiolas continha um animal-estímulo, enquanto a outra foi deixada vazia. Para a realização do SPT, os animais foram mantidos em jejum alimentar de 18h (REPPUCCI; VEENEMA, 2020).

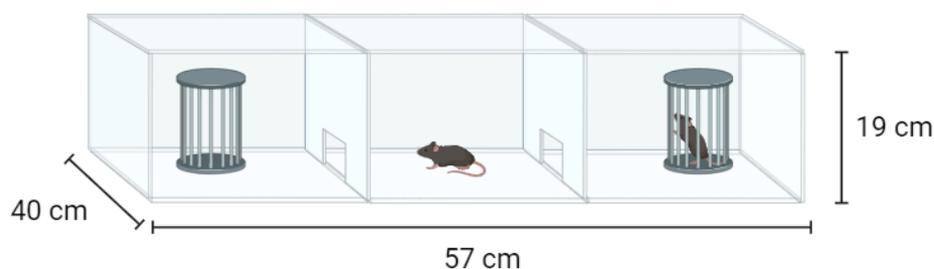


Figura 1. Representação gráfica da arena utilizada para os testes de preferência e interação social.

Os animais foram individualmente submetidos à sessão de habituação à arena, durante a qual foram permitidos explorá-la por 10 minutos. Nos dias respectivos dos testes, os animais foram colocados individualmente na câmara central e permitidos explorar qualquer uma das câmaras durante 10 minutos. O tempo interagindo com cada gaiola foi cronometrado pelo software Any-Maze (V. 4.5, Stoelting, IL, USA) para os cálculos de preferência por interagir com o animal-estímulo, através da fórmula: $\text{Preferência social (\%)} = \left\{ \frac{\text{tempo interagindo com o animal}}{\text{tempo interagindo com o animal} + \text{tempo interagindo com a ração}} \right\} * 100$ e de interação social, através da fórmula: $\text{Interação social (\%)} = \left\{ \frac{\text{tempo interagindo com o animal}}{\text{tempo interagindo com o animal} + \text{tempo interagindo com a gaiola vazia}} \right\} * 100$.

4.3.5.5. Teste de alimentação suprimida pela novidade (NSFT, do inglês *novelty suppressed feeding test*)

Sabe-se que o estresse é capaz de induzir comportamento tipo-ansioso, o qual pode ser avaliado por diversos testes, sendo um deles o NSFT. Esse teste consiste em submeter o animal a 24h de privação alimentar e, então, inseri-lo em uma caixa contendo um único pellet de ração em uma plataforma central focalmente iluminada. Então, analisa-se o tempo necessário para o animal superar o conflito entre o desejo de comer e a relutância de adentrar uma área aberta e iluminada, a qual é aversiva (SANTARELLI et al., 2003).

Os animais foram colocados individualmente em uma caixa (41x34x18 cm), contendo quantidade de maravalha limpa suficiente para cobrir o chão e um pellet de ração sobre uma plataforma iluminada diretamente. A latência para o animal se alimentar foi quantificada até o tempo máximo de 10 minutos. Mediante a constatação de que o pellet havia sido mordido e o

animal havia iniciado o comportamento de alimentação, esses foram devolvidos à suas caixas-casa, onde a latência para se alimentar foi novamente quantificada, até o tempo máximo de 5 minutos, para normalizar possíveis alterações no apetite dos animais (FOGAÇA et al., 2018). A razão entre as duas latências foi calculada utilizando a fórmula: $r = (\text{latência para se alimentar na caixa teste} / \text{latência para se alimentar na caixa casa})$.

4.3.5.6. Teste do nado forçado (FST, do inglês *forced swimming test*)

O FST é um dos modelos mais utilizados para a triagem de novos compostos com efeito tipo-antidepressivo (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977). Para sua execução, cada camundongo foi colocado individualmente em um recipiente cilíndrico aberto (17 cm de diâmetro, 25 cm de altura) preenchido com 15 cm de água a 25 ± 1 °C. Nesse contexto, não há possibilidade de fuga e o animal é forçado a nadar por 6 minutos. A água foi trocada entre cada animal para o controle de temperatura e evitar a influência de substâncias de alarme. A quantidade total de tempo que cada animal permaneceu imóvel durante a sessão foi registrada e posteriormente analisada por um experimentador cego aos grupos experimentais. Neste teste, a postura imóvel do animal reflete um estado de comportamento de desamparo e resignação frente a situação estressora.

4.3.6. Coleta de órgãos e estruturas

Imediatamente após os animais saírem do teste do FST, eles foram eutanasiados com auxílio de guilhotina, sem anestesia prévia, para evitar interferências nas dosagens propostas. Em seguida, as adrenais e o baço foram removidos, dissecados e pesados. Quando apenas uma glândula adrenal pôde ser removida com sucesso, seu peso foi duplicado para a análise estatística. O PFC foi coletado por dissecação para posterior análise molecular através da técnica de RT-qPCR.

4.4. Análises moleculares

4.4.1. Análise de PCR em tempo real (RT-qPCR)

Para avaliar o efeito do IS e do tratamento com CBD na dose de 10 mg/Kg (com base nos resultados comportamentais) sobre a expressão gênica de componentes relacionados à via do inflamassoma de NLRP3, foi realizada a análise de PCR em tempo real (qPCR) para quantificar os genes de interesse em amostras do PFC dos animais adultos dos grupos Agrupado-Veículo (A-V), Agrupado-CBD 10 (A-10), Isolado-Veículo (I-V) e Isolado-CBD 10

(I-10). O RNA foi isolado utilizando o método de Trizol (Ambion), conforme as instruções do fabricante, e sua concentração foi determinada utilizando o equipamento de espectrofotometria Nanodrop. Para a síntese da fita complementar de DNA (cDNA) foram utilizados 50ng do RNA total extraído, o qual foi submetido à reação de transcriptase reversa utilizando o kit High-Capacity Cdna Reverse Transcription Kit (Thermofisher). Para a execução da RT-qPCR foi utilizado o meio reacional High ROX (PCRbiosystem) e as sondas taqman para detecção dos genes de interesse: IL-1 β (Mm00434228_m1), NLRP3 (Mm00840904_m1), caspase-1 (Mm00438023_m1) e β -actina (4352341E). A reação foi realizada no equipamento StepOne Plus e a expressão gênica de cada amostra foi obtida pelo método de quantificação relativa de $\Delta\Delta CT$. Para cada amostra o ciclo de quantificação (Cq) foi medido e subtraído pelo ciclo de quantificação do controle endógeno. Portanto, os resultados foram normalizados pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ e expressos como a indução da expressão relativa ao grupo controle, A-V.

4.5. Delineamento experimental

4.5.1. Experimento 1 - Animais adultos

Ao chegarem no biotério de manutenção para experimentação, os animais adultos foram alocados em grupos de 5-6 animais por gaiola, em gaiolas ventiladas (38,6 x 25,1 x 24 cm, Alesco, Brasil), e aclimatados durante uma semana. Após esse período, os animais foram submetidos ao OFT para determinação das medidas basais de atividade locomotora e comportamento tipo-ansioso, seguido do ST para determinação do comportamento tipo-depressivo basal. De modo a normalizar diferenças basais na atividade locomotora, os animais foram distribuídos entre os grupos experimentais de acordo com a distância total percorrida no OFT. Na sequência, os animais foram alocados em gaiolas de PSU, transparentes e ventiladas individualmente (isolados) ou em grupos de 5-6 animais por gaiola (agrupados), onde foram mantidos durante 33 dias, até o fim dos testes comportamentais. A avaliação do peso corporal foi realizada na chegada dos animais (dia -7), e nos dias 1, 7, 14, 28 e 33 do protocolo experimental. A coleta de lavado vaginal foi realizada nos dias 7, 14, 21, 28 e 33 do protocolo experimental.

A partir do 14º dia após o início do IS, os animais passaram a receber, diariamente, no período vespertino, os respectivos tratamentos (veículo ou CBD nas doses de 3, 10 ou 30 mg/Kg; i.p.). Os testes comportamentais foram iniciados no 28º dia do protocolo experimental, e seguiram a sequência descrita abaixo (Figura 1). No dia 33, os animais foram eutanasiados

imediatamente após o FST, com auxílio de guilhotina, sem anestesia prévia. As estruturas foram coletadas conforme descrito no item 4.3.6 para posterior análise molecular.

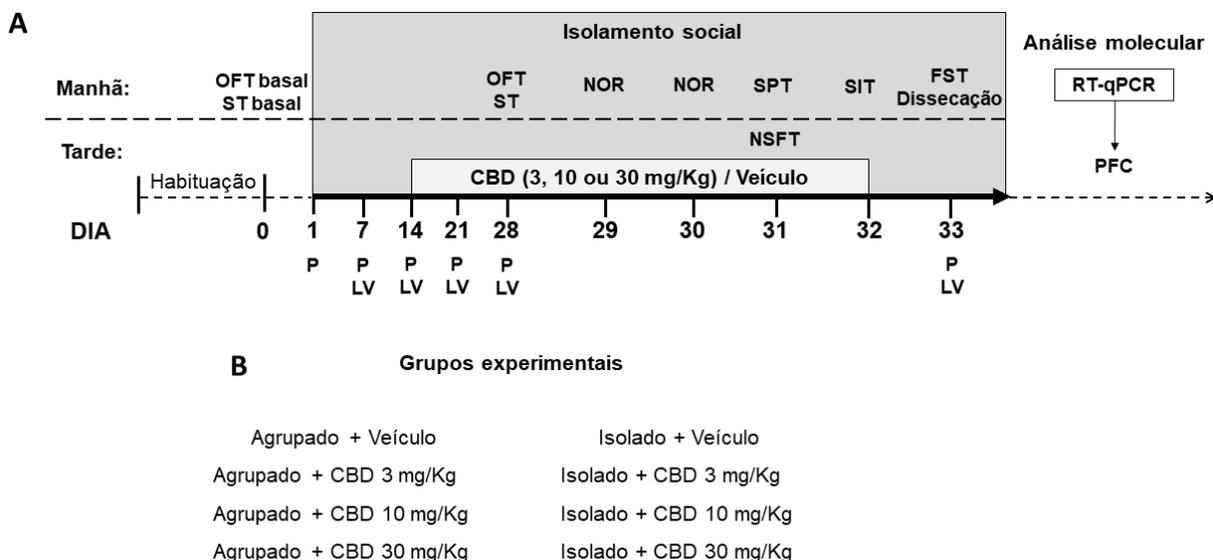


Figura 2. Delineamento experimental do experimento 1. A) Representação gráfica do delineamento experimental do experimento 1. B) Grupos experimentais do experimento 1. P: avaliação do peso corporal; LV: lavado vaginal; OFT: teste do campo aberto (do inglês *open field test*); ST: *splash test*; NOR: teste de reconhecimento de objetos (do inglês *novel object recognition test*); SPT: teste de preferência social (do inglês *social preference test*); NSFT: teste de alimentação suprimida pela novidade (do inglês *novelty suppressed feeding test*); SIT: teste de interação social (do inglês *social interaction test*); FST: teste do nado forçado (do inglês *forced swimming test*); CBD: canabidiol; PFC: córtex pré-frontal (do inglês *prefrontal cortex*).

4.5.2. Experimento 2 - Animais adolescentes

Conforme mencionado anteriormente, em razão da impossibilidade de obter os animais antes de completarem 4 semanas de idade, não foi possível submetê-los ao período de aclimatação específico e aos testes comportamentais basais. Dessa forma, ao chegarem no biotério de manutenção para experimentação, os animais adolescentes foram pesados, distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais e imediatamente alocados em gaiolas conjuntas (5-6 animais por gaiola) ou individuais. O peso dos animais foi avaliado nos dias 1, 7, 14, 21, 28 e 33 do protocolo experimental.

A partir do 14º dia do protocolo experimental, os animais passaram a receber veículo ou CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg) por via i.p., todas as tardes. A partir do 28º dia, os testes comportamentais foram iniciados, de acordo com a ordem representada abaixo (Figura 2). No

dia 33, os animais foram eutanasiados imediatamente após o FST, com auxílio de guilhotina, sem anestesia prévia. As estruturas foram coletadas conforme descrito no item 4.3.6.

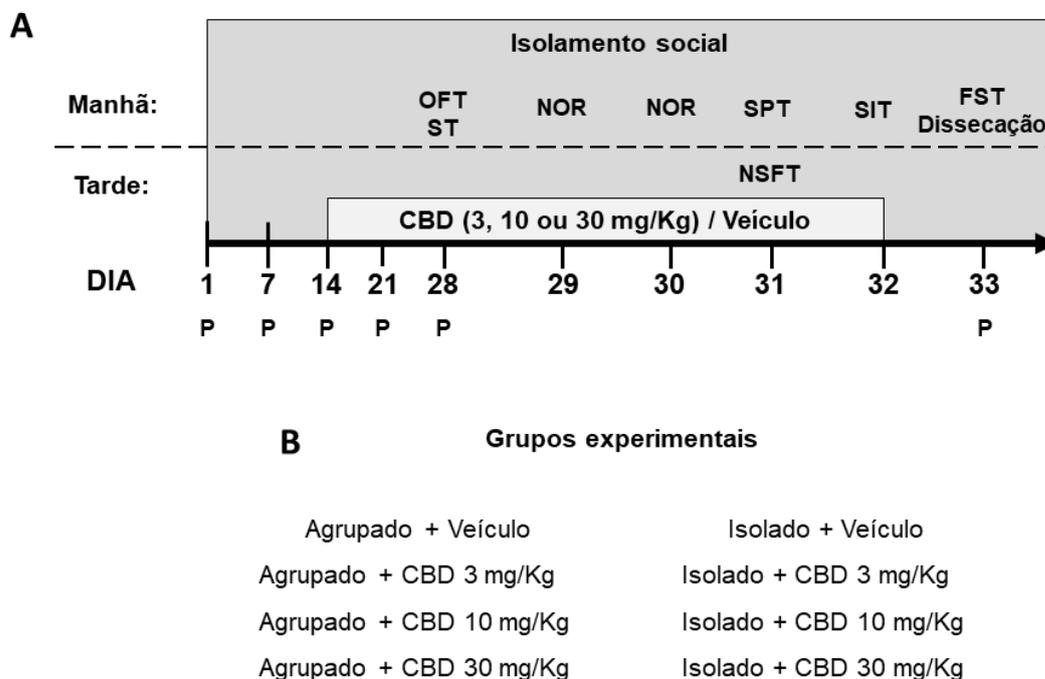


Figura 3. Delineamento experimental do experimento 2. A) Representação gráfica do delineamento experimental do experimento 2. B) Grupos experimentais do experimento 2. OFT: teste do campo aberto (do inglês *open field test*); ST: *splash test*; NOR: teste de reconhecimento de objetos (do inglês *novel object recognition test*); SPT: teste de preferência social (do inglês *social preference test*); NSFT: teste de alimentação suprimida pela novidade (do inglês *novelty suppressed feeding test*); SIT: teste de interação social (do inglês *social interaction test*); FST: teste do nado forçado (do inglês *forced swimming test*); CBD: canabidiol; PFC: córtex pré-frontal (do inglês *prefrontal cortex*).

4.6. Análise estatística

Os dados referentes aos testes comportamentais foram analisados por análise de variância de duas vias (2-way ANOVA), com a condição (IS) e o tratamento (veículo, CBD 3, CBD 10 e CBD 30) como fatores independentes. Quando identificado efeito de interação entre os fatores, os dados foram submetidos à análise de comparações múltiplas pelo pós-teste de Tukey.

Quando identificados efeitos principais de condição ou tratamento na ausência de interação entre os fatores, foi realizada análise da distribuição dos valores pelo teste de Shapiro-Wilk, para verificar se os valores obedeciam a distribuição normal, e ao teste de homogeneidade de variâncias de Fisher ou Brown-Forsythe, de acordo com o número de grupos analisados.

Dados normais e homogêneos foram comparados pelo teste *t* de Student, para avaliação do efeito de condição entre os grupos Agrupado-Veículo (A-V) e Isolado-Veículo (I-V), ou análise de variância de uma via (One-way ANOVA), para avaliar o efeito principal de tratamento através da comparação dos grupos tratados com CBD com seus respectivos grupos controle, dentro de cada condição, separadamente. Dados não-homogêneos, mas com a distribuição normal, foram analisados pelo teste *t* de Student com a correção de Welch ou ANOVA de uma via com a correção de Brown-Forsythe. Dados que não obedecessem a distribuição normal, foram analisados por teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, para avaliar os efeitos de condição e tratamento, respectivamente. Quando identificada diferença entre os grupos pela ANOVA de uma via, ou pelo teste de Kruskal-Wallis, os dados foram comparados pelo pós-teste de Dunnett, ou Dunn, respectivamente.

Os dados de cada teste foram submetidos uma única vez à análise de valores extremos (*outliers*) através do método de ROUT (Q=1%). Os valores identificados como *outliers* foram excluídos daquela análise e do cálculo da estatística Z.

Foi realizada análise de correlação de Spearman entre os fatores: peso corporal, dose de CBD administrada (0, 3, 10 ou 30) e semana do protocolo experimental, para identificar influências do período do experimento ou do tratamento com CBD sobre o peso dos animais.

Todos os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média. O nível de significância estatística assumido foi de 95% ($p \leq 0,0500$) e os limites de tendência estatística utilizados foram $0,0500 > p \geq 0,0999$. As análises foram conduzidas através do *software* GraphPad Prism (versão 9).

4.6.1. Análise comportamental através da estatística Z

Visando reduzir a variabilidade amostral e gerar um valor geral referente a quão emocionalmente afetados os animais se encontravam, foi calculado o Z-score, utilizando a fórmula ilustrada na Figura 3 (GUILLOUX et al., 2011).

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

X é o valor observado para o animal no parâmetro em questão
 μ é a média do grupo controle no parâmetro em questão
 σ é o desvio padrão do grupo controle no parâmetro em questão

Figura 4. Equação utilizada para o cálculo da estatística Z.

Os parâmetros utilizados para esta análise estão representados na Tabela 1. Uma vez que os dados obtidos no NOR não refletem o estado emocional dos animais, e sim sua capacidade cognitiva, esses não foram utilizados para esta análise.

Tabela 1- Parâmetros dos testes comportamentais utilizados no cálculo da estatística Z

Teste comportamental	Parâmetro utilizado
OFT	Distância percorrida na periferia (%) Tempo no centro (s)
ST	Tempo de autolimpeza (s)
SPT	Tempo de interação com o animal estímulo (s)
NSFT	Latência para se alimentar na caixa teste (s)
SIT	Tempo de interação com o animal estímulo (s)
FST	Tempo de imobilidade nos últimos 4 minutos (s)

Fonte: Elaborada pelos autores.

Foi calculada a média dos valores de Z dos dois parâmetros do OFT para obtenção do valor de Z referente a este teste. Em seguida, foi realizada a média dos valores de Z dos demais testes comportamentais, para cada animal, individualmente, para obtenção do valor do Z-score geral de cada animal. Este cálculo está representado na Figura 4. A dimensionalidade adotada correspondeu a quanto menores os valores de Z-geral, menos emocionalmente afetados os animais estavam.

$$Z_{\text{geral}} = \frac{Z_{\text{OFT}} + Z_{\text{ST}} + Z_{\text{SPT}} + Z_{\text{SIT}} + Z_{\text{FST}} + Z_{\text{NSFT}}}{6}$$

Figura 5. Equação do valor de Z geral. OFT: teste do campo aberto (do inglês *open field test*); ST: *splash test*; SPT: teste de preferência social (do inglês *social preference test*); NSFT: teste de alimentação suprimida pela novidade (do inglês *novelty suppressed feeding test*); SIT: teste de interação social (do inglês *social interaction test*); FST: teste do nado forçado (do inglês *forced swimming test*).

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1 - Avaliação dos efeitos do estresse de isolamento social e do tratamento com CBD em camundongos fêmeas adultas

5.1.1. Testes comportamentais

5.1.1.1. Teste do campo aberto (OFT, do inglês *open field test*)

Em relação à distância total percorrida, não foram identificadas diferenças entre os grupos antes do início do experimento (interação: $F_{(3, 102)} = 0,08883$, $p=0,9660$; condição: $F_{(1, 102)} = 0,1596$, $p=0,6904$; tratamento: $F_{(3, 102)} = 0,3129$, $p=0,8160$; Fig. 6A), indicando uma atividade locomotora basal similar entre os animais nos diferentes grupos experimentais. Por outro lado, após o IS, apesar de não haver interação entre os fatores ($F_{(3, 99)} = 1,021$, $p=0,3869$), ou efeito de tratamento ($F_{(3, 99)} = 1,169$, $p=0,3254$), foi identificado efeito significativo de condição, o que sugere que o isolamento induziu comportamento hiperlocomotor nos animais independente do tratamento recebido ($F_{(1, 99)} = 18,73$, $p<0,0001$; Fig. 6B). A análise aprofundada dos efeitos principais demonstrou que não houve diferença significativa na distância total percorrida entre os grupos A-V e I-V ($t=1,626$, $df=29$, $p=0,1148$; Fig. 6C).

Considerando que o OFT basal poderia ter levado os animais a se habituarem à arena, foi analisada a razão entre os dados da distância total percorrida no teste e no OFT basal. Esta análise demonstrou novamente ausência de interação entre os fatores ($F_{(3, 100)} = 1,053$, $p=0,3726$) e de efeito principal do tratamento ($F_{(3, 100)} = 0,9464$, $p=0,4213$), entretanto, novamente um efeito principal do IS foi observado ($F_{(1, 100)} = 27,02$, $p<0,0001$; Fig. 6D). Neste caso, ao corrigir o parâmetro pela medida basal, a análise da razão indicou um perfil de aumento da locomoção induzido pelo isolamento ($t=1,984$, $df=29$, $p=0,0567$; teste t de Student Fig. 6E).

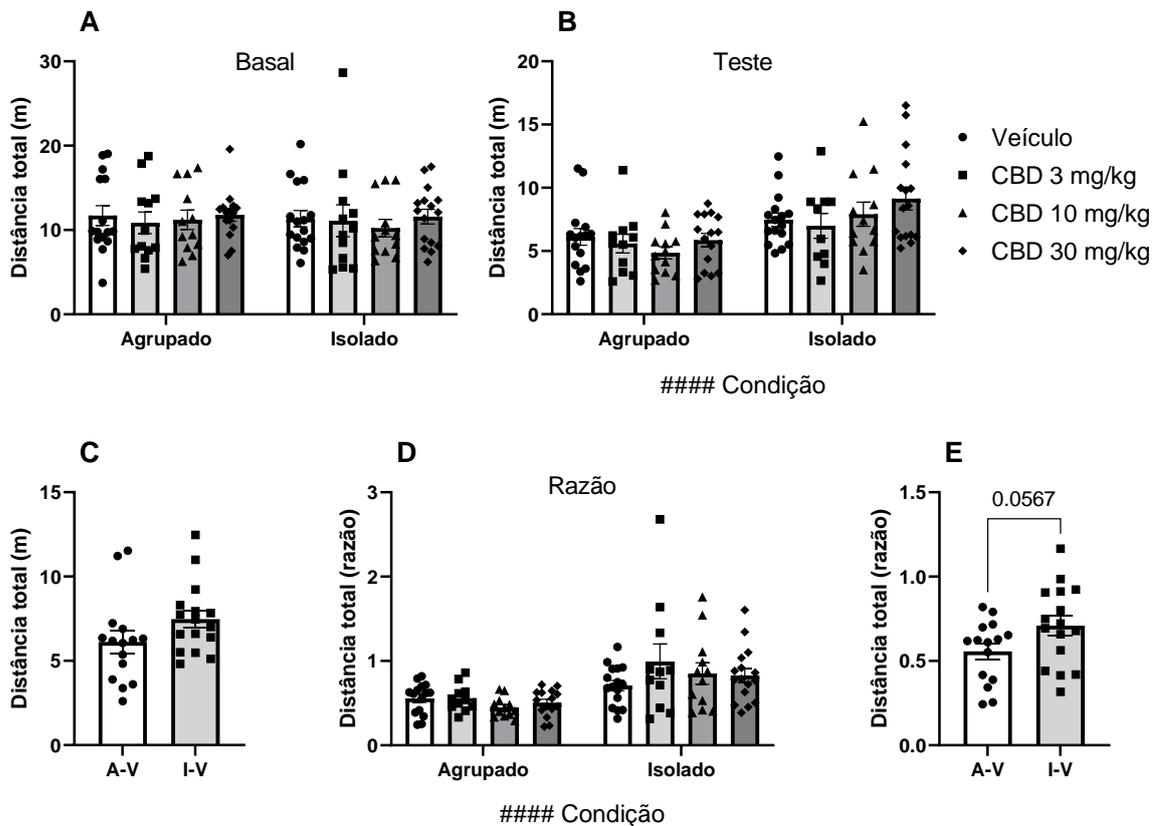


Figura 6. Experimento 1 - Avaliação da atividade locomotora pelo OFT. A) Distância total percorrida no OFT basal e B) no OFT. C) Comparação entre a distância percorrida pelos grupos A-V e I-V. D) Razão da distância total percorrida no OFT pelo OFT basal. E) Comparação entre a razão da distância total percorrida pelos grupos A-V e I-V. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A, B e D) ou teste t de Student (C e E) e apresentados como média \pm EPM (n=10-16). #### p<0,0001 para efeito principal de condição pela ANOVA de 2 vias. CBD: Canabidiol; OFT: Teste de campo aberto (do inglês *open field test*); A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

Similarmente, não foi observada diferença na distância percorrida na periferia no OFT basal entre os grupos (interação: $F_{(3, 102)} = 0,6196$, $p=0,6039$; condição: $F_{(1, 102)} = 0,02987$, $p=0,8631$; tratamento: $F_{(3, 102)} = 0,2490$, $p=0,8619$; Fig. 7A), o que sugere um comportamento semelhante dos animais no início do experimento. A análise dos dados do OFT indicou apenas um perfil de interação entre os fatores ($F_{(3, 102)} = 2,207$, $p=0,0918$) e ausência de efeitos principais (condição: $F_{(1, 102)} = 0,9764$, $p=0,3254$; tratamento: $F_{(3, 102)} = 1,185$, $p=0,3193$; Fig. 7B). Já a razão entre os valores no teste em relação ao basal indicou efeito significativo do IS em aumentar a distância percorrida na periferia ($F_{(1, 100)} = 23,81$, $p<0,0001$), mas não interação ($F_{(3, 100)} = 0,8839$, $p=0,4523$) ou efeito do tratamento ($F_{(3, 100)} = 0,9798$, $p=0,4055$; Fig. 7C). A comparação da razão desse parâmetro entre os grupos A-V e I-V também detectou diferença

significativa entre os grupos ($t=2,618$, $df=29$, $p=0,0139$; teste t de Student, Fig. 7D), sugerindo que o IS induziu comportamento tipo-ansioso no OFT, mas o tratamento não afetou tal parâmetro, visto a ausência de efeito do tratamento ou de condição.

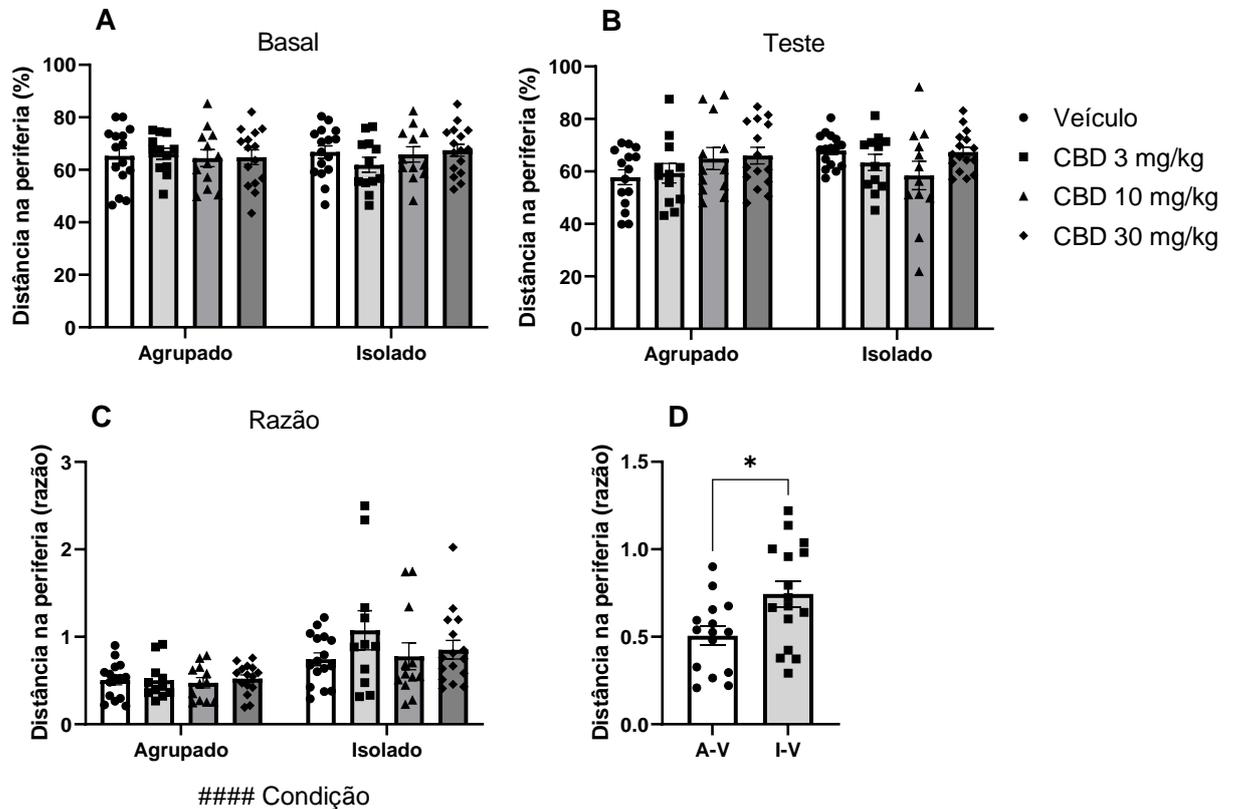


Figura 7. Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-ansioso pela distância percorrida na periferia, no OFT. A) Distância percorrida na periferia no OFT basal e B) no OFT. C) Razão da distância percorrida na periferia no OFT pelo OFT basal. D) Comparação entre a razão da distância percorrida na periferia dos grupos A-V e I-V. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A, B e C) ou teste t de Student (D) e apresentados como média \pm EPM ($n=11-16$). ##### $p<0,0001$ para efeito principal de condição pela ANOVA de 2 vias; * $p<0,05$ pelo teste t de Student. CBD: Canabidiol; OFT: Teste de campo aberto (do inglês *open field test*); A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

O tempo de permanência no centro não diferiu entre os grupos no OFT basal (interação: $F(3, 102) = 1,458$, $p=0,2304$; condição: $F(1, 102) = 0,1682$, $p=0,6825$; tratamento: $F(3, 102) = 0,5113$, $p=0,6754$; Fig. 8A), novamente indicando que o comportamento basal era semelhante entre os grupos. A análise desse parâmetro após o protocolo experimental revelou ausência de interação ($F(3, 102) = 1,620$, $p=0,1894$) e de efeitos principais (condição: $F(1, 102) = 1,205$, $p=0,2748$; tratamento: $F(3, 102) = 0,3544$, $p=0,7861$; Fig. 8B). A razão entre o OFT e o OFT basal, demonstrou interação entre os fatores ($F(3, 101) = 3,175$, $p=0,0274$), mas não foram observadas

diferenças entre os grupos (condição: $F_{(1, 101)} = 0,5688$, $p=0,4525$; tratamento: $F_{(3, 101)} = 0,5738$, $p=0,6335$; $p>0,05$, Tukey; Fig. 8C).

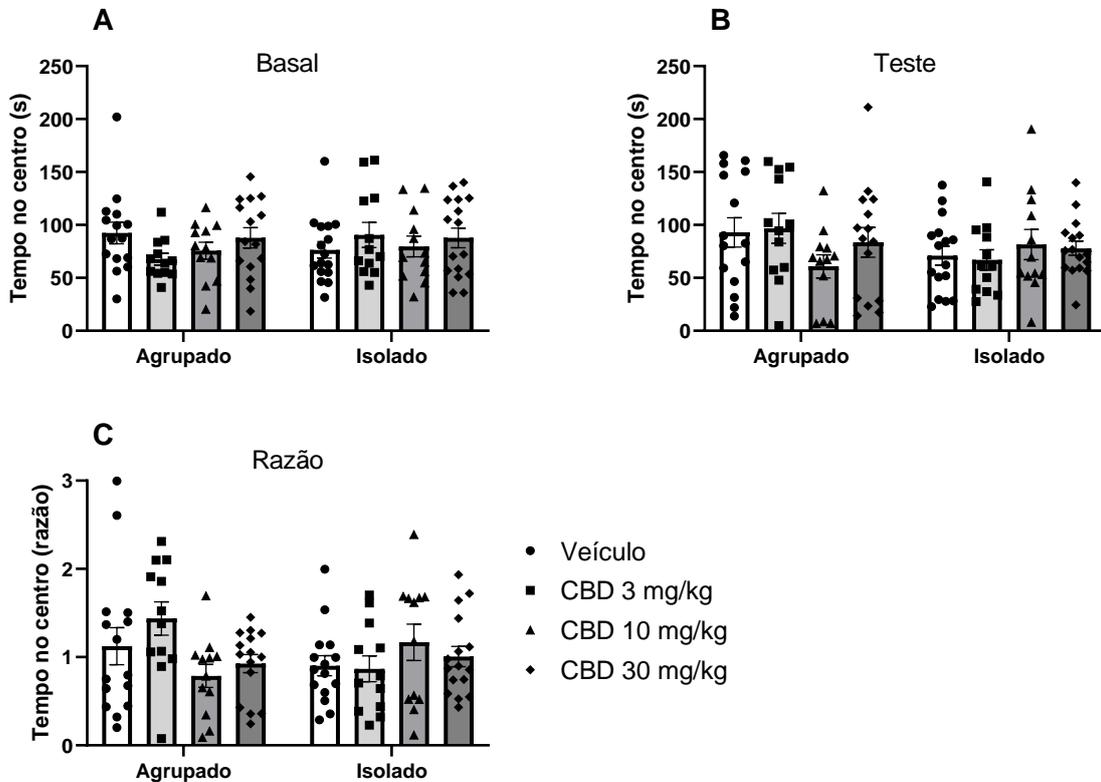


Figura 8. Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-ansioso pelo tempo no centro, no OFT. A) Tempo de permanência no centro no OFT basal e B) no OFT. C) Razão do tempo no centro no OFT pelo OFT basal. Dados analisados por ANOVA de 2 vias e apresentados como média \pm EPM ($n=12-16$). CBD: Canabidiol; OFT: Teste de campo aberto (do inglês *open field test*).

Uma vez que houve interação, os grupos A-V e I-V foram comparados entre si, e similarmente, não foi identificada diferença significativa ($U=105$, $p=0,7748$, teste de Mann-Whitney; Fig. 9A). Embora a análise dos animais agrupados tenha identificado tendência estatística ($H_{(3)} = 7,387$, $p=0,0605$, teste de Kruskal-Wallis), não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$, Dunn; Fig. 9B). Similarmente, a análise dos animais isolados também não indicou diferenças entre os grupos ($F_{(3, 51)} = 0,8078$, $p=0,4954$, ANOVA de uma via; Fig. 9C). Esses resultados sugerem que o tempo de permanência no centro pode não ter sido indicativo em demonstrar a presença ou ausência de comportamento tipo-ansioso dos animais, possivelmente em razão do aumento da locomoção dos animais isolados.

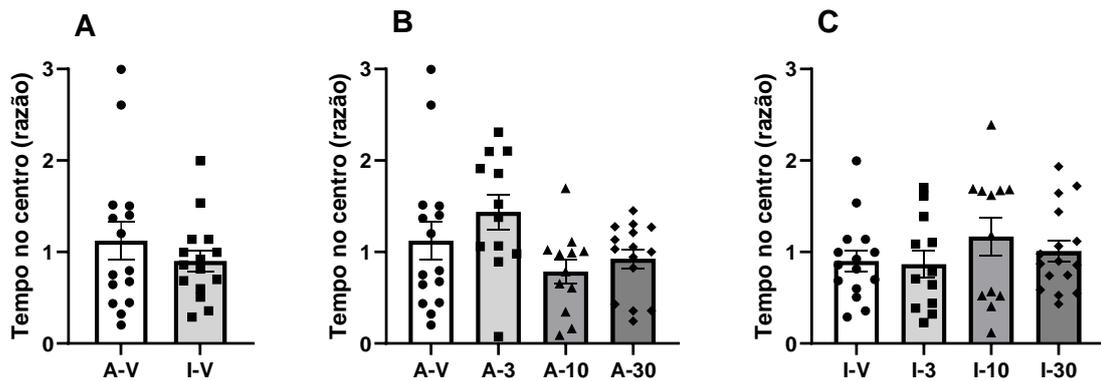


Figura 9. Experimento 1 - Razão do tempo de permanência no centro no OFT. A) Comparação entre os grupos A-V e I-V. B) Comparação entre os grupos tratados com veículo ou CBD (3, 10 ou 30 mg/Kg) da condição Agrupada e C) Isolada. Dados analisados por teste *t* de Student (A), teste de Kruskal-Wallis (B) ou ANOVA de uma via (C) e apresentados como média ± EPM (n=12-16). CBD: Canabidiol; OFT: Teste de campo aberto (do inglês *open field test*). A: Agrupado. I: Isolado. V: Veículo.

5.1.1.2. Teste de borrifagem de sacarose (ST, do inglês *splash test*)

Com relação ao tempo em autolimpeza no ST basal, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais (interação: $F_{(3, 100)} = 0,3583$, $p=0,7832$; condição: $F_{(1, 100)} = 0,2009$, $p=0,6550$; tratamento: $F_{(3, 100)} = 0,2488$, $p=0,8620$; Fig. 10A), sugerindo que os animais não apresentavam diferenças no comportamento antes do início do experimento.

Após o protocolo de IS, a análise por ANOVA de 2 vias demonstrou que apesar de não haver interação entre os fatores ($F_{(3, 102)} = 0,3136$, $p=0,8155$) ou efeito principal do tratamento ($F_{(3, 102)} = 0,9546$, $p=0,4173$), o IS reduziu significativamente o tempo em autolimpeza ($F_{(1, 102)} = 32,28$, $p<0,0001$; Fig. 10B), indicando que esse estresse induziu comportamento tipo-depressivo nos animais. Diante disso, os grupos A-V e I-V foram comparados diretamente, indicando diferença significativa entre as duas condições experimentais ($t=2,557$, $df=29$, $p=0,016$; teste *t* de Student; Fig. 10C). A análise da razão entre o ST teste e o ST basal também identificou efeito do IS ($F_{(1, 98)} = 24,77$, $p<0,0001$), porém não houve interação entre os fatores ($F_{(3, 98)} = 0,04066$, $p=0,9890$) ou efeito principal do tratamento ($F_{(3, 98)} = 0,4190$, $p=0,7398$; Fig. 10D). A comparação entre as razões dos grupos A-V e I-V indicou diferença significativa ($U=55$, $p=0,0292$; teste de Mann-Whitney; Fig. 10E).

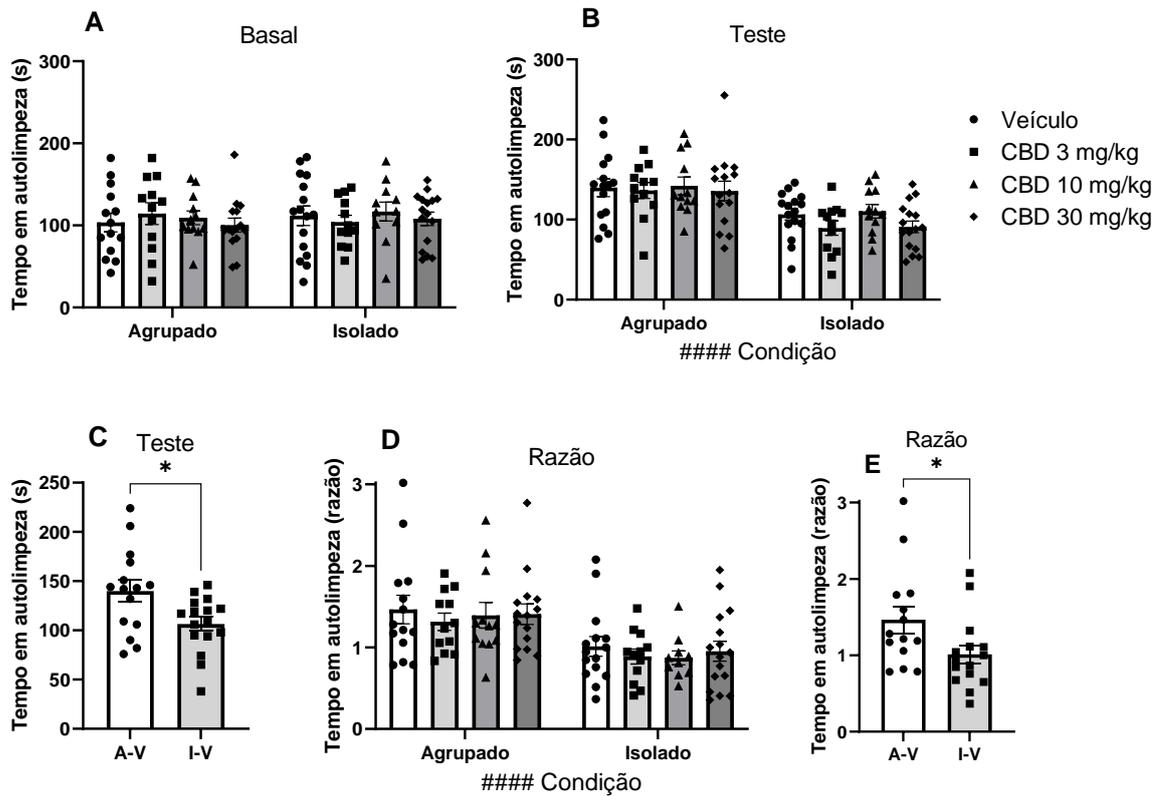


Figura 10. Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-depressivo pelo ST. A) Tempo em autolimpeza no ST basal. B) Tempo em autolimpeza no ST. C) Comparação entre os grupos A-V e I-V. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A, B e D), teste t de Student (C) ou teste de Mann-Whitney (E) e apresentados como média \pm EPM (n=12-16). ####p<0,0001 para o efeito principal de condição na ANOVA de 2 vias. * p<0,05 no teste t de Student (C) e de Mann-Whitney (E). CBD: Canabidiol; ST: Teste de borrifagem de sacarose (do inglês *splash test*); A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

5.1.1.3. Teste de reconhecimento de objetos (NOR, do inglês *novel object recognition test*)

Não houve interação entre os fatores na análise da sessão de STM do NOR ($F(3, 83) = 0,06932$, $p=0,9761$) ou efeitos principais (condição: $F(1, 83) = 0,3418$, $p=0,5604$; tratamento $F(3, 83) = 0,8019$, $p=0,4963$; Fig. 11A). Na sessão de LTM, não foram observados efeitos principais de condição ($F(1, 83) = 0,5687$, $p=0,8281$) ou de tratamento ($F(3, 83) = 0,0474$, $p=0,6372$) e embora tenha sido identificada interação entre os fatores ($F(3, 83) = 4,156$, $p=0,0085$), a análise de comparações múltiplas revelou que não houve diferença específica entre os grupos ($p>0,05$, Tukey; Fig. 11B).

Diante da interação significativa entre os fatores, foi realizado teste t de Student entre os grupos A-V e I-V, o qual indicou que não houve diferença entre os grupos ($t=0,5581$, $df=20$, $p=0,5830$; Fig. 11C). Similarmente, não houve diferença entre os grupos da condição agrupada ($F_{(3,42)} = 1,381$, $p=0,2617$; Fig. 11D), mas sim, na condição isolada ($F_{(3,41)} = 3,335$, $p=0,0285$). Entretanto, não foram detectadas diferenças entre os grupos ($p>0,05$, Dunnet; Fig. 11E).

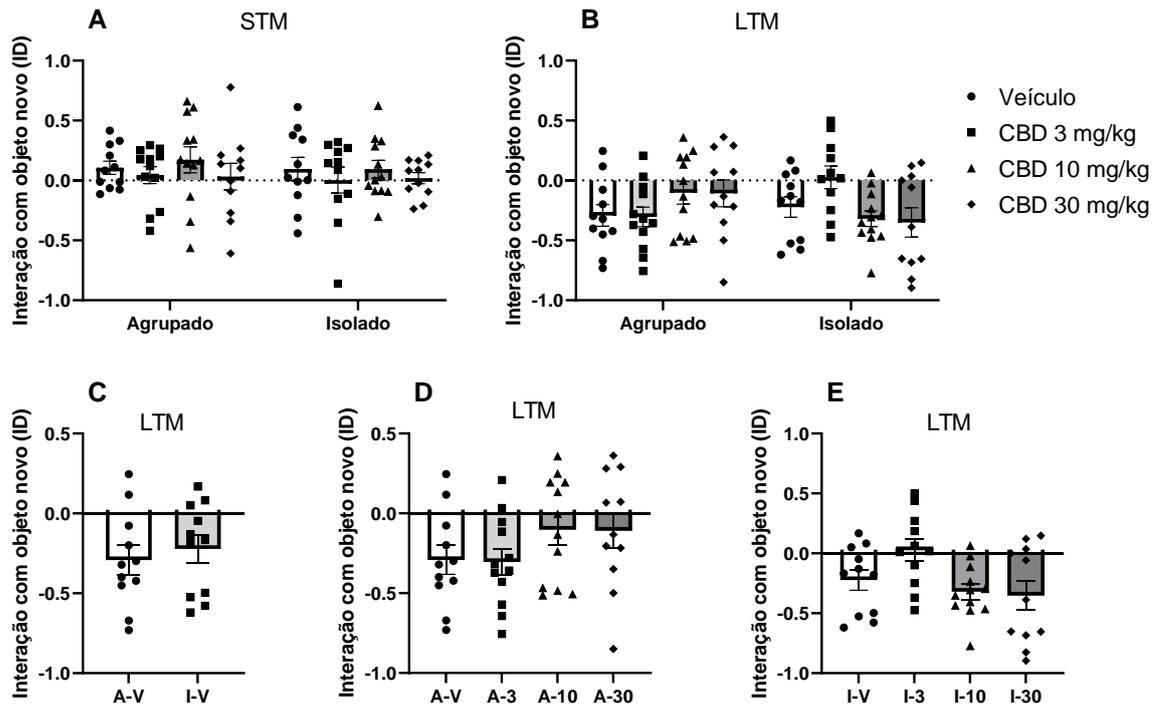


Figura 11. Experimento 1 - Avaliação da memória de curto e longo-prazo pelo NOR. A) Tempo de interação com o objeto novo na sessão de STM e B) na sessão de LTM. C) Comparação entre os grupos A-V e I-V, na sessão de LTM. D) Comparação entre os grupos tratados com veículo e CBD (3, 10 e 30 mg/Kg) da condição agrupada e E) isolada, na sessão de LTM. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A e B), teste t de Student (C) e ANOVA de uma via (D e E) e apresentados como média \pm EPM ($n=11-12$). CBD: Canabidiol; NOR: Teste de reconhecimento de objetos (do inglês *novel object recognition test*); STM: memória de curto-prazo (do inglês *short-term memory*); LTM: memória de longo-prazo (do inglês *long-term memory*); A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

5.1.1.4. Teste de preferência social (SPT, do inglês *social preference test*)

Quanto aos dados do SPT, embora não tenha sido observada interação ($F_{(3,102)} = 0,9448$, $p=0,4219$) entre os fatores ou efeito principal do tratamento ($F_{(3,102)} = 1,606$, $p=0,1927$), o IS aumentou significativamente o tempo de interação com o animal-estímulo, nesse teste indicado pelo efeito principal de condição ($F_{(1,102)} = 6,191$, $p=0,0145$; Fig. 12A). No entanto, não foi

observado efeito significativo ao comparar os grupos A-V e I-V ($t=0,06435$, $df=29$, $p=0,9491$; teste t de Student; Fig. 12B), indicando que a diferença entre as condições detectada pela ANOVA de 2 vias é independente do tratamento, provavelmente influenciada pela redução do tempo de interação apresentada pelo grupo A-3 e aumento pelos grupos I-10 e I-30.

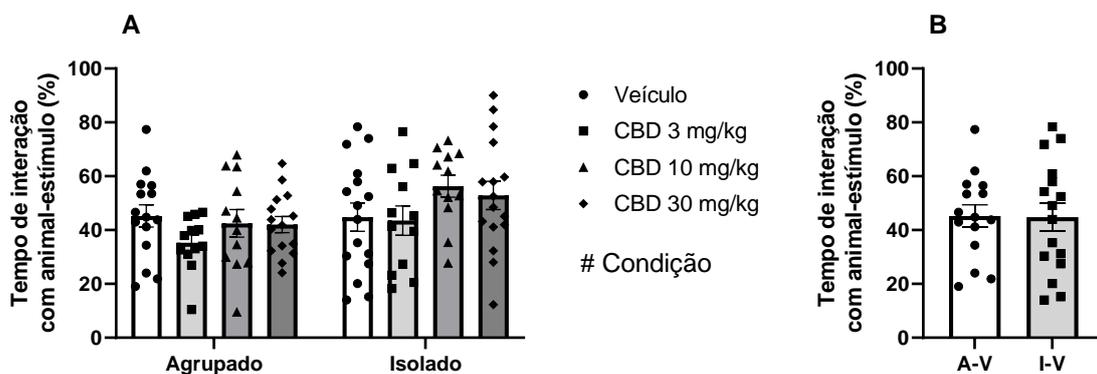


Figura 12. Experimento 1 - Avaliação da preferência social pelo SPT. A) Tempo de interação com o animal-estímulo. B) Comparação entre os grupos A-V e I-V. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A) e teste t de Student (B) e apresentados como média \pm EPM ($n=12-16$). # $p<0,05$ para efeito principal de condição pela ANOVA de 2 vias. CBD: Canabidiol; SPT: Teste de preferência social (do inglês *social preference test*); A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

5.1.1.5. Teste de alimentação suprimida pela novidade (NSFT, do inglês *novelty suppressed feeding test*)

Os dados da latência para se alimentar na caixa teste no NSFT demonstraram que embora não tenha sido observado interação entre os fatores ($F_{(3, 97)} = 1,278$, $p=0,2864$), tanto o IS ($F_{(1, 97)} = 24,59$, $p<0,0001$) quanto o tratamento ($F_{(3, 97)} = 6,318$, $p=0,0006$) tiveram efeitos significativos (Fig. 13A).

A análise do efeito de condição através da comparação entre os grupos A-V e I-V também demonstrou diferença significativa entre eles ($U = 58,50$, $p=0,0139$; teste de Mann-Whitney, Fig. 13B), indicando que o IS induziu comportamento tipo-ansioso nos animais, caracterizado pelo aumento do tempo para superar o conflito entre se alimentar e adentrar a área iluminada.

Diante do efeito principal de tratamento, os grupos tratados com CBD de cada condição (agrupada e isolada) foram comparados com seus respectivos grupos veículo, separadamente. Os resultados dos animais agrupados demonstraram diferença significativa entre os grupos (H

(χ^2) = 9,932, $p=0,0192$; teste de Kruskal-Wallis), com redução significativa da latência para alimentação no grupo CBD na dose de 10 mg/Kg ($p=0,0442$, Dunn), bem como tendência estatística no grupo CBD na dose de 3 ($p=0,0743$, Dunn; Fig. 13C). Similarmente, a análise dos grupos isolados também indicou diferença entre os grupos ($F(3,000, 38,37) = 4,333$, $p=0,0100$, ANOVA de uma via com correção de Brown-Forsythe). Foi detectado efeito tipo-ansiolítico na dose de 10 mg/Kg ($p=0,0011$, Dunnett; Fig. 13D). Esses dados sugerem que o tratamento com CBD 10 atenuou o comportamento tipo-ansioso tanto nos animais agrupados quanto nos isolados.

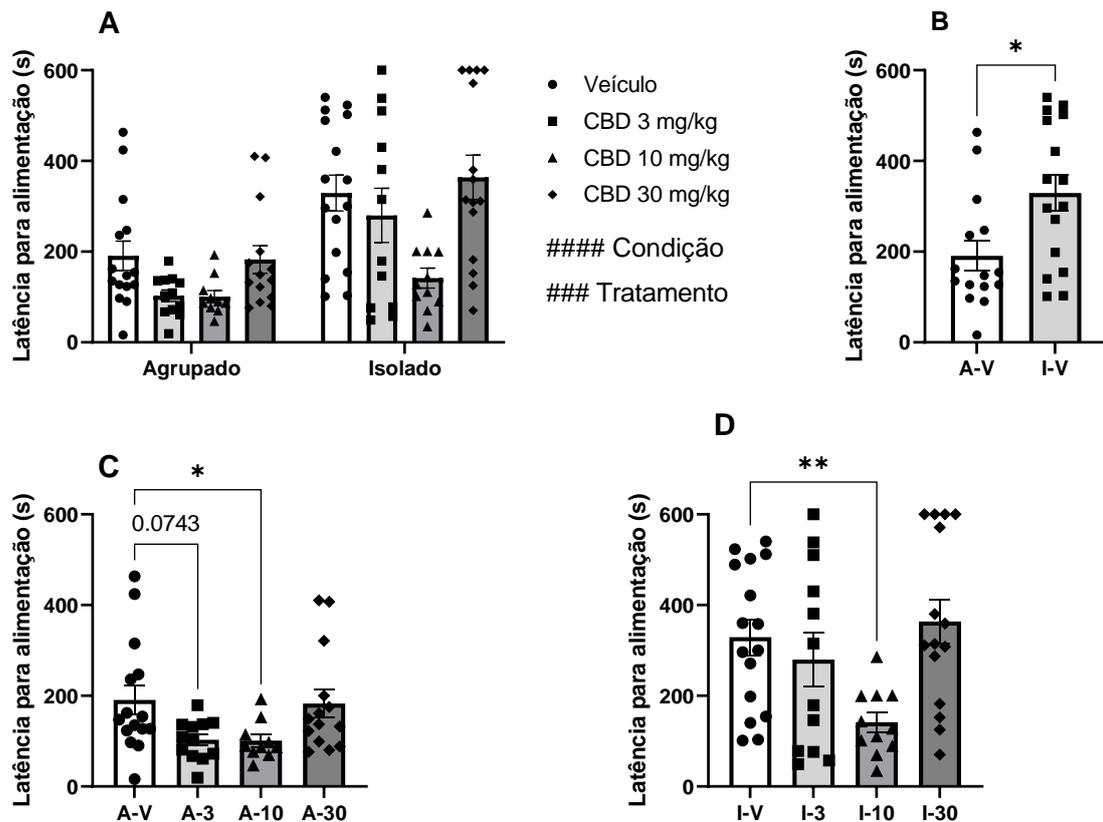


Figura 13. Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-ansioso pela latência para alimentação na caixa teste, no NSFT. A) Tempo de latência para alimentação na caixa teste. B) Comparação entre os grupos A-V e I-V. C) Comparação entre os grupos tratados com veículo e CBD (3, 10 e 30 mg/Kg) da condição agrupada e D) isolada. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A), teste de Mann-Whitney (B), teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn (C) ou ANOVA de uma via com correção de Brown-Forsythe seguido pelo pós-teste de Dunnett (D) e apresentados como média \pm EPM (n=10-16). ####p<0,0001 para efeito principal de condição e ###p<0,001 para efeito principal de tratamento pela ANOVA de 2 vias. *p<0,05 no teste de Mann-Whitney (B) e no pós-teste de Dunn (C). **p<0,01 no pós-teste de Dunnett. CBD: Canabidiol; NSFT: Teste de alimentação suprimida pela novidade (do inglês *novelty suppressed feeding test*); A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

A análise da latência para alimentação na caixa casa demonstrou que não houve interação entre os fatores ($F_{(3, 97)} = 1,991$, $p=0,1204$) ou efeito de condição ($F_{(1, 97)} = 2,674$, $p=0,1052$), mas que houve efeito principal do tratamento ($F_{(3, 97)} = 4,303$, $p=0,0068$; Fig. 14A). A análise dos animais agrupados indicou que não houve diferença significativa entre os grupos ($H_{(3)} = 4,941$, $p=0,1761$, Kruskal-Wallis; Fig. 14B). Entretanto, nos animais isolados essa diferença foi observada ($H_{(3)} = 8,062$, $p=0,0448$, Kruskal-Wallis), com tendência ao aumento

da latência para alimentação na caixa casa no grupo CBD na dose de 30 mg/Kg ($p= 0,0542$, Dunn; Fig. 14C).

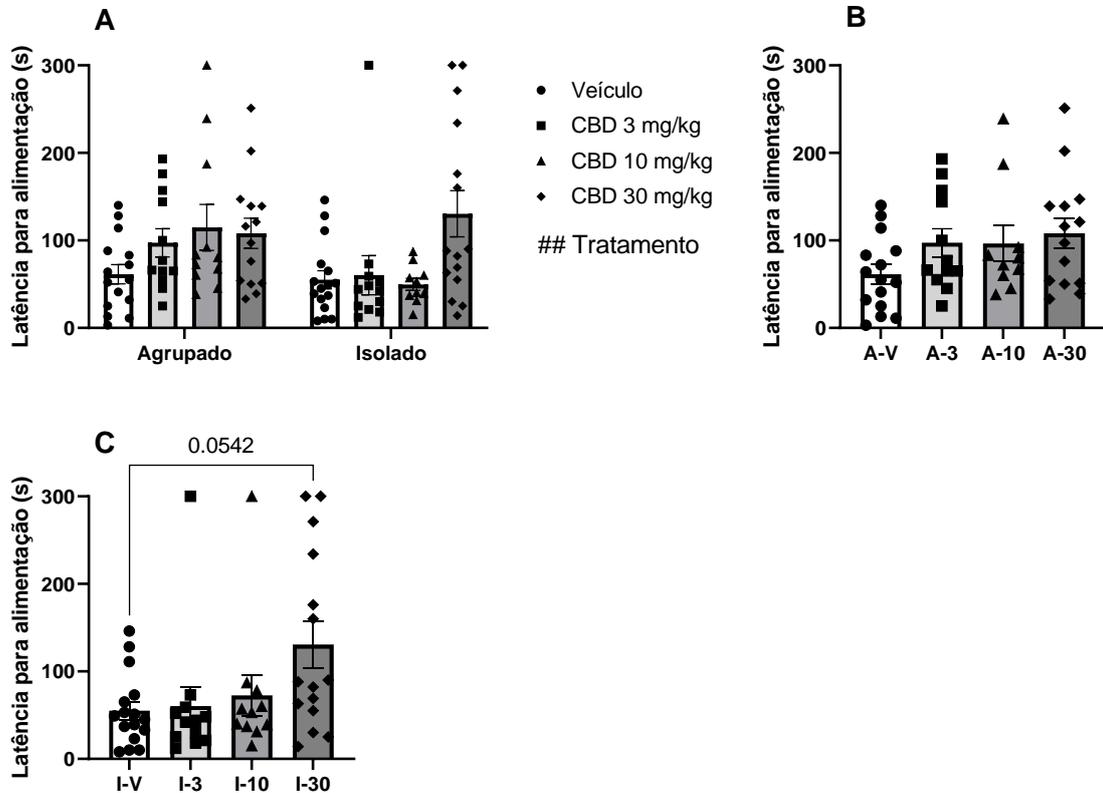


Figura 14. Experimento 1 - Avaliação do comportamento alimentar pela latência para alimentação na caixa casa, no NSFT. A) Tempo de latência para alimentação na caixa casa. B) Comparação entre os grupos tratados com veículo e CBD (3, 10 e 30 mg/Kg) da condição agrupada e C) isolada. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A) ou teste de Kruskal-Wallis (B e C), seguido pelo pós-teste de Dunnett (C) e apresentados como média \pm EPM ($n=10-16$). ## $p<0,01$ para efeito principal de tratamento pela ANOVA de 2 vias. CBD: Canabidiol; NSFT: Teste de alimentação suprimida pela novidade (do inglês *novelty suppressed feeding test*); A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

Considerando a variabilidade dos dados da latência na caixa teste, bem como o efeito do tratamento na caixa casa, foi calculada a razão da latência para alimentação dividindo o valor da caixa teste pelo da caixa casa. Houve interação entre os fatores ($F_{(3, 92)} = 3,214$, $p=0,0265$), bem como efeitos de condição ($F_{(1, 92)} = 21,68$, $p<0,0001$) e tratamento ($F_{(3, 92)} = 4,915$, $p=0,0033$). Foi detectada diferença significativa entre os grupos agrupado e isolado tratados com CBD 3 ($p<0,0001$, Tukey) e os grupos isolados tratados com CBD 3 e CBD 10 ($p=0,0035$,

Tukey; Fig. 15), indicando que apesar de não haver diferença entre os grupos A-V e I-V, o CBD induziu efeito nas duas condições.

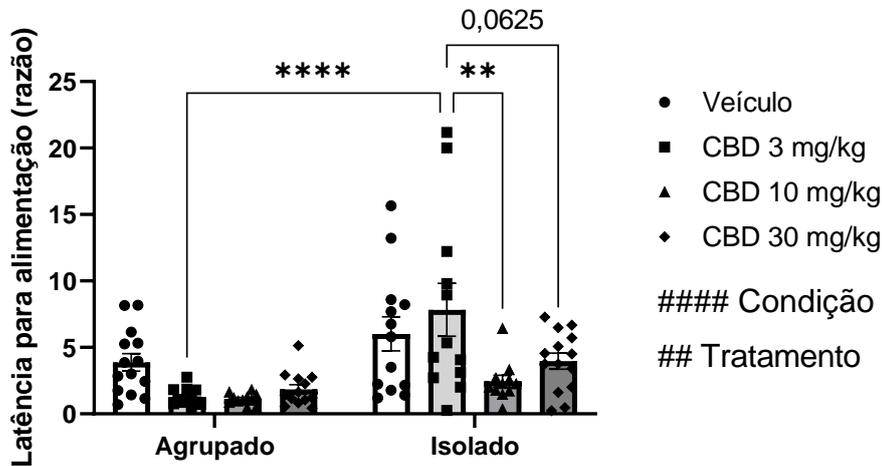


Figura 15. Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-ansioso expresso pela razão da latência para alimentação na caixa teste pela caixa casa no NSFT. Razão da latência para alimentação na caixa teste pela caixa casa. Dados analisados por ANOVA de 2 vias seguido pelo pós-teste de Tukey e apresentados como média \pm EPM (n=12-16). #####p<0,0001 para efeito principal de condição e ##p<0,01 para efeito principal de tratamento pela ANOVA de 2 vias. **p<0,01 e ****p<0,0001 em relação ao grupo isolado-CBD 3, pelo pós-teste de Tukey. CBD: Canabidiol; NSFT: Teste de alimentação suprimida pela novidade (do inglês *novelty suppressed feeding test*); A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

5.1.1.6. Teste de interação social (SIT, do inglês *social interaction test*)

Semelhantemente ao observado no SPT, o IS aumentou significativamente o tempo de interação com o animal-estímulo, avaliado no SIT ($F_{(1, 101)} = 10,74$, $p=0,0014$), entretanto, não houve interação entre os fatores ($F_{(3, 101)} = 1,712$, $p=0,1694$) ou efeito de tratamento ($F_{(3, 101)} = 0,4025$, $p=0,7515$; Fig. 16A). Porém, ao comparar diretamente os grupos A-V e I-V, não observou-se diferença ($t=0,3038$, $df=29$, $p=0,7634$, teste t de Student; Fig. 16B), o que sugere que esse efeito foi identificado pela ANOVA de 2 vias em razão da redução do tempo de interação pelos grupos A-3 e A-10.

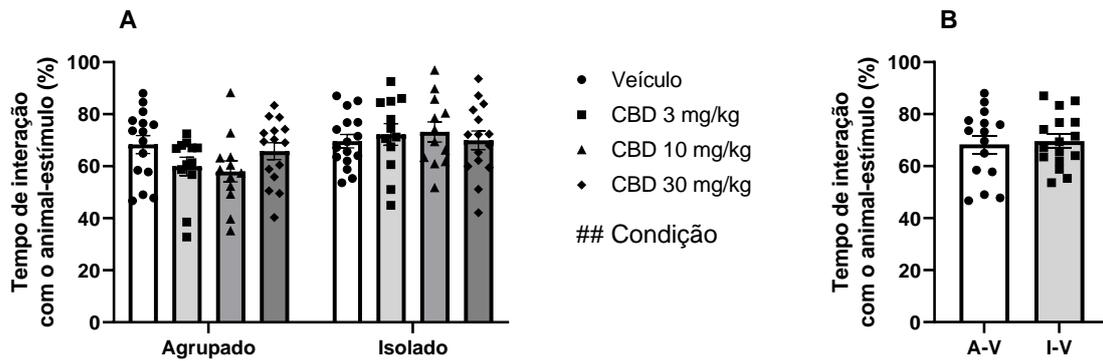


Figura 16. Experimento 1 - Avaliação da interação social pelo SIT. A) Tempo de interação com o animal-estímulo. B) Comparação entre os grupos A-V e I-V. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A) ou teste t de Student (B) e apresentados como média \pm EPM (n=12-16). ## $p < 0,01$ para efeito principal de condição pela ANOVA de 2 vias. CBD: Canabidiol; SIT: Teste de interação social (do inglês *social interaction test*); A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

5.1.1.7. Teste do nado forçado (FST, do inglês *forced swimming test*)

O tempo que os animais permaneceram imóveis no FST foi analisado nos dois primeiros e últimos quatro minutos, assim como no tempo total do teste (6 minutos). A análise dos dois primeiros minutos revelou ausência de interação entre o estresse e o tratamento ($F_{(3, 98)} = 0,4829$, $p = 0,6949$) e de efeito da condição ($F_{(1, 98)} = 0,1053$, $p = 0,7463$), porém o tratamento com CBD aumentou o tempo de imobilidade nesse período do teste ($F_{(3, 98)} = 3,960$, $p = 0,0104$; Fig. 17A). Analisando os grupos da condição agrupada, foi identificada tendência à diferença entre os grupos ($H(3) = 6,354$, $p = 0,0956$, teste de Kruskal-Wallis; Fig. 17B), enquanto a análise dos animais isolados indicou ausência de diferenças entre os grupos ($H(3) = 2,880$, $p = 0,4106$, teste de Kruskal-Wallis; Fig. 17C).

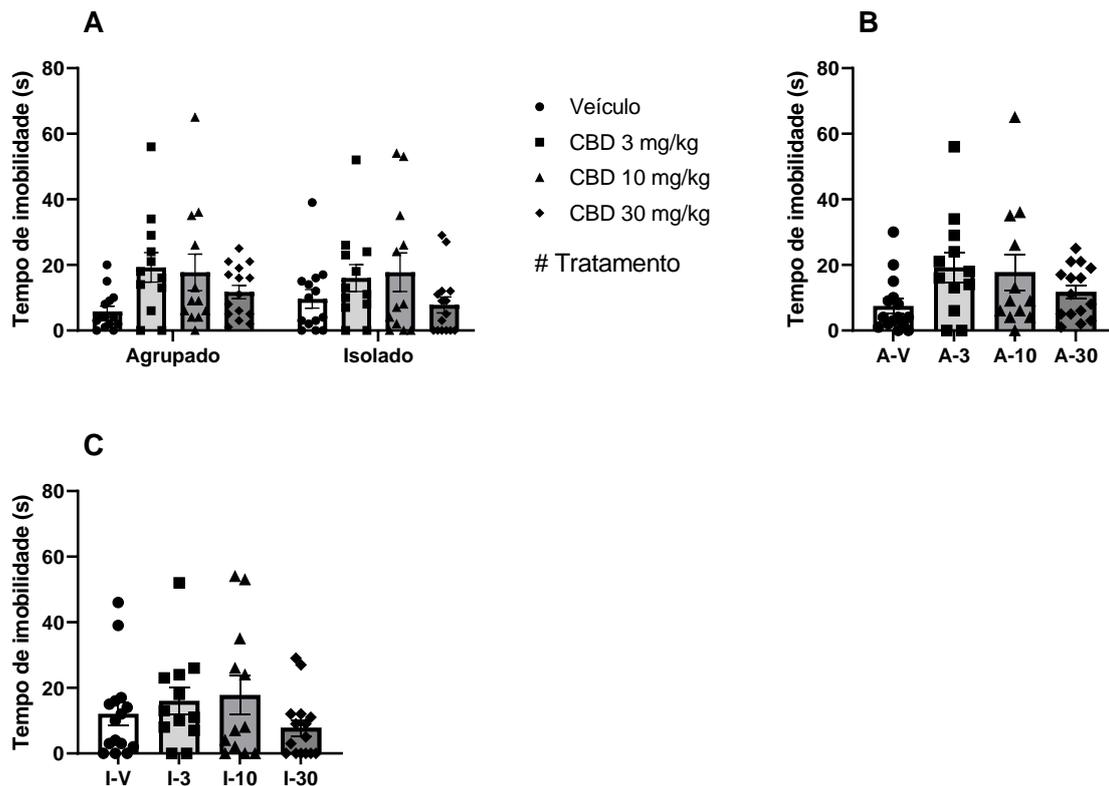


Figura 17. Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-depressivo nos primeiros dois minutos do FST. A) Tempo de imobilidade nos dois primeiros minutos do FST. B) Comparação entre os grupos tratados com veículo e CBD (3, 10 e 30 mg/Kg) da condição agrupada e C) isolada. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A) ou teste de Kruskal-Wallis (B e C) e apresentados como média \pm EPM (n=12-16). #p<0,05 para efeito principal de tratamento pela ANOVA de 2 vias. CBD: Canabidiol; FST: Teste do nado forçado (do inglês *forced swimming test*); A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

Já nos últimos quatro minutos, foi observada ausência de interação entre os fatores ($F_{(3, 99)} = 1,495$, $p=0,2205$) e do efeito de tratamento ($F_{(3, 99)} = 1,225$, $p=0,3046$), porém um efeito significativo da condição foi detectado ($F_{(1, 99)} = 17,24$, $p<0,0001$; Fig. 18A). No entanto, ao comparar os grupos A-V e I-V, não foi identificada diferença significativa ($t=0,3522$, $df=28$, $p=0,7273$, teste t de Student; Fig. 18B), sugerindo que o efeito de condição observado pela ANOVA de 2 vias pode ter refletido o aumento do tempo de imobilidade dos grupos agrupados tratados com CBD em comparação à redução nos grupos isolados que receberam CBD.

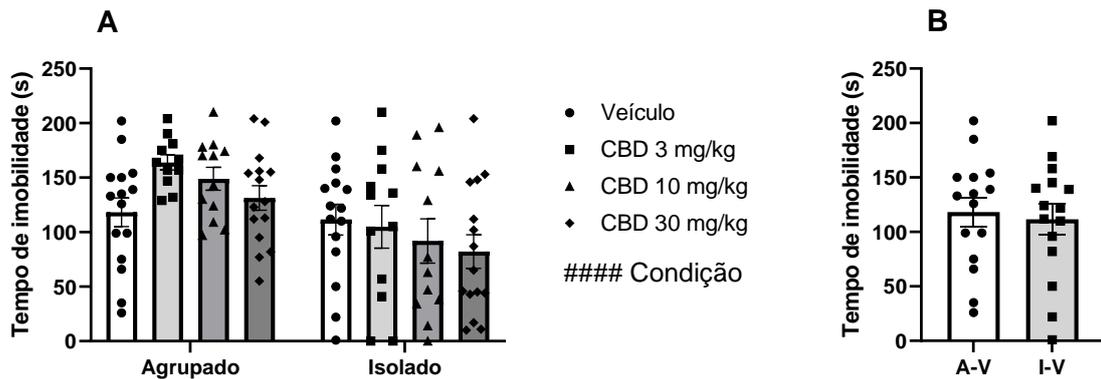


Figura 18. Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-depressivo nos últimos quatro minutos do FST. A) Tempo de imobilidade nos últimos quatro minutos. B) Comparação entre os grupos A-V e I-V. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A) ou teste t de Student (B) e apresentados como média \pm EPM (n=11-16). ####p<0,0001 para efeito principal de condição pela ANOVA de 2 vias. CBD: Canabidiol; FST: Teste do nado forçado (do inglês *forced swimming test*); A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

Por fim, o tempo de imobilidade total foi analisado pela ANOVA de 2 vias, cujo resultado novamente indicou ausência de interação e efeito de tratamento (interação: $F_{(3, 99)} = 1,470$, $p=0,2273$; tratamento: $F_{(3, 99)} = 1,710$, $p=0,1698$), mas detectou-se efeito principal de condição ($F_{(1, 99)} = 13,33$, $p=0,0004$; Fig. 19A). Ao comparar os grupos A-V e I-V, não foi observada diferença significativa ($t=0,1004$, $df=28$, $p=0,9207$, teste t de Student; Fig. 19B), assim como na análise dos últimos quatro minutos de teste.

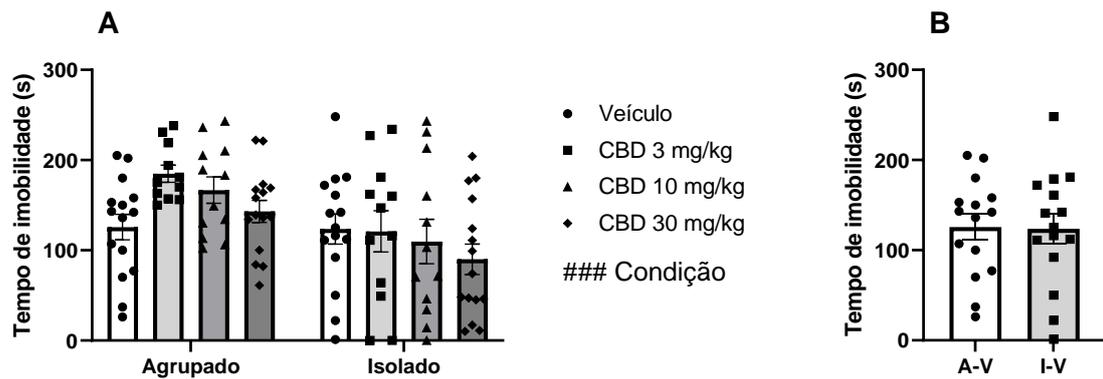


Figura 19. Experimento 1 - Avaliação do comportamento tipo-depressivo no tempo total do FST.

A) Tempo de imobilidade no FST. B) Comparação entre os grupos A-V e I-V. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A) ou teste t de Student (B) e apresentados como média \pm EPM (n=12-16). ###p<0,01 para efeito principal de condição pela ANOVA de 2 vias. CBD: Canabidiol; FST: Teste do nado forçado (do inglês *forced swimming test*); A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

5.1.2. Z Score dos testes comportamentais

Conforme descrito no item 4.6.1, os dados obtidos nos testes comportamentais foram utilizados para o cálculo do Z Score, o qual foi então analisado por ANOVA de 2 vias. Essa análise revelou ausência de interação entre os fatores ($F_{(3, 102)} = 2,066$, $p=0,1094$) e de efeito principal de tratamento ($F_{(3, 102)} = 0,6518$, $p=0,5836$), porém foi detectado que o IS aumentou significativamente a emocionalidade dos animais ($F_{(1, 102)} = 26,94$, $p<0,0001$; Fig. 20A). A análise entre os grupos A-V e I-V também identificou essa diferença ($t=4,170$, $df=29$, $p=0,0003$, teste t de Student; Fig. 20B).

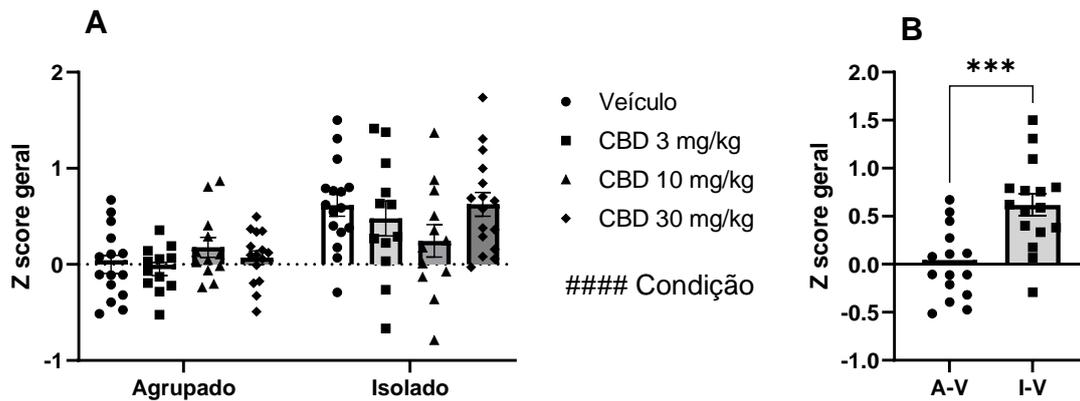


Figura 20. Experimento 1 - Avaliação da emocionalidade dos animais através do Z Score. A) Z Score geral de todos os grupos. B) Comparação entre os grupos A-V e I-V. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A) ou teste t de Student (B) e apresentados como média \pm EPM (n=12-16). ####p<0,0001 para efeito principal de condição pela ANOVA de 2 vias. ***p<0,001 no teste t de Student. CBD: Canabidiol; A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

5.1.3. Avaliação do peso de órgãos

Ao fim dos experimentos, o baço e as glândulas adrenais foram pesados e o peso foi analisado para identificar possíveis alterações provocadas pelo estresse ou pelo tratamento. Uma vez que o peso dos órgãos pode ser influenciado pelo peso corporal, o peso do baço e das adrenais, em miligramas, foi dividido pelo peso corporal dos animais, em gramas, no dia da eutanásia, de modo a normalizar essa influência.

5.1.3.1. Peso do baço

Não houve interação entre os fatores na ANOVA de 2 vias ($F_{(3, 81)} = 0,2370$, $p=0,8703$) ou efeito da condição ($F_{(1, 81)} = 0,3354$, $p=0,5641$), mas o tratamento com CBD influenciou o peso do baço dos animais de maneira geral ($F_{(3, 81)} = 4,229$, $p=0,0079$; Fig. 21A). A análise dos animais agrupados não identificou esse efeito ($F_{(3, 40)} = 2,225$, $p=0,1001$; Fig. 21B), porém houve tendência à diferença entre os grupos nos animais isolados ($F_{(3, 41)} = 2,279$, $p=0,0938$; Fig. 21C).

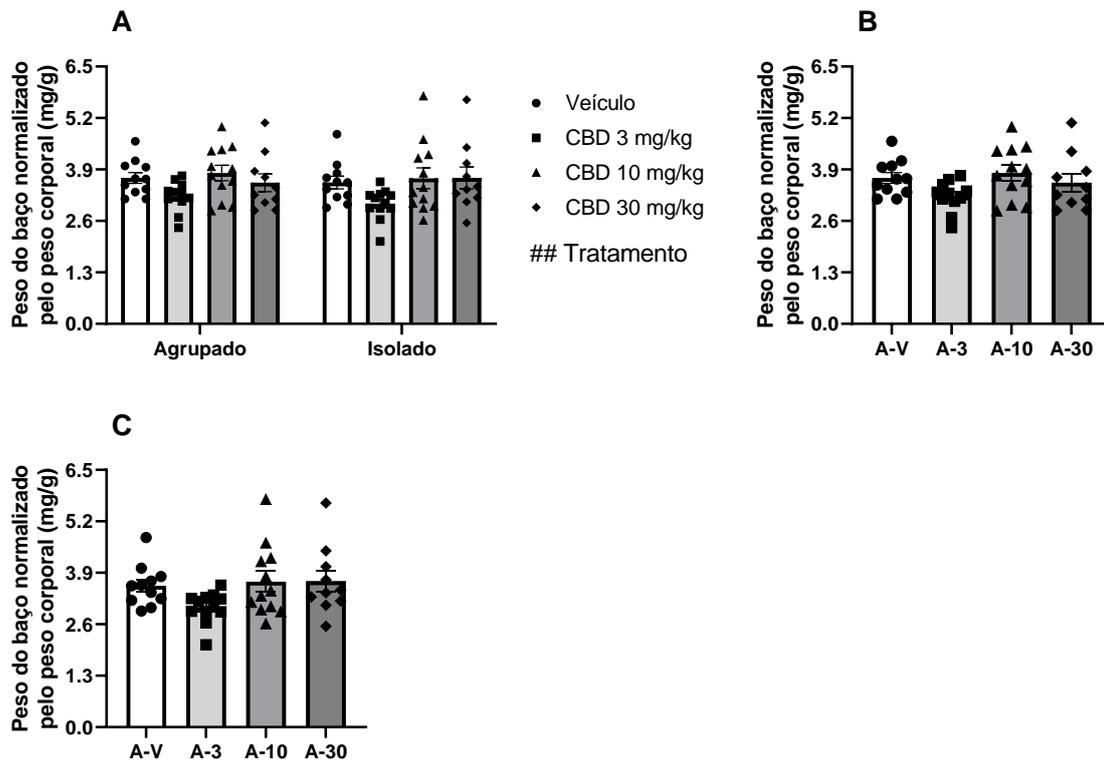


Figura 21. Experimento 1 - Avaliação do peso do baço. A) Peso do baço normalizado pelo peso corporal. B) Comparação entre os grupos tratados com veículo ou CBD (3, 10 e 30 mg/Kg) da condição agrupada e C) isolada. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A) ou ANOVA de uma via (B e C) e apresentados como média \pm EPM (n=10-12). CBD: Canabidiol; A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

5.1.3.2. Peso das glândulas adrenais

O peso das glândulas adrenais não foi influenciado pelo tratamento ($F_{(3, 78)} = 1,775$, $p=0,1589$) e não foi observada interação entre os fatores ($F_{(3, 78)} = 1,474$, $p=0,2282$), porém houve um aumento induzido pelo IS ($F_{(1, 78)} = 4,230$, $p=0,0431$; Fig. 22A). A comparação entre os grupos A-V e I-V revelou diferença significativa ($t=2,873$, $df=20$, $p=0,0094$; Fig. 22B).

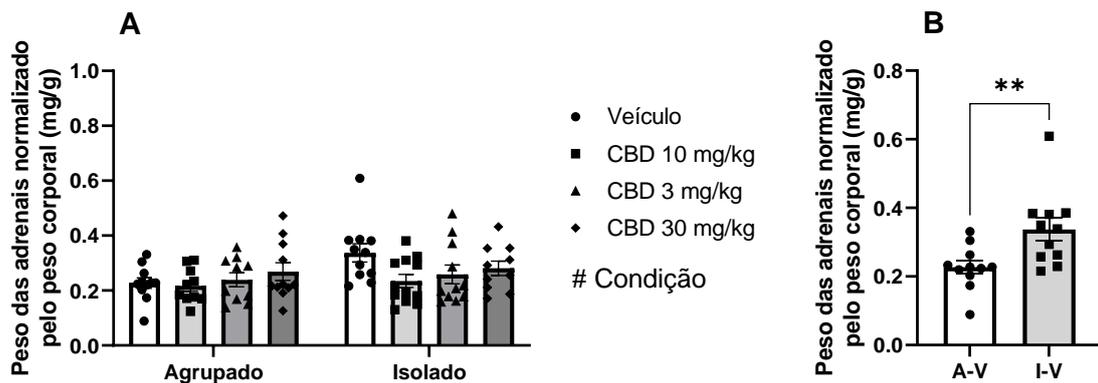


Figura 22. Experimento 1 - Avaliação do peso das glândulas adrenais. Peso das glândulas adrenais normalizado pelo peso corporal. Dados analisados por ANOVA de 2 vias e apresentados como média \pm EPM (n= 9-12) # $p < 0,05$ para efeito principal de condição pela ANOVA de 2 vias. ** $p < 0,01$ no teste t de Student. CBD: Canabidiol; A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

5.1.4. Análise de correlação entre o peso corporal dos animais e o tratamento com CBD ou o tempo do protocolo

A análise de correlação foi realizada para investigar possíveis efeitos do período do IS e do tratamento com CBD sobre o peso corporal dos animais. Os fatores utilizados foram: peso corporal (em gramas), tempo (semanas do experimento) e dose de CBD administrada (0 para os animais veículo, 3, 10 ou 30 mg/Kg). Foi identificado efeito pequeno de correlação negativa entre o peso dos animais e o tratamento com CBD (Spearman $r = -0,153$, $p < 0,0001$). Já a correlação entre a semana e o peso dos animais não foi significativa (Spearman $r = 0,036$, $p = 0,3646$; Fig. 23A).

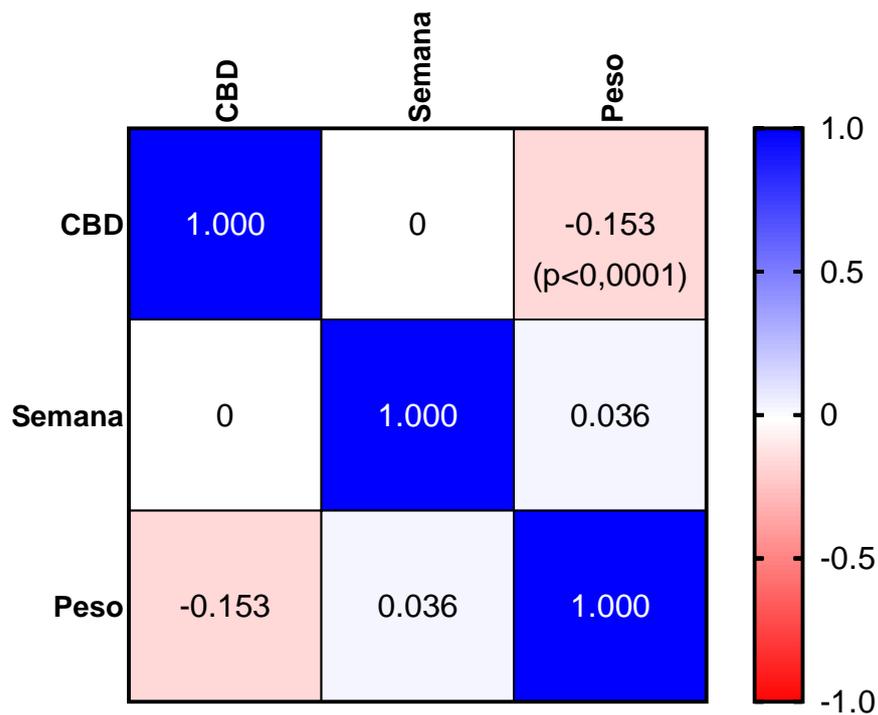


Figura 23. Experimento 1 - Análise de correlação entre o peso corporal dos animais, tempo do experimento e tratamento com CBD. Dados analisados por correlação de Spearman e apresentados como valor de r (n=12-16). CBD: Canabidiol.

5.1.5. Acompanhamento do ciclo estral

Não foi realizada análise estatística dos dados relativos ao ciclo estral dos animais, uma vez que, em virtude da frequência das coletas e do número reduzido de animais em cada fase do ciclo, esses dados possuíam caráter observacional. O número de animais em cada fase do ciclo, no momento de cada coleta está representado na forma de *heatmap*, na Figura 24.

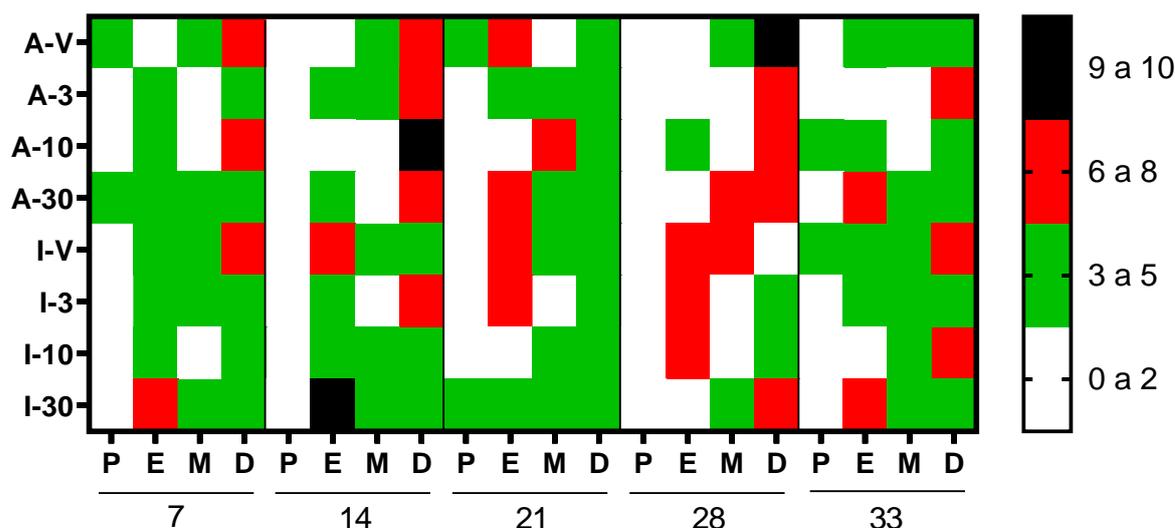


Figura 24. Experimento 1 - Heatmap das fases do ciclo estral de cada grupo experimental ao longo do protocolo. Escala colorimétrica à direita referente ao número de animais em cada uma das fases do ciclo estral no momento de avaliação. A: Agrupado; I: Isolado; 3: CBD 3 mg/Kg; 10: CBD 10 mg/Kg; 30: CBD 30 mg/Kg; CBD: Canabidiol; P: Pró-estro; E: Estro; M: Metaestro; D: Diestro.

5.1.6. Análise da expressão gênica

Diante dos resultados dos testes comportamentais, que apontaram indução de comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo pelo IS, bem como o efeito tipo-ansiolítico do CBD (10 mg/Kg) no NSFT, o PFC dos animais dos grupos agrupado e isolado que receberam veículo ou CBD (10 mg/Kg) foram analisados pela técnica de RT-qPCR para avaliar possíveis alterações na expressão de genes relacionados à via do inflamassoma de NLRP3. Uma vez que seria inviável realizar esta análise com todos os animais (Fig. 25A), foram selecionadas amostras representativas desses grupos experimentais (Fig. 25B), de modo a gerar um resultado fiel ao n amostral completo. Para essa seleção, o valor do Z Score geral foi utilizado, visto que esse cálculo reflete a emocionalidade dos animais ao longo dos testes comportamentais.

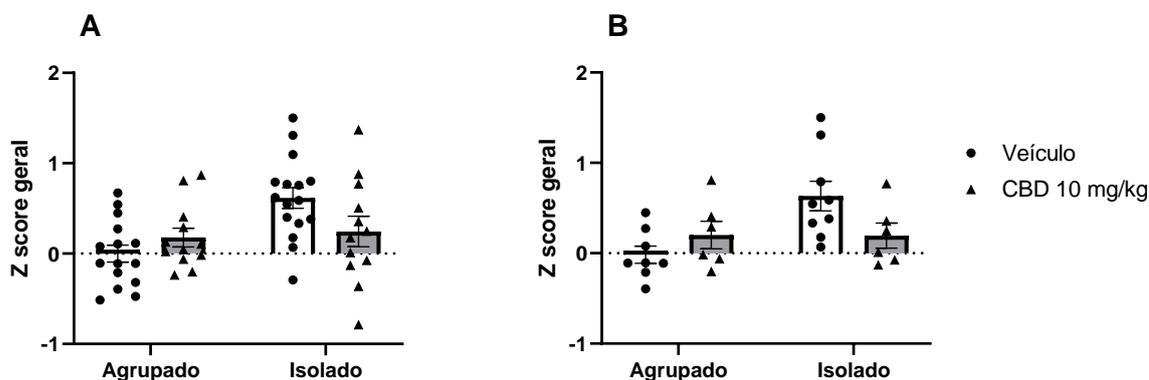


Figura 25. Experimento 1 - Valores do Z Score dos grupos selecionados para análise de expressão gênica. A) Z Score do n completo dos grupos tratados com veículo e CBD (10 mg/Kg) das duas condições, conforme demonstrado na Figura 19 e B) Z Score dos animais selecionados para análise de expressão gênica dos grupos tratados com veículo ou CBD (10 mg/Kg) das duas condições. Dados apresentados como média \pm EPM ($n=6-16$). CBD: Canabidiol.

Conforme ilustrado na figura 26A, a análise dos dados obtidos pelo RT-qPCR revelou que não houve interação entre os fatores para a expressão gênica do NLRP3 ($F_{(1, 21)} = 0,6330$, $p=0,4352$) e que o IS não induziu aumento desse gene, considerando a ausência de efeito de condição ($F_{(1, 21)} = 0,06979$, $p=0,7942$). No entanto, interessante, o tratamento com CBD reduziu a expressão desse componente tanto nos animais agrupados quanto isolados ($F_{(1, 21)} = 5,039$, $p=0,0357$).

O mesmo foi observado na análise da expressão da ASC, a qual não detectou interação entre o IS e o tratamento ($F_{(1, 24)} = 0,1649$, $p=0,6883$), ou alteração induzida pelo IS, indicado pela ausência de efeito da condição ($F_{(1, 24)} = 0,004821$, $p=0,9452$), mas sim uma redução significativa da expressão gênica desse componente nos grupos tratados com CBD, independente da condição ($F_{(1, 24)} = 16,36$, $p=0,0005$; Fig. 26B).

Já a análise da expressão da caspase-1 indicou ausência de interação entre os fatores ($F_{(1, 24)} = 2,255$, $p=0,1463$), bem como de efeitos de condição ($F_{(1, 24)} = 1,005e-006$, $p=0,9992$) e de tratamento ($F_{(1, 24)} = 1,655$, $p=0,2106$; Fig. 26C).

Semelhantemente à caspase-1, não houve interação entre os fatores na análise de expressão gênica da IL-1 β ($F_{(1, 21)} = 0,8448$, $p=0,3685$), efeito de condição ($F_{(1, 21)} = 0,3651$, $p=0,5522$) ou de tratamento ($F_{(1, 21)} = 1,698$, $p=0,2066$; Fig. 26D).

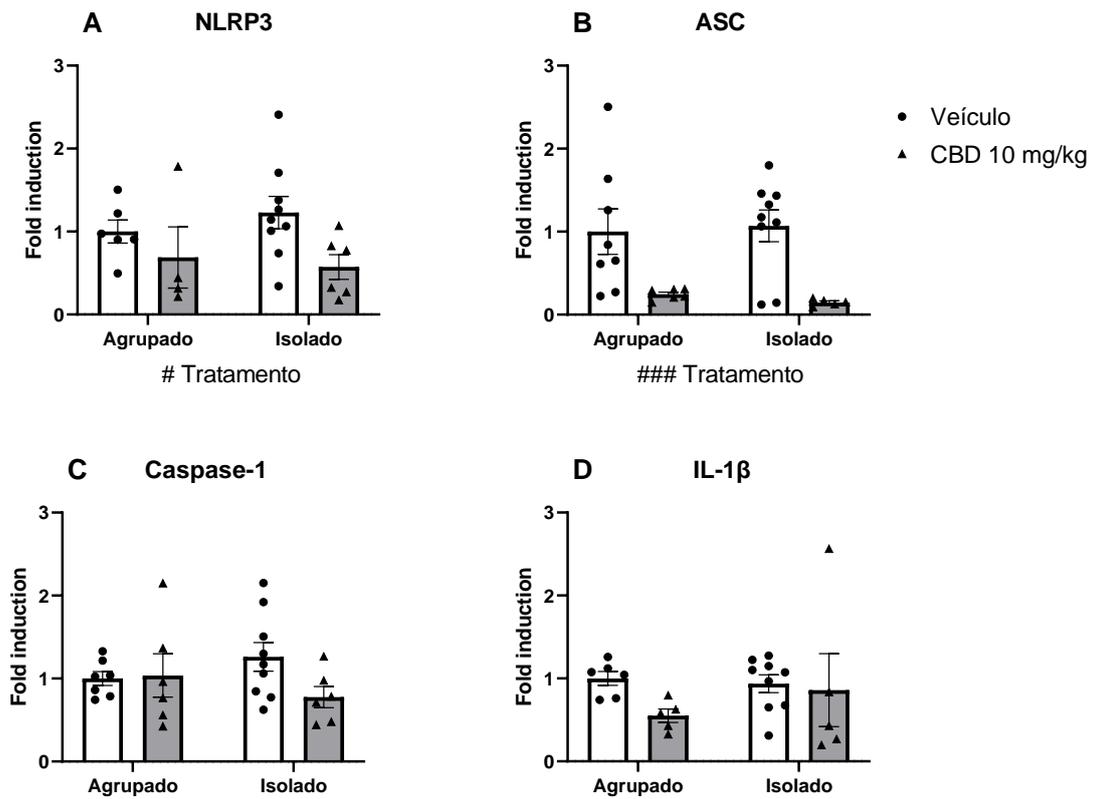


Figura 26. Avaliação da expressão gênica de componentes da via do inflamassoma de NLRP3. A) Expressão gênica de NLRP3; B) ASC; C) IL-1 β e D) caspase-1 dos grupos agrupado e isolado tratados com veículo ou CBD (10 mg/Kg). Dados analisados por ANOVA de 2 vias e apresentados como média \pm EPM (n=4-9). A: Agrupado; CBD: Canabidiol; I: Isolado; V: Veículo.

5.2. Experimento 2 - Avaliação dos efeitos do estresse de isolamento social e do tratamento com CBD em camundongos fêmeas adolescentes

5.2.1. Testes comportamentais

5.2.1.1. Teste do campo aberto (OFT, do inglês *open field test*)

Assim como nos animais adultos, o IS aumentou a atividade locomotora dos animais, demonstrado pelo efeito principal de condição ($F_{(1, 83)} = 13,19, p=0,0005$), observou-se também um perfil de redução desse efeito pelo CBD, através do efeito principal de tratamento ($F_{(3, 83)} = 2,373, p=0,0761$) e houve interação entre os fatores ($F_{(3, 83)} = 2,985, p=0,0359$). Foi detectado perfil de aumento da distância percorrida pelo grupo I-V comparado ao A-V ($p=0,0566$, Tukey), e aumento significativo pelo grupo I-3 comparado ao A-3 ($p=0,0354$, Tukey). Ademais, o CBD na dose de 10 atenuou o aumento da locomoção nos animais isolados ($p=0,0087$, Tukey; Fig. 27A).

Quanto à distância percorrida na periferia, o estresse ($F_{(1, 85)} = 1,469, p=0,2289$) e o tratamento com CBD não induziram alterações significativas ($F_{(3, 85)} = 0,3092, p=0,8187$); também não foi observado interação entre os fatores ($F_{(3, 85)} = 0,9525, p=0,4191$; Fig. 27B). Porém, nesse experimento foi identificada uma redução do tempo de permanência no centro induzida pelo IS ($F_{(1, 85)} = 10,86, p=0,0014$), e interação entre os fatores ($F_{(3, 85)} = 3,381, p=0,0219$), sem efeito do tratamento ($F_{(3, 85)} = 1,835, p=0,1469$). Foi observada uma redução significativa do tempo de permanência no centro do grupo I-10 comparado ao grupo A-10 ($p=0,0071$; Fig. 27C).

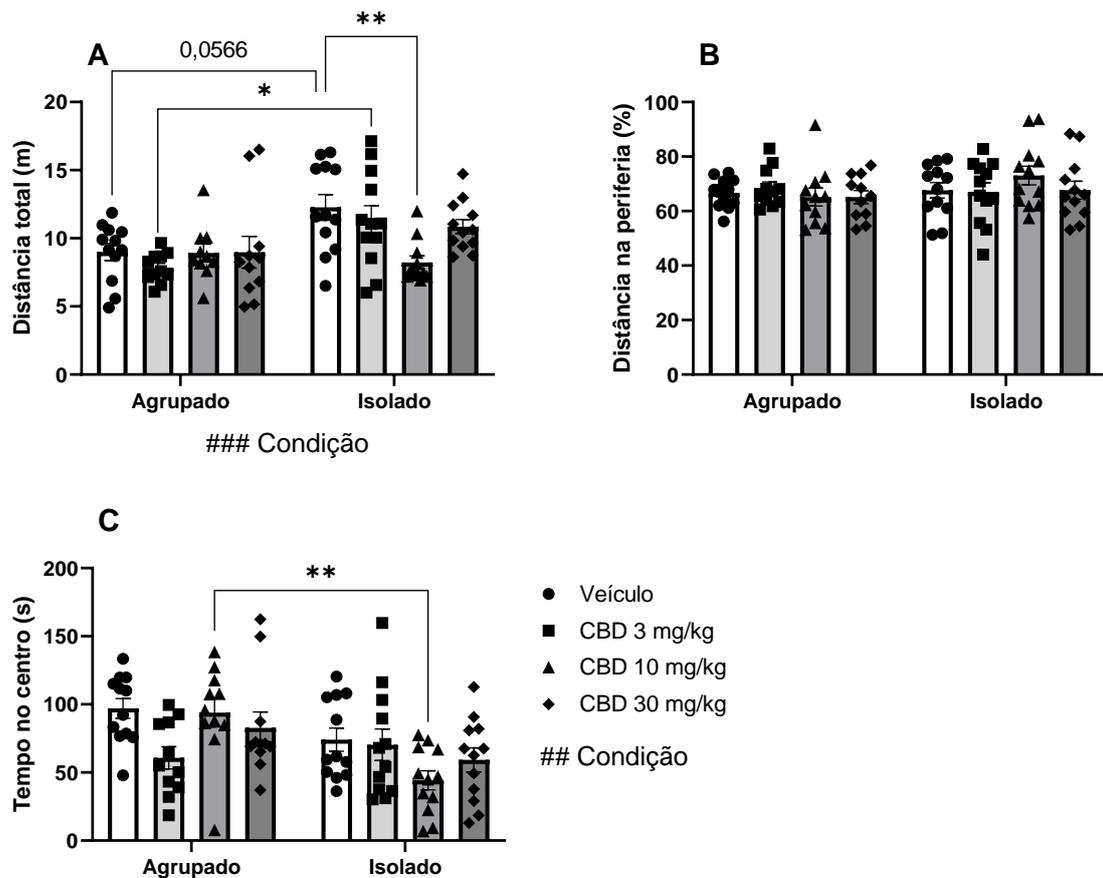


Figura 27. Experimento 2 - Avaliação da atividade locomotora e comportamento tipo-ansioso pelo OFT. A) Distância total percorrida. B) Distância percorrida na periferia. C) Tempo de permanência no centro. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A, B e C), seguido pelo pós-teste de Tukey (A e C) e apresentados como média \pm EPM (n=10-12). ###p<0,001 e ##p<0,01 para efeito principal de condição pela ANOVA de 2 vias. *p<0,05 entre os grupos A-3 e I-3. **p<0,01 entre os grupos I-V e I-10 (A) e entre os grupos A-10 e I-10 (C) pelo pós-teste de Tukey. OFT: Teste de campo aberto (do inglês: *open field test*); CBD: Canabidiol; A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

5.2.1.2. Teste de borrifagem de sacarose (ST, do inglês *splash test*)

Assim como no Experimento 1, não foi observada interação entre os fatores ($F_{(3, 83)} = 1,479$, $p=0,2262$) ou efeito principal de tratamento ($F_{(3, 83)} = 0,7198$, $p=0,5430$) sobre o tempo em autolimpeza no ST, entretanto, o IS reduziu significativamente esse parâmetro ($F_{(1, 83)} = 19,41$, $p<0,0001$; Fig. 28A). A análise posterior indicou tendência à redução do tempo em autolimpeza no grupo I-V comparado ao A-V ($t=1,988$, $df=22$, $p=0,0594$, teste t de Student; Fig. 28B). Esses dados sugerem que o estresse induziu comportamento tipo-depressivo nos animais adolescentes, assim como observado nos animais adultos.

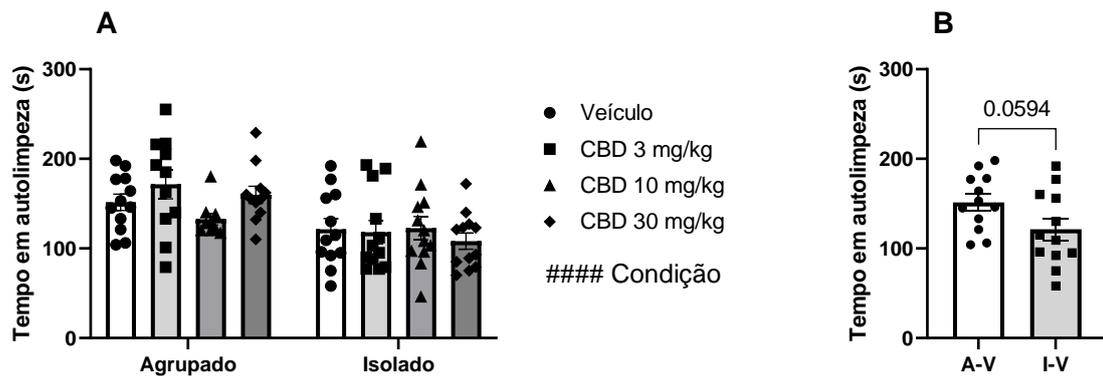


Figura 28. Experimento 2 - Avaliação do comportamento tipo-depressivo pelo ST. A) Tempo em autolimpeza no ST. B) Comparação entre os grupos A-V e I-V. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A), ou pelo teste t de Student (B) e apresentados como média \pm EPM (n=10-12). ##### $p < 0,0001$ para efeito principal de condição pela ANOVA de 2 vias. ST: Teste de borrifagem de sacarose (do inglês *splash test*); CBD: Canabidiol; A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

5.2.1.3. Teste de reconhecimento de objetos (NOR, do inglês *novel object recognition test*)

Não foram observadas alterações na memória a curto-prazo dos animais na sessão de STM do NOR (interação: $F_{(3, 56)} = 0,6411$, $p = 0,5918$; condição: $F_{(1, 56)} = 0,5181$, $p = 0,4746$; tratamento: $F_{(3, 56)} = 0,08900$, $p = 0,9658$; Fig. 29A). Já na sessão de LTM, enquanto não houve interação entre os fatores ($F_{(3, 56)} = 0,4706$, $p = 0,7040$) ou efeito do tratamento ($F_{(3, 56)} = 1,732$, $p = 0,1709$), foi identificado aumento da interação com o objeto novo induzido pelo IS ($F_{(1, 56)} = 4,403$, $p = 0,0404$). A comparação entre os grupos A-V e I-V, no entanto, não detectou esse efeito ($t = 0,1669$, $df = 16$, $p = 0,8695$, teste t de Student; Fig. 29B).

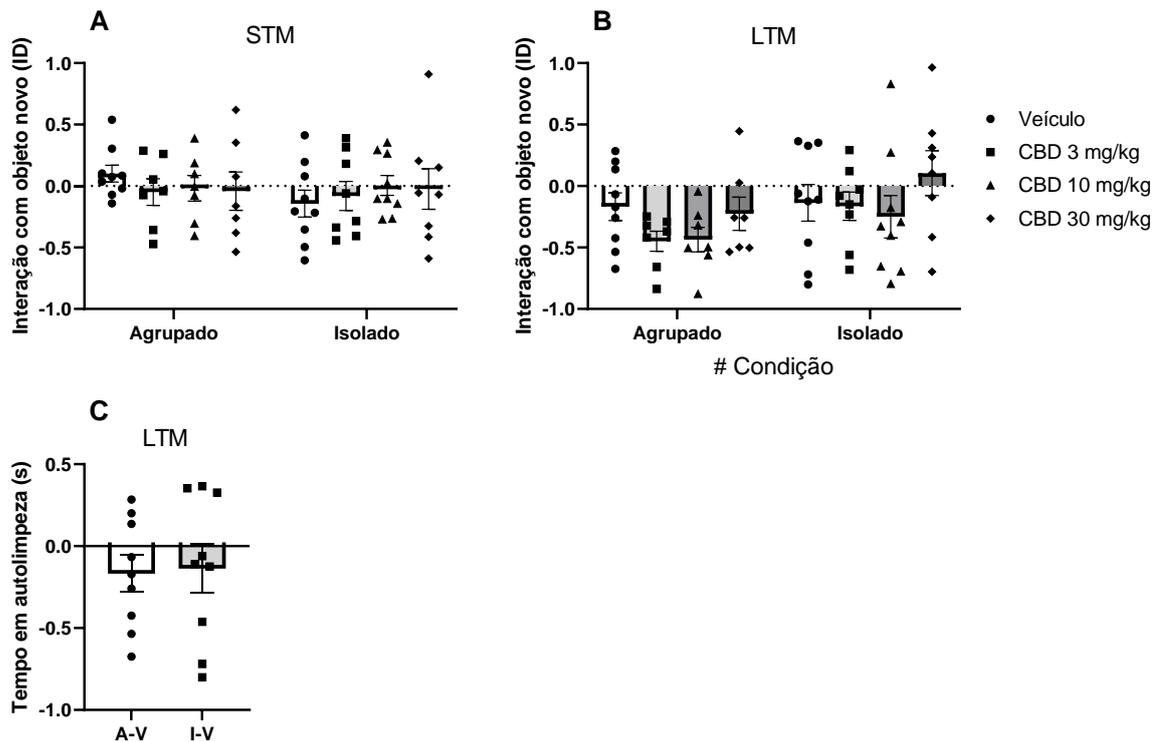


Figura 29. Experimento 2 - Avaliação da memória de curto e longo-prazo pelo NOR. A) Tempo de interação com o objeto novo na sessão de STM. B) Tempo de interação com o objeto novo na sessão de LTM. C) Comparação entre os grupos A-V e I-V na sessão de LTM. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A e B) ou teste t de Student (C) e apresentados como média \pm EPM (n=7-9). NOR: Teste de reconhecimento de objetos (do inglês *novel object recognition test*); STM: Memória de curto-prazo (do inglês *short term memory*); LTM: Memória de longo-prazo (do inglês *long term memory*); CBD: Canabidiol; A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

5.2.1.4. Teste de preferência social (SPT, do inglês *social preference test*)

Não houve interação entre os fatores ($F_{(3, 85)} = 1,121$, $p=0,3451$), ou efeitos principais de condição ($F_{(1, 85)} = 0,7563$, $p=0,3869$) ou tratamento ($F_{(3, 85)} = 0,2044$, $p=0,8931$) no tempo de interação com o animal-estímulo no SPT (Fig. 30A).

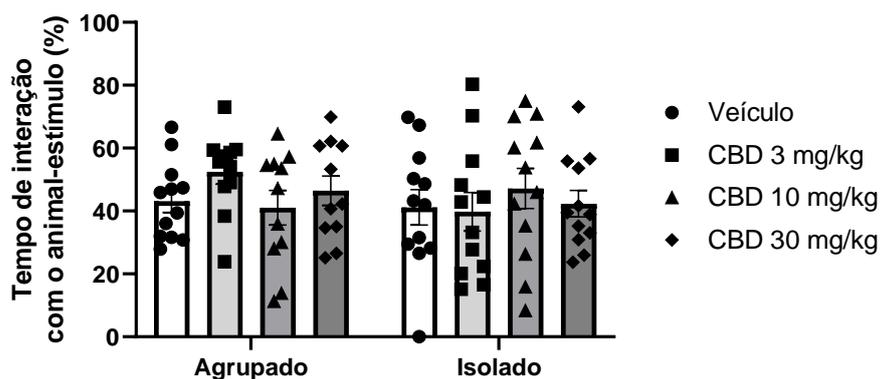


Figura 30. Experimento 2 - Avaliação da preferência social pelo SPT. Tempo de interação com o animal-estímulo no SPT. Dados analisados por ANOVA de 2 vias e apresentados como média \pm EPM (n=11-12). SPT: Teste de preferência social (do inglês *social preference test*); CBD: Canabidiol.

5.2.1.5. Teste de alimentação suprimida pela novidade (NSFT, do inglês *novelty suppressed feeding test*)

A análise da latência para alimentação na caixa teste não identificou interação entre os fatores ($F_{(3, 79)} = 1,154$, $p=0,3325$) nem efeitos principais de condição ($F_{(1, 79)} = 0,03144$, $p=0,8597$) ou de tratamento ($F_{(3, 79)} = 1,067$, $p=0,3680$; Fig. 31A), sugerindo que o IS não induziu comportamento tipo-ansioso nessa idade, ao contrário do observado nos animais adultos.

De forma semelhante, apesar de haver tendência à interação entre os fatores ($F_{(3, 81)} = 2,310$, $p=0,0825$), o comportamento alimentar dos animais não foi influenciado pelo isolamento ou pelo CBD, como indicado pela ausência de efeitos de condição ($F_{(1, 81)} = 0,01228$, $p=0,9120$) e tratamento ($F_{(3, 81)} = 1,736$, $p=0,1661$) sobre a latência para alimentação na caixa casa (Fig. 31B).

Uma vez que não houve alteração na latência para alimentação em ambos os contextos, a normalização da latência para alimentação na caixa teste pela caixa casa também indicou tendência à interação entre os fatores ($F_{(3, 75)} = 2,526$, $p=0,0639$), mas ausência de efeitos principais de condição ($F_{(1, 75)} = 0,2665$, $p=0,6072$) e tratamento ($F_{(3, 75)} = 2,083$, $p=0,1097$; Fig. 31C).

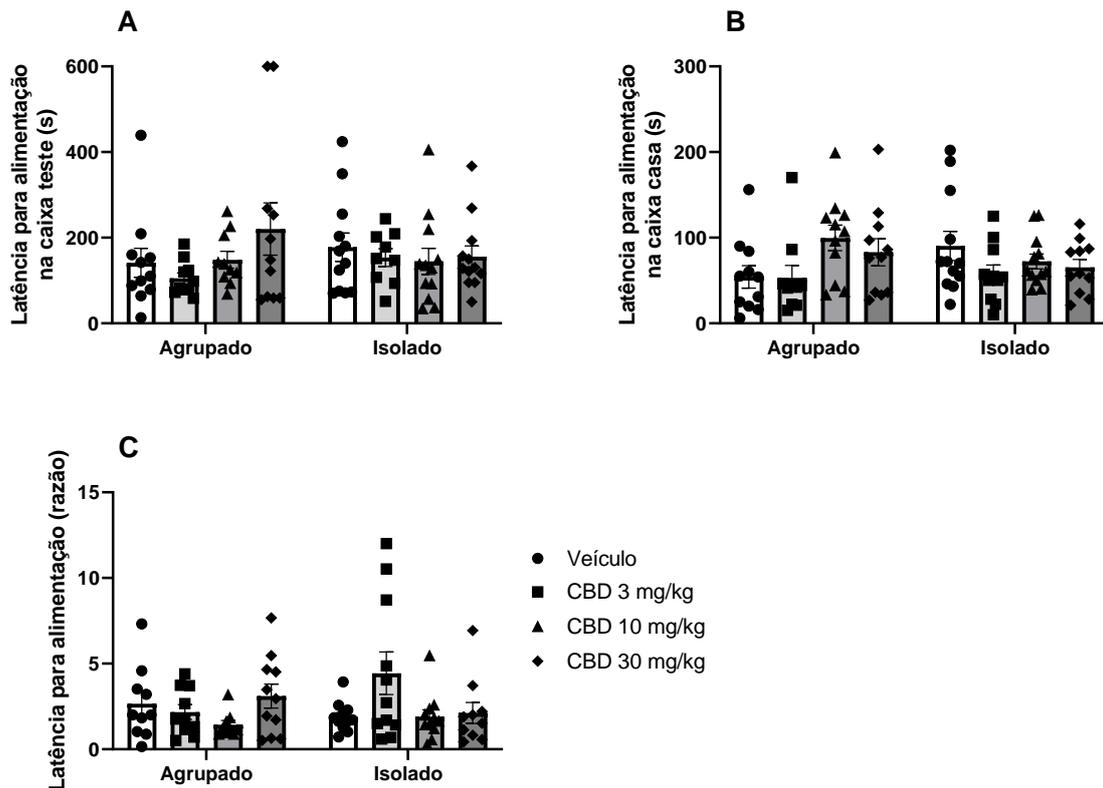


Figura 31. Experimento 2 - Avaliação do comportamento tipo ansioso e comportamento alimentar pelo NSFT. A) Latência para alimentação na caixa teste. B) Latência para alimentação na caixa casa. C) Razão da latência para alimentação na caixa teste pela caixa casa. Dados analisados por ANOVA de 2 vias e apresentados como média \pm EPM (n=9-12). NSFT: Teste de alimentação suprimida pela novidade (do inglês *novelty suppressed feeding test*); CBD: Canabidiol.

5.2.1.6. Teste de interação social (SIT, do inglês *social interaction test*)

Assim como observado no SPT, não foi detectado efeito do IS ou do tratamento com CBD sobre o tempo de interação com o animal-estímulo no SIT (condição: $F_{(1, 83)} = 0,8108$, $p=0,3705$; tratamento: $F_{(3, 83)} = 0,2430$, $p=0,8661$) ou interação entre os fatores ($F_{(3, 83)} = 0,1687$, $p=0,9172$; Fig. 32). Esses dados, aliados aos resultados do SPT, indicam que o IS não induziu aumento da interação social nos animais adolescentes.

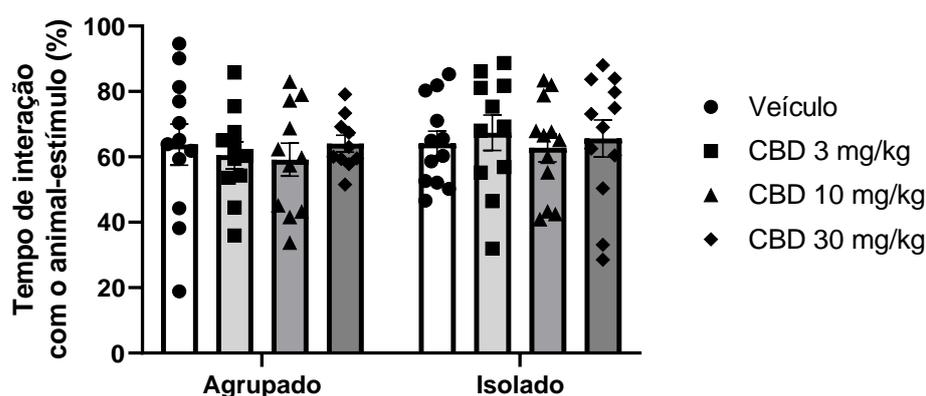


Figura 32. Experimento 2 - Avaliação da interação social pelo SIT. Tempo de interação com o animal-estímulo no SIT. Dados analisados por ANOVA de 2 vias e apresentados como média \pm EPM (n=11-12). SIT: Teste de interação social (do inglês *social interaction test*); CBD: Canabidiol.

5.2.1.7. Teste do nado forçado (FST, do inglês *forced swimming test*)

A análise do tempo de imobilidade nos dois primeiros minutos do FST não indicou interação entre os fatores ($F_{(3, 82)} = 0,6155$, $p=0,6069$), ou efeito de tratamento ($F_{(3, 82)} = 0,2713$, $p=0,8460$), porém, foi identificada redução desse parâmetro induzida pela condição ($F_{(1, 82)} = 7,975$, $p=0,0060$; Fig. 33A). Ao comparar os animais dos grupos A-V e I-V, no entanto, não foi observado o mesmo efeito ($t=0,8790$, $df=22$, $p=0,3889$, teste t de Student; Fig. 33B), sugerindo que o efeito identificado pela ANOVA de 2 vias foi desviado pelos grupos I-3 e I-30.

Similarmente, a análise desse parâmetro nos últimos quatro minutos também demonstrou ausência de interação e efeitos principais (interação: $F_{(3, 85)} = 0,6709$, $p=0,5722$; condição: $F_{(1, 85)} = 1,365$, $p=0,2460$; tratamento: $F_{(3, 85)} = 0,4070$, $p=0,7483$; Fig. 33C). O mesmo foi observado na análise da imobilidade no tempo total do teste (interação: $F_{(3, 85)} = 0,7492$, $p=0,5258$; condição: $F_{(1, 85)} = 1,782$, $p=0,1855$; tratamento: $F_{(3, 85)} = 0,2439$, $p=0,8654$; Fig. 33D), indicando ausência de comportamento tipo-depressivo no FST.

Esses dados sugerem que, apesar de ter sido observado no ST um comportamento tipo-depressivo induzido pelo IS, as características distintas do comportamento tipo-depressivo avaliadas em cada teste podem ter levado à divergência dos resultados.

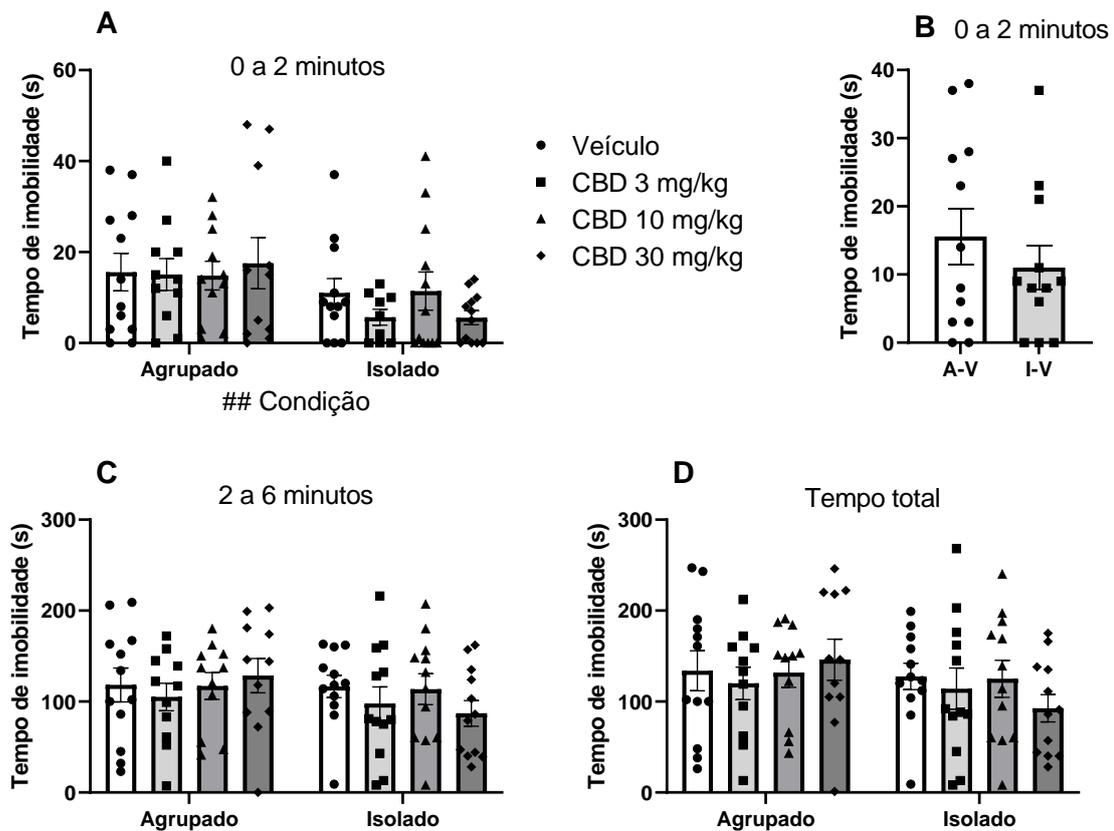


Figura 33. Experimento 2 - Avaliação do comportamento tipo-depressivo pelo FST. A) Tempo de imobilidade nos dois primeiros minutos do FST. B) Comparação entre o tempo de imobilidade nos dois primeiros minutos dos grupos A-V e I-V. C) Tempo de imobilidade nos últimos quatro minutos e D) no tempo total do FST. Dados analisados por ANOVA de 2 vias (A, C e D) e teste t de Student (B) e apresentados como média \pm EPM (n=11-12). FST: Teste do nado forçado (do inglês *forced swimming test*); CBD: Canabidiol. A: Agrupado; I: Isolado; V: Veículo.

5.2.2. Z Score dos testes comportamentais

Da mesma forma que no Experimento 1, os dados dos testes comportamentais foram utilizados para o cálculo da estatística Z. A análise do valor do Z Score geral de cada animal indicou ausência de interação entre os fatores ($F_{(3, 85)} = 1,207$, $p=0,3121$), bem como de efeitos principais do IS ($F_{(1, 85)} = 2,070$, $p=0,1539$) e do tratamento com CBD ($F_{(3, 85)} = 0,3401$, $p=0,7964$; Fig. 34). Esse resultado sugere que, ao contrário do observado nos animais adultos, o IS não induziu um aumento da emocionalidade nos animais adolescentes.

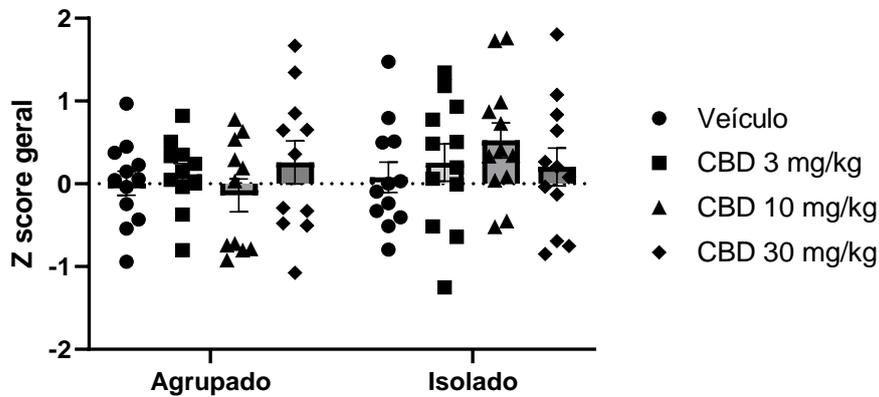


Figura 34. Experimento 2 - Avaliação da emocionalidade dos animais pelo Z Score. Z score geral de todos os grupos. Dados analisados por ANOVA de 2 vias e apresentados como média \pm EPM (n=11-12). CBD: Canabidiol.

5.2.3. Avaliação do peso de órgãos

5.2.3.1. Peso do baço

A análise do peso normalizado do baço indicou ausência de interação ($F_{(3, 83)} = 1,240$, $p=0,3007$) e de efeitos principais de condição ($F_{(3, 83)} = 0,9473$, $p=0,4217$) ou de tratamento ($F_{(1, 83)} = 2,150$, $p=0,1464$; Fig. 35).

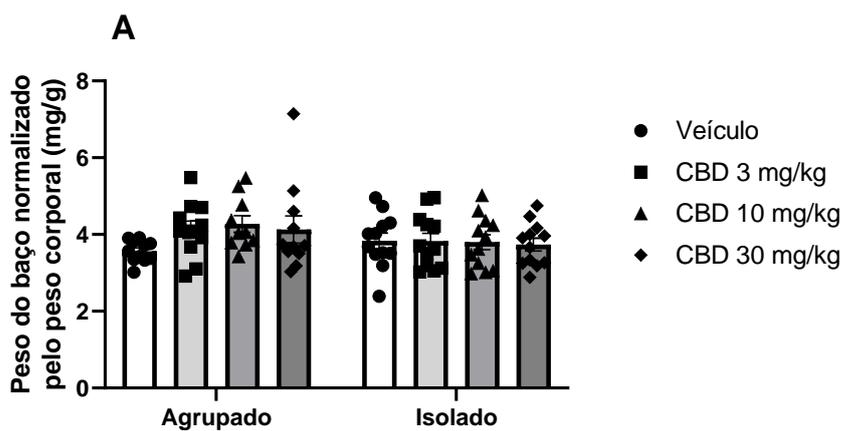


Figura 35. Experimento 2 - Avaliação do peso do baço. A) Peso do baço normalizado pelo peso corporal. Dados analisados por ANOVA de 2 vias e apresentados como média \pm EPM (n=11-12). CBD: Canabidiol.

5.2.3.2. Peso das glândulas adrenais

O peso das glândulas adrenais, conforme analisado pela ANOVA de 2 vias, não foi influenciado pelo IS ($F_{(1, 85)} = 2,339$, $p=0,1299$) ou pelo tratamento com CBD ($F_{(3, 85)} = 0,9035$, $p=0,4430$), além disso não foi detectada interação entre os fatores ($F_{(3, 85)} = 0,6408$, $p=0,5908$; Fig. 36).

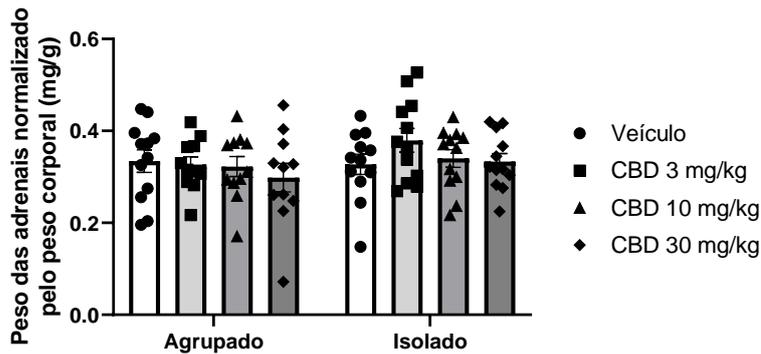


Figura 36. Experimento 2 - Avaliação do peso das glândulas adrenais. Peso das glândulas adrenais normalizado pelo peso corporal. Dados analisados por ANOVA de 2 vias e apresentados como média \pm EPM (n=11-12). CBD: Canabidiol.

5.2.4. Análise de correlação entre o tratamento com CBD ou o tempo com o peso corporal dos animais

Para explorar os efeitos do tratamento repetido com CBD nas 3 doses comparado ao tratamento com veículo sobre o peso dos animais ao longo do experimento, foi calculado o coeficiente de correlação através da análise de correlação de Spearman com os fatores: peso corporal, tempo (semanas do experimento) e dose de CBD administrada (0 para os animais veículo, 3, 10 ou 30). Os resultados dessa análise indicaram forte correlação positiva entre o peso dos animais e a semana do experimento (Spearman $r=0,679$, $p<0,0001$), o que era esperado, visto que os animais ainda estavam em desenvolvimento durante o protocolo experimental. Por outro lado, a correlação entre o peso e o tratamento com CBD não foi significativa (Spearman $r=0,009$, $p=0,847$), ao contrário do observado nos animais adultos (Fig. 37).

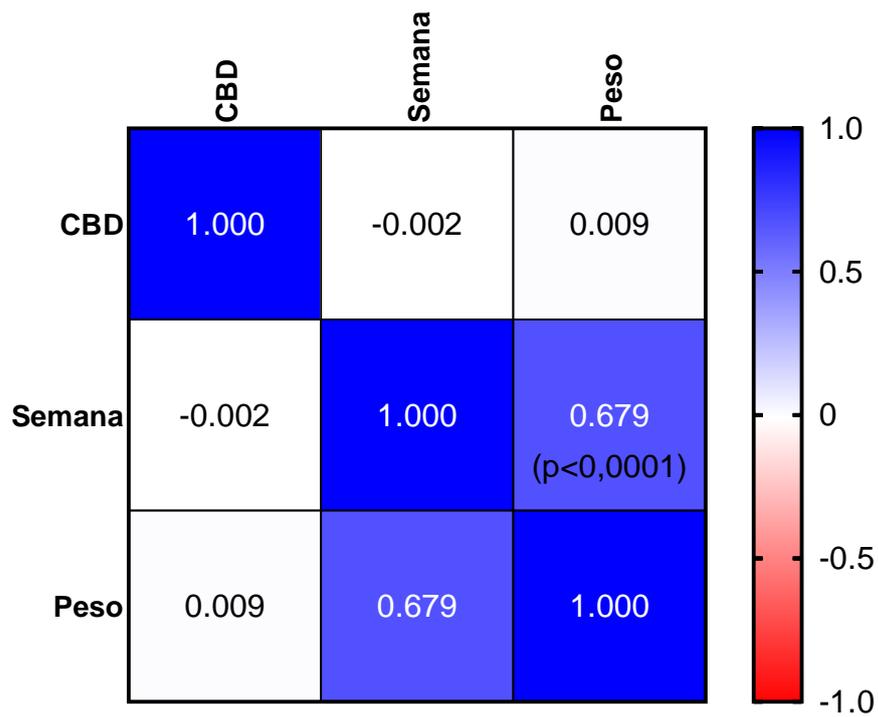


Figura 37. Experimento 2 - Análise de correlação entre o peso corporal dos animais, tempo do experimento e tratamento com CBD. Dados analisados por correlação de Spearman e apresentados como valor de r ($n=12-16$). CBD: Canabidiol.

6. DISCUSSÃO

Estudos acerca das alterações comportamentais, moleculares e estruturais decorrentes da exposição ao estresse são de grande importância para a construção de conhecimento sobre a neurobiologia de transtornos psiquiátricos. Aliado a isso, o estudo dos efeitos e mecanismos de ação de diferentes compostos frente a essas alterações pode ajudar na busca por novas intervenções farmacológicas na área da psiquiatria. Nesse sentido, o cenário global imposto pela pandemia de COVID-19 impulsionou pesquisas clínicas e pré-clínicas, como o presente trabalho, sobre os efeitos comportamentais e fisiológicos induzidos pelo IS, além da busca por medidas capazes de atenuar os danos causados por esse evento.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o estresse de IS durante 28 dias induziu alterações comportamentais em camundongos fêmeas tanto na adolescência quanto na vida adulta, tais como o aumento da atividade locomotora e o comportamento tipo-ansioso, no OFT, e redução do tempo em autolimpeza no ST, efeito associado ao comportamento tipo-depressivo em roedores (WILLNER, 2005). Por outro lado, algumas alterações foram particulares à idade dos animais, como o comportamento tipo-ansioso no NSFT, o aumento da motivação social no SPT e SIT, a redução do tempo de imobilidade avaliada no FST e o aumento do peso das glândulas adrenais observado nos animais adultos. É relevante mencionar, no entanto, que alguns dos efeitos do estresse detectados pela ANOVA de 2 vias, como o aumento na interação social (SPT e SIT) e a redução do tempo de imobilidade (FST), não foram observados na comparação entre os grupos agrupado e isolado tratados com veículo, o que pode indicar desvios do cálculo de efeito principal induzidos por alterações em grupos específicos em cada condição. Já em relação ao tratamento, embora as doses de CBD de 3 e 30 mg/Kg não tenham demonstrado efeito, a dose de 10 mg/Kg atenuou a hiperlocomução dos animais adolescentes no OFT e o comportamento tipo-ansioso dos animais adultos no NSFT.

A ambulação e a atividade exploratória, em roedores, são comportamentos inatos motivados pela necessidade de se coletar informações sobre possíveis ameaças, rotas de fuga e esconderijos (ROJAS-CARVAJAL et al., 2018). Além disso, roedores tendem a evitar áreas grandes e abertas, devido à maior exposição e, conseqüentemente, maior risco de ataques de predadores, preferindo permanecer próximos às paredes da arena (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015; WEBSTER; BAUMGARDNER; DEWSBURY, 1979; WILSON et al., 1976). Nesse contexto, eventos estressantes, como o IS, são capazes de promover alterações nesses comportamentos, tais como o aumento da atividade locomotora e da redução do

tempo de permanência ou da distância percorrida no centro do aparato (CAMPOS et al., 2013b; SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). De fato, o aumento da locomoção e o comportamento tipo-ansioso são observados em diversos estudos com modelos de IS tanto em machos quanto em fêmeas, de diferentes linhagens e idades (IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016; ROS-SIMÓ; VALVERDE, 2012; STREKALOVA et al., 2005; SULLENS et al., 2021; VÕIKAR et al., 2005; WEI et al., 2007). Esse efeito também já foi observado no modelo de estresse crônico imprevisível (CUS, do inglês *chronic unpredictable stress*), um dos modelos que melhor atende os critérios de validade previamente mencionados, e mais recentemente, em um novo modelo de mania chamado “perturbação de ritmo crônico imprevisível” (CURD, do inglês *chronic unpredictable rhythm disturbance*) (LI et al., 2023; SEQUEIRA-CORDERO et al., 2019).

É relevante mencionar que ao serem reexpostos ao OFT, os animais tendem a se habituar à arena, o que pode levar à atenuação das possíveis diferenças comportamentais, principalmente a exploração do ambiente e o comportamento tipo-ansioso (CHOLERIS et al., 2001; ROJAS-CARVAJAL et al., 2018). Desta forma, analisando os resultados obtidos no presente trabalho, é possível sugerir que as fêmeas adultas reconheceram a arena do OFT, o que atenuou os comportamentos de hiperlocomoção e tipo-ansioso induzidos pelo IS. Essa hipótese é corroborada pelo fato de que os animais adolescentes, expostos uma só vez à arena, apresentaram hiperlocomoção e comportamento tipo-ansioso, e que essas alterações foram observadas quando calculada a razão dos dados do OFT pelo OFT basal dos animais adultos.

Além disso, a observação de hiperlocomoção em reexposições ao OFT está relacionada a falhas na habituação ao ambiente e ao comportamento de hipervigilância, o qual é caracterizado pelo prejuízo em assimilar pistas que sinalizam segurança e resposta exacerbada a ameaças leves. Uma das possíveis causas para esse cenário são prejuízos na inibição do sistema de vigília e na evocação de informações previamente adquiridas, um indicador de déficit cognitivo (GRILLON, 2002; PARK; CAMPBELL; DIAMOND, 2001). Dessa forma, é possível sugerir que enquanto o protocolo de IS por 4 semanas aumentou a locomoção e induziu alterações comportamentais relacionadas à ansiedade nesse teste, o fato de os animais adultos terem reconhecido a arena pode indicar que não houve prejuízo cognitivo associado ao comportamento de hipervigilância. Esses dados podem ser úteis para o estudo translacional dos efeitos do IS em humanos, visto que animais submetidos a períodos mais longos de IS apresentaram prejuízos na memória (LIU et al., 2020b; NIU et al., 2020; WATANABE et al., 2022), aliado ao aumento no número de queixas relacionadas à memória desde a pandemia de

COVID-19, e que aspectos psicossociais, como o IS, foram associados positivamente a essas queixas (FOLAYAN et al., 2023).

Considerando-se essas evidências, o NOR foi realizado como parte dos testes comportamentais do presente estudo. No entanto, a padronização deste teste se mostrou complexa, uma vez que os animais apresentavam pouco tempo de interação com os objetos, mesmo após alterações no protocolo, como o aumento do tempo da sessão de habituação e substituição dos objetos utilizados por outros com cores mais fortes e figuras mais distintas. Por outro lado, vale destacar que os estudos citados observaram déficits cognitivos após períodos de 7 a 9 semanas de IS, ao passo que o presente trabalho utilizou apenas 4 semanas, levantando a possibilidade de que períodos mais curtos de IS podem induzir alterações comportamentais sem induzir alterações cognitivas.

Interessantemente, embora ambas as idades tenham apresentado comportamento tipicamente ansioso induzido pelo IS no OFT, no NSFT este comportamento foi observado apenas nos animais adultos. Diante disso, dois fatores relacionados às diferenças entre os experimentos 1 e 2 podem ser destacados: primeiramente, é possível que as duas idades tenham respondido de forma diferente ao NSFT, uma vez que a latência média do grupo controle (Agrupado-Veículo) adolescente (141,45 segundos) foi inferior à do grupo controle adulto (190,86 segundos), permitindo sugerir que os animais adolescentes apresentaram, naturalmente, uma menor aversão à caixa-teste. Nesse sentido, um estudo acerca dos efeitos dependentes do sexo e do período de exposição ao estresse (pré-puberdade e pós-puberdade) identificou que ratos machos foram mais suscetíveis ao estresse de choque nas patas combinado com estresse de restrição quando expostos no período pré-puberdade, enquanto as fêmeas apresentaram maior susceptibilidade ao mesmo estresse quando expostas após a puberdade (ZHU; GRACE, 2023). Apesar das diferenças claras de espécie e estímulo utilizados, esse dado permite levantar a possibilidade de que fêmeas adolescentes sejam menos suscetíveis aos efeitos comportamentais do estresse quando comparadas a fêmeas adultas, possibilitando o desenvolvimento de novos questionamentos acerca das vias neurais envolvidas nesse fenômeno.

Além da idade dos animais, é possível que o sexo do experimentador presente durante a sessão da caixa-teste no NSFT, o qual foi homem no Experimento 1, e mulher no Experimento 2, possa ter influenciado a resposta comportamental dos animais. Essa hipótese pode ser corroborada por dados de um estudo recente, o qual observou que camundongos machos e fêmeas de diversas linhagens apresentaram aversão ao cheiro de experimentadores homens,

preferência ao cheiro de experimentadoras mulheres e maior suscetibilidade ao estresse quando manuseados por experimentadores homens (GEORGIOU et al., 2022). Esse mesmo estudo observou que a aversão ao cheiro dos experimentadores homens foi mediada pela ativação de neurônios do CRH no córtex entorrinal. Dessa forma, é possível que os animais adultos tiveram o comportamento tipo-ansioso intensificado devido à presença do experimentador masculino. Vale ressaltar, ainda, que uma possibilidade não exclui a outra, e que a diferença entre os experimentos possa ter ocorrido em virtude da menor susceptibilidade dos animais adolescentes e da presença do experimentador homem durante o teste.

Resultados divergentes foram encontrados em relação aos efeitos do CBD. Apesar das evidências de que essa droga é capaz de atenuar o comportamento tipo-ansioso e a hiperlocomção induzida por drogas psicotomiméticas (CAMPOS et al., 2013a; FOGAÇA et al., 2018; MOREIRA; GUIMARÃES, 2005; ZUARDI et al., 2017b), esses efeitos não foram constantes nos resultados do presente estudo. Conforme demonstrado, o CBD na dose de 10 mg/Kg atenuou o comportamento tipo-ansioso dos animais adultos no NSFT, e a hiperlocomção dos animais adolescentes, mas não dos animais adultos, no OFT. Essa variabilidade na resposta ao tratamento pode estar associada ao fato de os animais não serem isogênicos, e, por consequência, apresentarem mais diferenças fenotípicas, o que poderia reduzir a sensibilidade do teste (FESTING, 1999). Por outro lado, a observação de efeito tipo-ansiolítico significativo apesar da heterogeneidade dos animais, pode indicar um bom perfil translacional, uma vez que isso é congruente com o que se observa na população humana.

Ademais, além da observação de que apenas a dose intermediária de 10 mg/Kg promoveu estes efeitos, a resposta comportamental dos animais tratados com CBD produziu uma curva em formato de U invertido, mesmo em parâmetros em que não houve efeito do tratamento. Esse padrão de curva dose-resposta é caracterizado pela presença de efeito em doses intermediárias, enquanto doses mais baixas e mais altas apresentam pouco ou nenhum efeito, e é frequentemente observado em estudos com o CBD, bem como com canabinoides em geral (GUIMARÃES et al., 1990; ONAIVI; GREEN; MARTIN, 1990). Diferentes mecanismos já foram propostos para esse fenômeno, como a ativação de TRPV1, um receptor cuja ativação está relacionada a comportamentos tipo-ansiosos (CAMPOS et al., 2012; CAMPOS; GUIMARÃES, 2009b; MASCARENHAS; GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2013).

Apesar de frequentemente associado ao efeito tipo-ansiolítico do CBD, o padrão de resposta em formato de U invertido não é exclusivo a esta resposta, sendo observado em outros

comportamentos, tais como o de resignação frente a um estresse inescapável, comportamento avaliado pelo FST e teste de suspensão pela cauda (TST, do inglês *tail suspension test*) (SCHIAVON et al., 2016; ZANELATI et al., 2010), comportamentos compulsivos, através do teste de esconder esferas (CASAROTTO et al., 2010) e cognição, avaliada no NOR (LUJÁN et al., 2018). É interessante ressaltar que a dose eficaz do CBD diferiu entre esses estudos, provavelmente em função das diferentes linhagens, metodologias e regimes de tratamento, o que indica que a dose eficaz do CBD pode variar conforme o protocolo experimental e a linhagem utilizada. De acordo, Silote e colaboradores (2021) observaram um fenômeno semelhante relacionado ao efeito tipo-antidepressivo do CBD em camundongos machos e fêmeas das linhagens Swiss e C57BL/6, no qual camundongos machos Swiss apresentaram comportamento tipo-antidepressivo no TST, mas não as fêmeas ou os animais C57BL/6.

A anedonia e a apatia estão presentes em diversos transtornos neuropsiquiátricos (GORWOOD, 2008), e são relacionados, principalmente, à desregulação do sistema dopaminérgico, particularmente, ao sistema de recompensa (BELUJON; GRACE, 2017; GORWOOD, 2008; GRACE, 2016). Estudos demonstraram que roedores socialmente isolados tendem a apresentar comportamento tipo-anedônico através da redução do consumo e/ou da preferência por uma solução de sacarose (HELMAN et al., 2022; WALLACE et al., 2009) e do tempo em autolimpeza no ST, o qual é associado aos parâmetros de anedonia e apatia, uma vez que o ato de se limpar é caracterizado como autocuidado (HAJ-MIRZAIAN et al., 2015). Neste trabalho, o tratamento com CBD não foi eficaz em reestabelecer o tempo em autolimpeza avaliado no ST em ambos os experimentos. Apesar de evidências de que o CBD é capaz de atenuar comportamentos tipo-depressivos (LINGE et al., 2016; SILOTE et al., 2019), inclusive relacionados à anedonia (GÁLL et al., 2020; REUVENI et al., 2022), é importante ressaltar que esses efeitos foram observados em outros protocolos de estresse, sendo este o primeiro estudo a avaliar o efeito do CBD nas alterações induzidas pelo IS crônico. Interessantemente, foi observado que em camundongos machos isolados por 28 dias, o bloqueio farmacológico de receptores do tipo NMDA atenuou os comportamentos tipo-depressivos induzidos pelo isolamento, tais como o aumento do tempo de imobilidade no FST e a redução do tempo em autolimpeza no ST (HAJ-MIRZAIAN et al., 2015), sugerindo que esses receptores desempenham um importante papel na regulação desses comportamentos.

Ao contrário do observado no ST, não foi identificado comportamento tipo-depressivo no FST. Trabalhos na literatura que avaliaram os efeitos do IS sobre o tempo de imobilidade no FST ou no TST relataram resultados contraditórios, havendo estudos que reportaram

aumento do tempo de imobilidade (HAJ-MIRZAIAN et al., 2015; LI et al., 2021a; LIU et al., 2020b), estudos que não identificaram diferença entre os grupos (SULLENS et al., 2021; WU et al., 2022) e ainda, um estudo que observou redução desse parâmetro nos animais isolados (ROS-SIMÓ; VALVERDE, 2012). É descrito que o tempo de imobilidade avaliado no FST pode sofrer influência direta de efeitos locomotores (STREKALOVA et al., 2005). Considerando o aumento da atividade locomotora observado neste trabalho, no OFT, é possível que essa hiperlocomoção induzida pelo IS tenha interferido no tempo de imobilidade dos animais no FST. Outra possibilidade é de que o aumento do tempo de imobilidade esteja relacionado à duração do IS, uma vez que a maioria dos estudos que observaram esse efeito utilizaram protocolos de 7 a 9 semanas de isolamento (LI et al., 2021b; LIU et al., 2020b; NIU et al., 2020). Assim como neste trabalho, em um estudo com fêmeas adultas (18 meses) submetidas a 4 semanas de isolamento, período semelhante ao utilizado no presente estudo, esse efeito não foi observado (SULLENS et al., 2021). É interessante mencionar ainda, que dois estudos observaram aumento do tempo de imobilidade nos animais isolados somente ao realizarem duas sessões de FST, sendo esse efeito observado na segunda sessão (KOIKE et al., 2009; MEDENDORP et al., 2018). Esses relatos sugerem que a influência do IS sobre o comportamento tipo-depressivo observado no FST é controversa e parece sensibilizar o organismo, alterando as estratégias de enfrentamento ao estresse; porém os dados da literatura permitem pouca especulação acerca dos mecanismos envolvidos nesse efeito.

Assim como para seres humanos, as interações sociais são de grande importância para roedores, e possuem caráter recompensador e motivador (DOUGLAS; VARLINSKAYA; SPEAR, 2003; PANKSEPP; LAHVIS, 2007), particularmente em animais adolescentes, os quais tendem a apresentar ainda mais interações sociais do que animais mais jovens ou mais velhos (PANKSEPP et al., 2007). Nesse sentido, estudos demonstram que o IS causa diversos prejuízos a nível cerebral, tais como redução da espessura da mielina no córtex pré-frontal medial (mPFC) e alteração na excitabilidade de redes perineuronais de camundongos, o que pode resultar em alterações comportamentais relacionadas à ansiedade e depressão (XIONG et al., 2023). Matthews e Tye (2020) sugeriram a existência de um complexo sistema responsável pela regulação da chamada homeostase social, ou seja, do equilíbrio entre a necessidade de interação e a que é efetivamente atingida. Esse sistema atuaria através da detecção e comparação da quantidade e/ou qualidade das relações sociais, o que induziria a ativação do centro de controle social, que, por sua vez, atuaria em outros centros de controle, como de

temperatura e energia, produzindo respostas tanto internas, como alterações emocionais, quanto externas, como adaptações comportamentais.

Dados da literatura acerca dos efeitos do isolamento sobre a interação social demonstram resultados divergentes, embora a maioria identifique comportamentos sociais anormais após esse estresse. Alguns estudos demonstraram que roedores socialmente isolados tendem a apresentar maior busca por interação social (NIESINK; VAN REE, 1982; SHIRENOVA; KHLEBNIKOVA; KRUPINA, 2023; VÕIKAR et al., 2005), enquanto outros identificaram redução desse parâmetro (MAKINODAN et al., 2012; YAMAMURO et al., 2020) ou ausência de diferença entre os grupos (SULLENS et al., 2021). Por outro lado, camundongos *Swiss* machos submetidos a 10 dias de IS apresentaram comportamento antissocial, caracterizado pelo aumento no número e na duração de ataques a um animal novo inserido em sua caixa-casa, no teste de residente-intruso (HARTMANN et al., 2019), efeito também observado em outros estudos (KOIKE et al., 2009; PINNA et al., 2003). Interessantemente, Pinna e colaboradores (2003) observaram que em camundongos machos e fêmeas isolados durante 4 semanas, apenas os machos apresentaram comportamento agressivo, associado à redução de alopregnanolona no bulbo olfatório desses animais, o que não foi observado nas fêmeas. Esses dados reiteram a ideia de que as alterações sociais induzidas pelo IS são heterogêneas e estão associadas a diferenças nos protocolos, particularmente à duração do estresse, ao sexo dos animais e ainda ao período em que o estresse ocorre, visto que a maioria dos estudos iniciam o protocolo de estresse imediatamente após o desmame (DIMONTE et al., 2023; LI et al., 2021b; NIU et al., 2020; ROS-SIMÓ; VALVERDE, 2012).

Sabe-se que além dos efeitos sobre o comportamento, o estresse crônico é capaz de alterar o peso de órgãos sensíveis ao estresse, tais como o baço e as glândulas adrenais (BERGER et al., 2019; ULRICH-LAI et al., 2006; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Nesse contexto, embora o IS não tenha alterado o peso do baço dos animais adultos e adolescentes, no presente estudo, o aumento do peso das glândulas adrenais das adultas sugere que houve hiperativação do eixo HPA nesses animais. Essa hipótese é corroborada por estudos com outros modelos de estresse que também observaram efeito semelhante (BORROW et al., 2019; FLAK et al., 2011; HERMAN; ADAMS; PREWITT, 2008; SADLER; BAILEY, 2016). Apesar das evidências que sugerem que a adolescência seja um período de maior susceptibilidade ao estresse (BILBO; SCHWARZ, 2009; BRENHOUSE; SCHWARZ, 2016; MCCORMICK; MATHEWS, 2010; ROMEO, 2010), os resultados deste trabalho sugerem que o estresse de IS induziu respostas menos intensas nos animais adolescentes. Assim, é possível sugerir que,

contrário ao esperado, a plasticidade do eixo HPA e das regiões cerebrais envolvidas no seu controle (MCCORMICK; MATHEWS, 2010) tenham induzido efeitos protetores ao modelo de estresse utilizado no presente estudo.

Aliado a isso, os resultados comportamentais demonstraram alterações mais pronunciadas nas fêmeas adultas, em relação às adolescentes, o que reforça a hipótese de que as adolescentes foram menos suscetíveis ao protocolo de estresse. Embora inesperado, esse dado é corroborado por outros estudos que reportaram resultados semelhantes. Por exemplo, ratas submetidas, no período da adolescência, a um modelo de esquizofrenia através da exposição ao estresse de restrição combinado com choque nas patas não apresentaram comportamento tipo-ansioso, déficits cognitivos ou alteração no número de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos (KLINGER et al., 2019), ao contrário dos machos submetidos ao mesmo protocolo, que apresentaram alterações em todos esses parâmetros (GOMES; GRACE, 2017).

Similarmente, ratas submetidas a 24 horas de separação materna no dia pós-natal 3 não apresentaram alterações comportamentais ou na neurogênese do giro denteado (LOI et al., 2017). Em outro trabalho, ratos machos e fêmeas foram submetidos a um protocolo de estresse crônico durante a adolescência e, após receberem uma injeção de LPS na vida adulta, apenas os machos apresentaram aumento na expressão gênica de mediadores inflamatórios no hipocampo (PYTER et al., 2013). Além desses estudos, conforme mencionado anteriormente, Zhu e colaboradores compararam a exposição de ratos machos e fêmeas ao estresse antes e após a puberdade, e identificaram vulnerabilidades distintas entre os sexos, sendo a adolescência um período de maior vulnerabilidade para os animais machos, enquanto a vida adulta se mostrou crítica para as fêmeas (ZHU; GRACE, 2023).

É importante mencionar que embora essas evidências tenham sido observadas em ratos, um estudo de revisão identificou que 64% dos estudos envolvendo tanto ratos quanto camundongos fêmeas submetidas a protocolos de estresse no início da vida não apresentam diferenças comportamentais (LOI et al., 2017). Dessa forma, esse conjunto de dados sugere a existência de dimorfismos sexuais significativos associados à resposta ao estresse durante a adolescência, e ainda que o período de vulnerabilidade em animais fêmeas não é o mesmo dos machos. É possível ainda que as consequências da exposição ao estresse na adolescência, em fêmeas, sejam observadas mais tardiamente, como recentemente observado em camundongos fêmeas C57BL/6J submetidas ao estresse de derrota social acelerada, uma modificação do

protocolo de estresse de derrota social crônica, cuja maioria apresentou resiliência aos efeitos do estresse a curto prazo, porém na vida adulta, observaram-se déficits cognitivos e redução de sítios pré-sinápticos de neurônios dopaminérgicos no córtex pré-frontal (PANTOJA-URBÁN et al., 2024).

Dados clínicos apontam que mulheres que reportaram adversidades no período pós- puberdade são mais propensas a vivenciar um episódio depressivo na transição da perimenopausa, comparadas a mulheres que não sofreram adversidades na adolescência (EPPERSON et al., 2017), corroborando a hipótese de que os hormônios sexuais femininos desempenham papéis importantes na regulação da resposta ao estresse. Ainda, um estudo de neuroimagem demonstrou que adversidades no início da vida podem impactar significativamente circuitos serotoninérgicos que regulam funções executivas, o que é observado quando há redução dos níveis de estradiol, e atenuado quando esses níveis são reestabelecidos (SHANMUGAN et al., 2017). Por outro lado, a influência do estresse sobre os hormônios sexuais permanece pouco elucidada. Embora alterações na secreção do hormônio luteinizante (BREEN et al., 2012) e na ativação de folículos primordiais (XU et al., 2018) tenham sido reportadas, em animais submetidos a modelos de estresse, esses eventos podem não influenciar o ciclo estral. De fato, assim como no presente estudo, camundongos fêmeas submetidas ao estresse de restrição crônico exibiram ciclos estrais normais, apesar de alterações no pico de secreção do hormônio luteinizante (WAGENMAKER; MOENTER, 2017). Coletivamente, essas evidências sugerem que apesar de influenciar aspectos reprodutivos, alguns modelos de estresse podem não induzir alterações significativas sobre o ciclo estral. Porém, uma vez que os resultados deste estudo não demonstraram diferenças significativas entre o ciclo estral dos diferentes grupos experimentais, não é possível chegar a conclusões concretas acerca do efeito das fases do ciclo estral sobre o comportamento.

Embora o protocolo de IS por 4 semanas tenha induzido alterações comportamentais, essas não foram acompanhadas por aumento na expressão gênica dos principais componentes da via do inflamassoma de NLRP3, como o NLRP3, ASC, caspase-1 e IL-1 β , no PFC dos animais adultos. Apesar desse resultado se opor à hipótese do presente estudo, o aumento da expressão gênica desses componentes parece estar relacionado ao caráter do protocolo de estresse utilizado, visto que camundongos machos da linhagem C57BL/6 submetidos a 30 dias de estresse de restrição apresentaram aumento da expressão de NLRP3 e IL-1 β , no PFC (ALCOCER-GÓMEZ et al., 2016). Estudos utilizando protocolos de CUMS, por outro lado,

observaram aumento de NLRP3, caspase-1 e ASC após 14 dias (ASHRAF et al., 2019), e de IL-1 β , IL-6 e TNF- α após 4 (GENG et al., 2019; LIU et al., 2017) ou 6 semanas (DENG et al., 2015).

Dentre os estudos que investigaram a relação entre o estresse e a via do inflamassoma de NLRP3, dois utilizaram protocolos de IS e observaram aumento dos níveis proteicos de NLRP3, caspase-1, pró-caspase-1, IL-1 β e IL-18 no HPC de camundongos machos isolados durante 8 semanas, a partir do dia pós-natal 28 (LI et al., 2021b; NIU et al., 2020). Nesse sentido, apesar do estressor ser o mesmo que o utilizado no presente trabalho, ressalta-se que foram observadas alterações a nível proteico dos componentes, não sendo avaliada a expressão gênica desses e, em outra região encefálica, a qual pode sofrer efeitos diferentes induzidos pelo estresse, uma vez que a concentração de receptores de glicocorticoides no HPC é superior a encontrada em outras estruturas (MCEWEN; WEISS; SCHWARTZ, 1968, 1969). Destaca-se ainda que diferenças como a duração do protocolo de IS utilizada, a qual foi o dobro do presente estudo, a linhagem e sexo dos animais também podem interferir nos resultados obtidos, visto que dimorfismos sexuais entre as alterações neuroanatômicas e neuroquímicas decorrentes do IS já foram observados (HENG; ZIGMOND; SMEYNE, 2023). Assim, é possível que o estresse de IS por 4 semanas utilizado no presente trabalho não tenha caracterizado um estímulo intenso o suficiente para induzir alterações pela via do inflamassoma de NLRP3, sugerindo que as alterações comportamentais observadas sejam decorrentes de outros mecanismos neurobiológicos.

Embora não tenha sido observado efeito do estresse, a redução da expressão gênica do NLRP3 e da proteína adaptadora ASC pelo tratamento com CBD-10 constituiu um resultado muito interessante. Apesar da atenuação da via do NLRP3 ter sido observada em estudos com culturas celulares, como monócitos, queratinócitos e micróglia humana (ARIAS et al., 2023; LIBRO et al., 2017; LIU et al., 2020a, 2021), até onde se estende o conhecimento dos autores do presente estudo, a atenuação da expressão gênica do NLRP3 e da ASC no PFC de camundongos após tratamento sistêmico com CBD não foi reportada até o momento, caracterizando esse como um achado inédito obtido por este trabalho. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas na expressão gênica de caspase-1 e IL-1 β , os gráficos apresentam uma tendência à redução da expressão de caspase-1 no grupo I-10 e de IL-1 β no grupo A-10, o que pode indicar que o CBD está modulando de alguma forma a via do inflamassoma de NLRP3. Nesse sentido, apesar de o mecanismo pelo qual o CBD é capaz de atenuar a expressão gênica do NLRP3 e da ASC não ter sido elucidado, um estudo observou

que o tratamento com CBD aumentou os níveis proteicos da I κ B α (JIANG et al., 2021), uma proteína celular capaz de inibir o NF- κ B. Esse achado é corroborado pelo fato de que o CBD é capaz de aumentar os níveis de AEA, a qual inibe a ativação do NF- κ B pelo TNF- α , através da inibição da I κ B quinase, enzima reguladora da ativação do NF- κ B (SANCHO et al., 2003). Essas evidências sugerem que o CBD é capaz de modular a etapa de *priming* do inflamassoma de NLRP3, em especial, através da atenuação da expressão gênica dos componentes dessa via.

O impacto gerado pela pandemia de COVID-19 e consequente IS imposto por esse evento ainda está sendo investigado e as consequências a longo prazo desse evento global ainda estão sendo estimadas (COKER; CHENG; YBARRA, 2023; COVID-19 MENTAL DISORDERS COLLABORATORS, 2021). Desse modo, modelos animais de IS possuem grande importância para a elucidação de consequências comportamentais e fisiológicas, bem como os mecanismos envolvidos nessas alterações. Estudos sobre os efeitos do IS a longo prazo, por exemplo, podem ajudar a prevenir possíveis consequências futuras e o uso desses modelos animais pode contribuir para a identificação de medidas capazes de atenuar os efeitos observados e amenizar suas consequências. Desse modo, o conjunto de resultados deste estudo, junto aos trabalhos da literatura mencionados sugerem que o IS enfrentado durante a pandemia possa ter atuado como um fator agravador para outros estressores, culminando nas consequências observadas.

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que, embora a adolescência compreenda um período possivelmente mais suscetível às consequências do estresse (MCCORMICK; MATHEWS, 2007; ROMEO, 2010; ROS-SIMÓ; VALVERDE, 2012), os efeitos do IS durante 4 semanas induziram efeitos mais perceptíveis nas fêmeas adultas, demonstrando que esse estresse produz efeitos controversos em animais, que podem divergir de acordo com sua duração. Ademais, o sexo dos animais pode desempenhar um papel importante nas alterações induzidas por esse estresse, visto que a relação entre hormônios sexuais e a resposta ao estresse já foi reportada. Ademais, a atenuação do comportamento tipo-ansioso e da hiperlocomoção induzidos pelo IS após o tratamento com o CBD, bem como a redução da expressão gênica do NLRP3 e da ASC sugerem que esse composto pode induzir efeitos terapêuticos frente ao IS e que a via do NLRP3 pode ser mais um mecanismo pelo qual o CBD é capaz de atuar.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o protocolo de IS por 4 semanas induziu alterações comportamentais, tanto nas fêmeas adolescentes quanto nas adultas, caracterizadas pelo comportamento tipo-ansioso e comportamento tipo-depressivo, porém que os animais adultos apresentaram maior responsividade ao modelo de estresse utilizado. Conclui-se ainda, que o tratamento com CBD na dose de 10 mg/Kg foi eficaz em atenuar o comportamento tipo-ansioso dos animais, e também a expressão gênica de dois componentes cruciais para a via do inflamassoma de NLRP3, o NLRP3 e a ASC, de maneira independente ao estresse.

Apesar do protocolo utilizado não ter induzido aumento dos componentes da via do inflamassoma de NLRP3, sugere-se que outros mecanismos como alteração nos níveis de neurotransmissores e de glicocorticoides, os quais também são modulados pelo tratamento com CBD, sejam responsáveis pelas alterações comportamentais observadas. Ressalta-se, ainda, que essa hipótese não exclui a possibilidade de que a atenuação da expressão gênica do NLRP3 e da ASC pelo CBD tenha contribuído para o efeito benéfico dessa droga sobre o comportamento dos animais e levanta importantes questionamentos acerca da dinâmica entre o sistema endocanabinoide e o inflamassoma de NLRP3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

- ALCOCER-GÓMEZ, E. et al. NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. **Brain, behavior, and immunity**, v. 36, p. 111–117, fev. 2014.
- ALCOCER-GÓMEZ, E. et al. Stress-Induced Depressive Behaviors Require a Functional NLRP3 Inflammasome. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 7, p. 4874–4882, 2016.
- ALCOCER-GÓMEZ, E. et al. Antidepressants induce autophagy dependent-NLRP3-inflammasome inhibition in Major depressive disorder. **Pharmacological research**, v. 121, p. 114–121, jul. 2017.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM -5 -TR**. 5 texto re ed. Porto Alegre RS: [s.n.].
- ANDERSEN, S. L. et al. Sex differences in dopamine receptor overproduction and elimination. **Neuroreport**, v. 8, n. 6, p. 1495–1498, abr. 1997.
- ANDERSEN, S. L. et al. Pubertal changes in gonadal hormones do not underlie adolescent dopamine receptor overproduction. **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, n. 6, p. 683–691, ago. 2002.
- ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 1, p. 3–18, 2003.
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, n. 13, p. 93–110, 2012.
- ARIAS, A. Y. et al. Anti - inflammatory effects of CBD in human microglial cell line infected with HIV - 1. **Scientific Reports**, v. 13, n. 7376, 2023.
- ASHRAF, A. et al. Silymarin and silymarin nanoparticles guard against chronic unpredictable mild stress induced depressive-like behavior in mice: involvement of neurogenesis and NLRP3 inflammasome. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 33, n. 5, p. 615–631, maio 2019.
- BARICHELLO, T. et al. Cannabidiol reduces host immune response and prevents cognitive impairments in Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis. **European Journal of Pharmacology**, v. 697, n. 1, p. 158–164, 2012.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

BAUER, M. E. et al. Molecular mechanisms of glucocorticoid receptor sensitivity and relevance to affective disorders. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 15, n. 6, p. 354–367, 2003.

BAUERNFEIND, F. G. et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 2, p. 787–791, jul. 2009.

BECKER, M.; PINHASOV, A.; ORNOY, A. Animal models of depression: What can they teach us about the human disease? **Diagnostics**, v. 11, n. 1, p. 1–31, 2021.

BELLAVANCE, M.; RIVEST, S. The HPA – immune axis and the immunomodulatory actions of glucocorticoids in the brain. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. March, p. 1–13, 2014.

BELUJON, P.; GRACE, A. A. Dopamine System Dysregulation in Major Depressive Disorders. v. 20, p. 1036–1046, 2017.

BELZUNG, C.; LEMOINE, M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. **Biology of mood & anxiety disorders**, v. 1, n. 1, p. 9, nov. 2011.

BERGAMASCHI, M. M. et al. Cannabidiol Reduces the Anxiety Induced by Simulated Public Speaking in Treatment-Naïve Social Phobia Patients. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 6, p. 1219–1226, 2011.

BERGER, I. et al. The adrenal gland in stress – Adaptation on a cellular level. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 190, p. 198–206, 2019.

BIASIZZO, M.; KOPITAR-JERALA, N. Interplay Between NLRP3 Inflammasome and Autophagy. v. 11, n. October, p. 1–14, 2020.

BILBO, S. D.; SCHWARZ, J. M. Early-life programming of later-life brain and behavior: A critical role for the immune system. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 3, n. AUG, p. 1–14, 2009.

BISOGNO, T. et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. **British journal of pharmacology**, v. 134, n. 4, p. 845–852, out. 2001.

BITENCOURT, R. M.; TAKAHASHI, R. N.; CARLINI, E. A. **From an Alternative Medicine to a New Treatment for Refractory Epilepsies: Can Cannabidiol Follow the Same Path to**

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

Treat Neuropsychiatric Disorders? . *Frontiers in Psychiatry* , 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2021.638032>>

BLANDINO, P. et al. Gene expression changes in the hypothalamus provide evidence for regionally-selective changes in IL-1 and microglial markers after acute stress. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 7, p. 958–968, 2009.

BODNOFF, S. R. et al. Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, n. 1 Pt 1, p. 61–69, jan. 1995.

BOLSONI, L. M. et al. The anxiolytic effect of cannabidiol depends on the nature of the trauma when patients with post-traumatic stress disorder recall their trigger event. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, v. 44, n. 3, p. 298–307, 2022a.

BOLSONI, L. M. et al. Effects of cannabidiol on symptoms induced by the recall of traumatic events in patients with posttraumatic stress disorder. **Psychopharmacology**, v. 239, n. 5, p. 1499–1507, maio 2022b.

BORRELLI, F. et al. Cannabidiol, a safe and non-psychotropic ingredient of the marijuana plant *Cannabis sativa*, is protective in a murine model of colitis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 87, n. 11, p. 1111–1121, 2009.

BORROW, A. P. et al. Chronic variable stress alters hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the female mouse. **Physiology & behavior**, v. 209, p. 112613, out. 2019.

BREEN, K. M. et al. Stress levels of glucocorticoids inhibit LH β -subunit gene expression in gonadotrope cells. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 26, n. 10, p. 1716–1731, out. 2012.

BRENHOUSE, H. C.; SCHWARZ, J. M. Immunoadolescence: Neuroimmune development and adolescent behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 70, p. 288–299, 2016.

BURSTEIN, S. Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1377–1385, abr. 2015.

BUSILLO, J. M.; AZZAM, K. M.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoids Sensitize the Innate Immune System through Regulation of the NLRP3 Inflammasome *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 44, p. 38703–38713, 4 nov. 2011.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

BUSQUETS-GARCIA, A.; BAINS, J.; MARSICANO, G. CB(1) Receptor Signaling in the Brain: Extracting Specificity from Ubiquity. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 1, p. 4–20, jan. 2018.

CACIOPPO, J.; CACIOPPO, S. Loneliness in the Modern Age: An Evolutionary Theory of Loneliness (ETL). In: **Advances in Experimental Social Psychology**. [s.l: s.n.].

CACIOPPO, J. T.; CACIOPPO, S.; BOOMSMA, D. I. Evolutionary mechanisms for loneliness. **Cognition & emotion**, v. 28, n. 1, p. 3–21, 2014.

CAI, L. et al. Antidepressant-like effects of penta-acetyl geniposide in chronic unpredictable mild stress-induced depression rat model: Involvement of inhibiting neuroinflammation in prefrontal cortex and regulating hypothalamic-pituitaryadrenal axis. **International immunopharmacology**, v. 80, p. 106182, mar. 2020.

CAMPOS, A. C. et al. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 367, n. 1607, p. 3364–3378, dez. 2012.

CAMPOS, A. C. et al. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: Involvement of the endocannabinoid system. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 6, p. 1407–1419, 2013a.

CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, v. 35 Suppl 2, p. S101-11, 2013b.

CAMPOS, A. C. et al. **Plastic and Neuroprotective Mechanisms Involved in the Therapeutic Effects of Cannabidiol in Psychiatric Disorders** . **Frontiers in Pharmacology** , 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00269>>

CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. **Activation of 5HT1A receptors mediates the anxiolytic effects of cannabidiol in a PTSD model. Biennial Meeting of The European Behavioural Pharmacology Society**, 2009a.

CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1517–1521, nov. 2009b.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- CASAROTTO, P. C. et al. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. **Behavioural pharmacology**, v. 21, n. 4, p. 353–358, jul. 2010.
- CERQUEIRA, J. J. et al. The Prefrontal Cortex as a Key Target of the Maladaptive Response to Stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2781–2787, 2007.
- CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235–260, 2001.
- CHROUSOS, G. P. Stress and disorders of the stress system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 7, p. 374–381, 2009.
- CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA**, v. 267, n. 9, p. 1244–1252, mar. 1992.
- COKER, T. R.; CHENG, T. L.; YBARRA, M. Addressing the Long-term Effects of the COVID-19 Pandemic on Children and Families: A Report From the National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. **JAMA**, v. 329, n. 13, p. 1055–1056, 4 abr. 2023.
- CORA, M. C.; KOOISTRA, L.; TRAVLOS, G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 6, p. 776–793, 2015.
- COTELLA, E. M. et al. Adolescent Stress Confers Resilience to Traumatic Stress Later in Life: Role of the Prefrontal Cortex. **Biological Psychiatry Global Open Science**, v. 3, n. 2, p. 274–282, 2023.
- COVID-19 MENTAL DISORDERS COLLABORATORS. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, v. 398, p. 1700–1712, 2021.
- CRUZ, F. C.; DELUCIA, R.; PLANETA, C. S. Effects of chronic stress on nicotine-induced locomotor activity and corticosterone release in adult and adolescent rats. **Addiction biology**, v. 13, n. 1, p. 63–69, mar. 2008.
- DAVIES, K. J. A. Adaptive homeostasis. **Molecular aspects of medicine**, v. 49, p. 1–7, jun. 2016.
- DENG, X.-Y. et al. Geraniol produces antidepressant-like effects in a chronic unpredictable

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

mild stress mice model. **Physiology & behavior**, v. 152, n. Pt A, p. 264–271, dez. 2015.

DIMONTE, S. et al. Social isolation from early life induces anxiety-like behaviors in adult rats: Relation to neuroendocrine and neurochemical dysfunctions. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 158, p. 114181, fev. 2023.

DINKEL, K.; MACPHERSON, A.; SAPOLSKY, R. M. Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS. **Journal of neurochemistry**, v. 84, n. 4, p. 705–716, fev. 2003.

DOANE, L. D.; ADAM, E. K. Loneliness and cortisol: momentary, day-to-day, and trait associations. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 430–441, abr. 2010.

DOS-SANTOS-PEREIRA, M. et al. Cannabidiol prevents LPS-induced microglial inflammation by inhibiting ROS/NF- κ B-dependent signaling and glucose consumption. **Glia**, v. 68, n. 3, p. 561–573, mar. 2020.

DOUGLAS, L. A.; VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Novel-object place conditioning in adolescent and adult male and female rats: effects of social isolation. **Physiology & behavior**, v. 80, n. 2–3, p. 317–325, nov. 2003.

EPPERSON, C. N. et al. Adverse Childhood Experiences and Risk for First-Episode Major Depression During the Menopause Transition. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 78, n. 3, p. e298–e307, mar. 2017.

ESPOSITO, G. et al. Cannabidiol in vivo blunts β -amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1 β and iNOS expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 8, p. 1272–1279, 1 ago. 2007.

FENG, X. et al. Glucocorticoid-Driven NLRP3 Inflammasome Activation in Hippocampal Microglia Mediates Chronic Stress-Induced Depressive-Like Behaviors. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 12, p. 210, 2019.

FERRARI, A. J. et al. Burden of Depressive Disorders by Country, Sex, Age, and Year: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **PLOS Medicine**, v. 10, n. 11, p. e1001547, 5 nov. 2013.

FESTING, M. F. Warning: the use of heterogeneous mice may seriously damage your research. **Neurobiology of aging**, v. 20, n. 2, p. 236–237, 1999.

FLAK, J. N. et al. Opposing effects of chronic stress and weight restriction on cardiovascular,

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

neuroendocrine and metabolic function. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 2, p. 228–234, 2011.

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

FOLAYAN, M. O. et al. Psychosocial Factors Associated with Memory Complaints during the First Wave of the COVID-19 Pandemic: A Multi-Country Survey. **Brain sciences**, v. 13, n. 2, jan. 2023.

FRANCHI, L. et al. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunological reviews**, v. 227, n. 1, p. 106–128, jan. 2009.

FRANCHI, L.; EIGENBROD, T.; NÚÑEZ, G. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 2, p. 792–796, jul. 2009.

FRANK, M. G. et al. Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to E. coli lipopolysaccharide. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, p. 19–30, 2010.

FRANK, M. G.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Stress-induced glucocorticoids as a neuroendocrine alarm signal of danger. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 33, p. 1–6, 2013.

GÁLL, Z. et al. Effects of chronic cannabidiol treatment in the rat chronic unpredictable mild stress model of depression. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 1–16, 2020.

GARCÍA-BUENO, B. et al. Stress Mediators Regulate Brain Prostaglandin Synthesis and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Activation after Stress in Rats. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1969–1978, 1 abr. 2008.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S. et al. **Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders**. **Biomolecules**, 2020.

GENG, J. et al. Andrographolide triggers autophagy-mediated inflammation inhibition and attenuates chronic unpredictable mild stress (CUMS)-induced depressive-like behavior in mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 379, p. 114688, set. 2019.

GEORGIU, P. et al. Experimenters' sex modulates mouse behaviors and neural responses to

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

ketamine via corticotropin releasing factor. **Nature neuroscience**, v. 25, n. 9, p. 1191–1200, set. 2022.

GIEDD, J. N. et al. Quantitative MRI of the temporal lobe, amygdala, and hippocampus in normal human development: ages 4-18 years. **The Journal of comparative neurology**, v. 366, n. 2, p. 223–230, mar. 1996.

GIEDD, J. N. et al. **Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study**. **Nature neuroscience** United States, out. 1999.

GOMES, F. V; GRACE, A. A. Prefrontal Cortex Dysfunction Increases Susceptibility to Schizophrenia-Like Changes Induced by Adolescent Stress Exposure. **Schizophrenia bulletin**, v. 43, n. 3, p. 592–600, maio 2017.

GÓMEZ, M. L. et al. Influence of the brain sexual differentiation process on despair and antidepressant-like effect of fluoxetine in the rat forced swim test. **Neuroscience**, v. 261, p. 11–22, 7 mar. 2014.

GORWOOD, P. Neurobiological mechanisms of anhedonia. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 291–299, 2008.

GRACE, A. A. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. **Nature Publishing Group**, v. 17, n. 525, 2016.

GRILLON, C. Startle reactivity and anxiety disorders: aversive conditioning, context, and neurobiology. **Biological psychiatry**, v. 52, n. 10, p. 958–975, nov. 2002.

GUILLOUX, J. P. et al. Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: Relevance to emotionality and sex. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 197, n. 1, p. 21–31, 2011.

GUIMARÃES, F. S. et al. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 100, n. 4, p. 558–559, 1990.

HAJ-MIRZAIAN, A. et al. Blockade of NMDA receptors reverses the depressant, but not anxiogenic effect of adolescence social isolation in mice. **European journal of pharmacology**, v. 750, p. 160–166, mar. 2015.

HANDA, R. J.; WEISER, M. J. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 2, p. 197–220, 2014.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

HARDER, J. et al. Activation of the Nlrp3 inflammasome by Streptococcus pyogenes requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 9, p. 5823–5829, nov. 2009.

HARTMANN, A. et al. Cannabidiol attenuates aggressive behavior induced by social isolation in mice: Involvement of 5-HT1A and CB1 receptors. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 94, n. October 2018, p. 109637, 2019.

HARTMANN, A. et al. The NLRP3 Inflammasome in Stress Response: Another Target for the Promiscuous Cannabidiol. **Current Neuropharmacology**, 2022.

HAWKLEY, L. C.; CACIOPPO, J. T. Loneliness and pathways to disease. v. 17, p. 98–105, 2003.

HELMAN, T. J. et al. Sex-specific behavioral, neurobiological, and cardiovascular responses to chronic social stress in mice. **Journal of neuroscience research**, v. 100, n. 11, p. 2004–2027, nov. 2022.

HENG, V.; ZIGMOND, M.; SMEYNE, R. J. **Neuroanatomical and neurochemical effects of prolonged social isolation in adult mice** . **Frontiers in Neuroanatomy** , 2023. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2023.1190291>>

HERMAN, J. P.; ADAMS, D.; PREWITT, C. Regulatory Changes in Neuroendocrine Stress-Integrative Circuitry Produced by a Variable Stress Paradigm. **Neuroendocrinology**, v. 61, n. 2, p. 180–190, 2008.

HILL, M. N.; MCEWEN, B. S. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 791–797, 2010.

HILLARD, C. J. Stress regulates endocannabinoid-CB1 receptor signaling. **Seminars in immunology**, v. 26, n. 5, p. 380–388, out. 2014.

HOLM-HADULLA, R. M. et al. **Depression and social isolation during the COVID-19 pandemic in a student population: the effects of establishing and relaxing social restrictions** . **Frontiers in Psychiatry** , 2023. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2023.1200643>>

HOLT-LUNSTAD, J.; SMITH, T. B.; LAYTON, J. B. Social Relationships and Mortality Risk:

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- A Meta-analytic Review. **PLOS Medicine**, v. 7, n. 7, p. e1000316, 27 jul. 2010.
- HOSSEINZADEH, P. et al. Social Consequences of the COVID-19 Pandemic. A Systematic Review. **Investigacion y educacion en enfermeria**, v. 40, n. 1, mar. 2022.
- HUANG, Y. et al. Cannabidiol protects livers against nonalcoholic steatohepatitis induced by high-fat high cholesterol diet via regulating NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathway. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 11, p. 21224–21234, 2019.
- IBRAHIM, W. W. et al. 17 β -Estradiol augments antidepressant efficacy of escitalopram in ovariectomized rats: Neuroprotective and serotonin reuptake transporter modulatory effects. **Psychoneuroendocrinology**, v. 74, p. 240–250, 2016.
- IERACI, A.; MALLEI, A.; POPOLI, M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016.
- INGRAM, R. Origins of Cognitive Vulnerability to Depression. **Cognitive Therapy and Research**, v. 27, p. 77–88, 1 fev. 2003.
- IWATA, M. et al. Psychological stress activates the inflammasome via release of adenosine triphosphate and stimulation of the purinergic type 2X7 receptor. **Biological Psychiatry**, v. 80, n. 1, p. 12–22, 2016.
- IWATA, M.; OTA, K. T.; DUMAN, R. S. The inflammasome: Pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 31, p. 105–114, 2013.
- JIANG, X. et al. CBD Alleviates Liver Injuries in Alcoholics With High-Fat High-Cholesterol Diet Through Regulating NLRP3 Inflammasome-Pyroptosis Pathway. **Frontiers in pharmacology**, v. 12, p. 724747, 2021.
- JOËLS, M. Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. **European journal of pharmacology**, v. 583, n. 2–3, p. 312–321, abr. 2008.
- JOVANOVIC, H. et al. Sex differences in the serotonin 1A receptor and serotonin transporter binding in the human brain measured by PET. **NeuroImage**, v. 39, n. 3, p. 1408–1419, 2008.
- KARELINA, K. et al. Social isolation alters neuroinflammatory response to stroke. v. 106, n. 14, 2009.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- KELLEY, N. et al. The NLRP3 Inflammasome : An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3328, p. 1–24, 2019.
- KHAN, A. et al. Sex Differences in Antidepressant Response in Recent Antidepressant Clinical Trials. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 25, n. 4, 2005.
- KLINGER, K. et al. Female rats are resistant to the long-lasting neurobehavioral changes induced by adolescent stress exposure. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 10, p. 1127–1137, out. 2019.
- KOIKE, H. et al. Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. **Behavioural Brain Research**, v. 202, n. 1, p. 114–121, 2009.
- KOKRAS, N. et al. Forced swim test: What about females? **Neuropharmacology**, v. 99, p. 408–421, 2015.
- KUEHNER, C. Why is depression more common among women than among men? **The Lancet Psychiatry**, v. 4, n. 2, p. 146–158, 1 fev. 2017.
- KUMARI, A. et al. Social isolation mediated anxiety like behavior is associated with enhanced expression and regulation of BDNF in the female mouse brain. **Physiology and Behavior**, v. 158, p. 34–42, 2016.
- LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T.-D. Nlrp3: an immune sensor of cellular stress and infection. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 6, p. 792–795, jun. 2010.
- LEWEKE, F. M. et al. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. **Translational Psychiatry**, v. 2, n. 3, p. e94–e94, 2012.
- LI, D.; WU, M. Pattern recognition receptors in health and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 291, 2021.
- LI, S. et al. NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptosis exerts a crucial role in astrocyte pathological injury in mouse model of depression. **JCI insight**, v. 6, n. 23, dez. 2021a.
- LI, W. et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome with MCC950 prevents chronic social isolation-induced depression-like behavior in male mice. **Neuroscience Letters**, v. 765, n. March, 2021b.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

LI, X. et al. Leptin Increases Expression of 5-HT(2B) Receptors in Astrocytes Thus Enhancing Action of Fluoxetine on the Depressive Behavior Induced by Sleep Deprivation. **Frontiers in psychiatry**, v. 9, p. 734, 2018.

LI, X. et al. A novel murine model of mania. **Molecular Psychiatry**, 2023.

LIBRO, R. et al. Cannabidiol modulates the expression of alzheimer's disease-related genes in mesenchymal stem cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 1–19, 2017.

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

LISBOA, S. F. et al. Microglial Cells as a Link between Cannabinoids and the Immune Hypothesis of Psychiatric Disorders. **Frontiers in neurology**, v. 7, p. 5, 2016.

LIU, C. et al. Inhibitory Effect of Cannabidiol on the Activation of NLRP3 Inflammasome Is Associated with Its Modulation of the P2X7 Receptor in Human Monocytes. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 6, p. 2025–2029, 2020a.

LIU, C. et al. Cannabidiol Protects Human Skin Keratinocytes from Hydrogen-Peroxide-Induced Oxidative Stress via Modulation of the Caspase-1-IL-1 β Axis. **Journal of natural products**, v. 84, n. 5, p. 1563–1572, maio 2021.

LIU, D. et al. Cannabidiol attenuates delayed-type hypersensitivity reactions via suppressing T-cell and macrophage reactivity. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 12, p. 1611–1617, 2010.

LIU, N. et al. Single housing-induced effects on cognitive impairment and depression-like behavior in male and female mice involve neuroplasticity-related signaling. **European Journal of Neuroscience**, v. 52, n. 1, p. 2694–2704, 2020b.

LIU, Y.-M. et al. Ferulic acid inhibits neuro-inflammation in mice exposed to chronic unpredictable mild stress. **International immunopharmacology**, v. 45, p. 128–134, abr. 2017.

LOI, M. et al. Effects of early-life stress on cognitive function and hippocampal structure in female rodents. **Neuroscience**, v. 342, p. 101–119, fev. 2017.

LUJÁN, M. Á. et al. Repeated Cannabidiol treatment reduces cocaine intake and modulates

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

neural proliferation and CB1R expression in the mouse hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 143, p. 163–175, 2018.

LUKKES, J. L. et al. Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 3, n. AUG, p. 1–12, 2009.

MA, L. et al. What do we know about sex differences in depression: A review of animal models and potential mechanisms. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 89, n. August 2018, p. 48–56, 2019.

MADRIGAL, J. L. M. et al. The Increase in TNF- α Levels Is Implicated in NF- κ B Activation and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Brain Cortex after Immobilization Stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 155–163, 2002.

MAKINODAN, M. et al. A Critical Period for Social Experience–Dependent Oligodendrocyte Maturation and Myelination. **Science**, v. 337, n. 6100, p. 1357–1360, 14 set. 2012.

MALHI, G. S. et al. Modelling resilience in adolescence and adversity: a novel framework to inform research and practice. **Translational Psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 316, 2019.

MARCO, E. M. et al. Neuroscience and Biobehavioral Reviews Neurobehavioral adaptations to methylphenidate : The issue of early adolescent exposure. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 8, p. 1722–1739, 2011.

MARTÍN-MORENO, A. M. et al. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. **Molecular pharmacology**, v. 79, n. 6, p. 964–973, jun. 2011.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of pro IL- β . **Molecular Cell**, v. 10, n. 2, p. 417–426, 2002.

MASCARENHAS, D. C.; GOMES, K. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic-like effect induced by TRPV1 receptor activation within the dorsal periaqueductal gray matter in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 250, p. 308–315, 2013.

MATTHEWS, G. A.; TYE, K. M. Neural mechanisms of social homeostasis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1457, n. 1, p. 5–25, 2020.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

MCCORMICK, C. M. et al. Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. **Brain and Cognition**, v. 72, n. 1, p. 73–85, 2010.

MCCORMICK, C. M.; MATHEWS, I. Z. HPA function in adolescence: Role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 86, n. 2, p. 220–233, 2007.

MCCORMICK, C. M.; MATHEWS, I. Z. Adolescent development, hypothalamic-pituitary-adrenal function, and programming of adult learning and memory. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 756–765, 2010.

MCEWEN, B. S. Stress and Hippocampal Plasticity. **Annual Review of Neuroscience**, n. 22, p. 105–122, 1999.

MCEWEN, B. S. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. **European Journal of Pharmacology**, v. 583, n. 2–3, p. 174–185, 2008.

MCEWEN, B. S.; WEISS, J. M.; SCHWARTZ, L. S. Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. **Nature**, v. 220, n. 5170, p. 911–912, nov. 1968.

MCEWEN, B. S.; WEISS, J. M.; SCHWARTZ, L. S. Uptake of corticosterone by rat brain and its concentration by certain limbic structures. **Brain research**, v. 16, n. 1, p. 227–241, nov. 1969.

MCGUIRE, P. et al. Cannabidiol (CBD) as an Adjunctive Therapy in Schizophrenia: A Multicenter Randomized Controlled Trial. **The American journal of psychiatry**, v. 175, n. 3, p. 225–231, mar. 2018.

MECHA, M. et al. Endocannabinoids drive the acquisition of an alternative phenotype in microglia. **Brain, behavior, and immunity**, v. 49, p. 233–245, out. 2015.

MECHOULAM, R. The Pharmacohistory of Cannabis Sativa. In: [s.l.: s.n.]. p. 1–20.

MEDENDORP, W. E. et al. Altered Behavior in Mice Socially Isolated During Adolescence Corresponds With Immature Dendritic Spine Morphology and Impaired Plasticity in the Prefrontal Cortex. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 12, p. 87, 2018.

MEHTA, M. A. et al. Amygdala, hippocampal and corpus callosum size following severe early institutional deprivation: the English and Romanian Adoptees study pilot. **Journal of child**

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

psychology and psychiatry, and allied disciplines, v. 50, n. 8, p. 943–951, ago. 2009.

MICZEK, K. A. et al. Aggressive behavioral phenotypes in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 1–2, p. 167–181, 2001.

MILISAV, I.; POLJSAK, B.; ŠUPUT, D. **Adaptive response, evidence of cross-resistance and its potential clinical use**. [s.l.: s.n.]. v. 13

MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 512, p. 199–205, 2005.

MORI, M. A. et al. Cannabidiol reduces neuroinflammation and promotes neuroplasticity and functional recovery after brain ischemia. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 75, p. 94–105, abr. 2017.

MUNHOZ, C. D. et al. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 14, p. 3813–3820, abr. 2006.

NAGARKATTI, P. et al. Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. **Future medicinal chemistry**, v. 1, n. 7, p. 1333–1349, out. 2009.

NAITO, R. et al. Social isolation as a risk factor for all-cause mortality: Systematic review and meta-analysis of cohort studies. **PloS one**, v. 18, n. 1, p. e0280308, 2023.

NASEER, S. et al. **COVID-19 outbreak: Impact on global economy** . **Frontiers in Public Health** , 2023. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2022.1009393>>

NICHOLS, J. M.; KAPLAN, B. L. F. Immune Responses Regulated by Cannabidiol. **Cannabis and cannabinoid research**, v. 5, n. 1, p. 12–31, mar. 2020.

NIESINK, R. J. M.; VAN REE, J. M. Short-term isolation increases social interactions of male rats: A parametric analysis. **Physiology and Behavior**, v. 29, n. 5, p. 819–825, 1982.

NIU, L. et al. The critical role of the hippocampal NLRP3 inflammasome in social isolation-induced cognitive impairment in male mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 175, n. August, p. 107301, 2020.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

ONAIVI, E. S.; GREEN, M. R.; MARTIN, B. R. Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 253, n. 3, p. 1002–1009, jun. 1990.

PACAK, K. et al. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. **The American journal of physiology**, v. 275, n. 4, p. R1247-55, out. 1998.

PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: Implications for stress-related disorders. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 4, p. 502–548, 2001.

PANKSEPP, J. B. et al. Affiliative behavior, ultrasonic communication and social reward are influenced by genetic variation in adolescent mice. **PloS one**, v. 2, n. 4, p. e351, abr. 2007.

PANKSEPP, J. B.; LAHVIS, G. P. Social reward among juvenile mice. **Genes, brain, and behavior**, v. 6, n. 7, p. 661–671, out. 2007.

PANTOJA-URBÁN, A. H. et al. Gains and Losses: Resilience to Social Defeat Stress in Adolescent Female Mice. **Biological Psychiatry**, v. 95, n. 1, p. 37–47, 2024.

PARK, C. R.; CAMPBELL, A. M.; DIAMOND, D. M. Chronic psychosocial stress impairs learning and memory and increases sensitivity to yohimbine in adult rats. **Biological psychiatry**, v. 50, n. 12, p. 994–1004, dez. 2001.

PEREIRA, C.; MEDEIROS, A.; BERTHOLINI, F. **O medo da morte flexibiliza perdas e aproxima polos: consequências políticas da pandemia da COVID-19 no Brasil**. *Revista de Administração Pública* scielo , , 2020.

PERLMAN, D.; PEPLAU, L. A. Toward a Social Psychology of Loneliness. **Personal Relationships**, n. 3, p. 31–56, 1981.

PINNA, G. et al. In socially isolated mice, the reversal of brain allopregnanolone down-regulation mediates the anti-aggressive action of fluoxetine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 4, p. 2035–2040, 18 fev. 2003.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress , Depression , and Neuroplasticity : A Convergence of Mechanisms. p. 88–109, 2008.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730–732, 1977.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

POWELL, N. D. et al. Social stress up-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome via β -adrenergic induction of myelopoiesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 41, p. 16574–16579, 2013.

POWELL, S. B.; SWERDLOW, N. R. The Relevance of Animal Models of Social Isolation and Social Motivation for Understanding Schizophrenia: Review and Future Directions. **Schizophrenia Bulletin**, v. 49, n. 5, p. 1112–1126, 1 set. 2023.

PYTER, L. M. et al. Sex differences in the effects of adolescent stress on adult brain inflammatory markers in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 30, p. 88–94, 2013.

RADLEY, J. J. et al. Repeated Stress Induces Dendritic Spine Loss in the Rat Medial Prefrontal Cortex. n. March, p. 313–320, 2006.

RAMSEY, L. A. et al. Waving Through the Window: A Model of Volitional Social Interaction in Female Mice. **Biological Psychiatry**, v. 91, n. 11, p. 988–997, 2022.

REPPUCCI, C. J.; VEENEMA, A. H. MethodsX The social versus food preference test : A behavioral paradigm for studying competing motivated behaviors in rodents. **MethodsX**, v. 7, p. 101119, 2020.

RESSTEL, L. B. M. et al. 5-HT_{1A} receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **British journal of pharmacology**, v. 156, n. 1, p. 181–188, jan. 2009.

REUVENI, N. et al. The antidepressant and anxiolytic effects of cannabinoids in chronic unpredictable stress: a preclinical systematic review and meta-analysis. **Translational Psychiatry**, v. 12, n. 217, 2022.

ROBERTS, A. G.; LOPEZ-DURAN, N. L. Developmental influences on stress response systems: Implications for psychopathology vulnerability in adolescence. **Comprehensive Psychiatry**, v. 88, p. 9–21, 2019.

ROJAS-CARVAJAL, M. et al. Testing experience and environmental enrichment potentiated open-field habituation and grooming behaviour in rats. **Animal Behaviour**, v. 137, p. 225–235, 2018.

ROMEO, R. D. et al. Testosterone cannot activate an adult-like stress response in prepubertal male rats. **Neuroendocrinology**, v. 79, n. 3, p. 125–132, 2004.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

ROMEO, R. D. Adolescence: A central event in shaping stress reactivity. **Developmental Psychobiology**, v. 52, n. 3, p. 244–253, 2010.

ROMEO, R. D.; KARATSOREOS, I. N.; MCEWEN, B. S. Pubertal maturation and time of day differentially affect behavioral and neuroendocrine responses following an acute stressor. **Hormones and behavior**, v. 50, n. 3, p. 463–468, set. 2006.

ROMEO, R. D.; LEE, S. J.; MCEWEN, B. S. Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats. **Neuroendocrinology**, v. 80, n. 6, p. 387–393, 2004.

ROOK, K. S. **Research on social support, loneliness, and social isolation: Toward an integration. Review of Personality & Social Psychology** US Sage Publications, Inc., , 1984.

ROS-SIMÓ, C.; VALVERDE, O. Early-life social experiences in mice affect emotional behaviour and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 102, n. 3, p. 434–441, 2012.

SADLER, A. M.; BAILEY, S. J. Repeated daily restraint stress induces adaptive behavioural changes in both adult and juvenile mice. **Physiology & Behavior**, v. 167, p. 313–323, 2016.

SALES, A. J. et al. Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex. **Molecular neurobiology**, v. 56, n. 2, p. 1070–1081, fev. 2019.

SANCHO, R. et al. Anandamide inhibits nuclear factor-kappaB activation through a cannabinoid receptor-independent pathway. **Molecular pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 429–438, fev. 2003.

SANTARELLI, L. et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805–809, 2003.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, fev. 2000.

SCHIAVON, A. P. et al. Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 64, p. 27–34, jan. 2016.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes. **Cell**, v. 140, p. 821–832, 2010.
- SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 96, p. 1–6, 2015.
- SEQUEIRA-CORDERO, A. et al. Behavioural characterisation of chronic unpredictable stress based on ethologically relevant paradigms in rats. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 17403, 2019.
- SHANMUGAN, S. et al. Impact of Tryptophan Depletion on Executive System Function during Menopause is Moderated by Childhood Adversity. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 12, p. 2398–2406, 2017.
- SHANSKY, R. M.; MURPHY, A. Z. Considering sex as a biological variable will require a global shift in science culture. **Nature Neuroscience**, v. 24, n. 4, p. 457–464, 2021.
- SHEEDY, F. J. et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. **Nature Immunology**, v. 14, n. 8, p. 812–820, 2013.
- SHIRENOVA, S. D.; KHLEBNIKOVA, N. N.; KRUPINA, N. A. Changes in Sociability and Preference for Social Novelty in Female Rats in Prolonged Social Isolation. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 53, n. 1, p. 103–118, 2023.
- SILOTE, G. P. et al. Emerging evidence for the antidepressant effect of cannabidiol and the underlying molecular mechanisms. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 98, p. 104–116, 2019.
- SILOTE, G. P. et al. Strain-, Sex-, and Time-Dependent Antidepressant-like Effects of Cannabidiol. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 12, dez. 2021.
- SMITH, K. J. et al. The association between loneliness, social isolation and inflammation: A systematic review and meta-analysis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 112, n. September 2019, p. 519–541, 2020.
- SMITH, S. M.; VALE, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 383–395, 2006.
- SOUSA, N. et al. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. **Neuroscience**, v. 97, n. 2, p.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

253–266, 2000.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 4, p. 417–463, 2000.

STELLA, N. Endocannabinoid signaling in microglial cells. **Neuropharmacology**, v. 56 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 244–253, 2009.

STEVENSON, J. R. et al. Oxytocin administration prevents cellular aging caused by social isolation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 103, p. 52–60, maio 2019.

STREKALOVA, T. et al. **Stress-induced hyperlocomotion as a confounding factor in anxiety and depression models in mice** *Behavioural Pharmacology*. [s.l: s.n.].

STUTZ, A. et al. NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. **The Journal of experimental medicine**, v. 214, n. 6, p. 1725–1736, jun. 2017.

SULLENS, D. G. et al. Social isolation induces hyperactivity and exploration in aged female mice. **PLoS ONE**, v. 16, n. 2 February, p. 1–12, 2021.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, mar. 2010.

TAN, S. Y.; YIP, A. Hans Selye (1907-1982): Founder of the stress theory. **Singapore medical journal**, v. 59, n. 4, p. 170–171, abr. 2018.

TELLES, L. E. DE B. et al. **Domestic violence in the COVID-19 pandemic: a forensic psychiatric perspective**. **Brazilian Journal of Psychiatry**scielo , , 2021.

THASE, M. E. et al. Relative antidepressant efficacy of venlafaxine and SSRIs: sex-age interactions. **Journal of women's health (2002)**, v. 14, n. 7, p. 609–616, set. 2005.

TOTTENHAM, N. et al. Prolonged institutional rearing is associated with atypically large amygdala volume and difficulties in emotion regulation. **Developmental science**, v. 13, n. 1, p. 46–61, jan. 2010.

ULRICH-LAI, Y. M. et al. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 5, p. E965–E973, 1 nov. 2006.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 2009.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

UMBERSON, D.; MONTEZ, J. K. Social relationships and health: a flashpoint for health policy. **Journal of health and social behavior**, v. 51 Suppl, n. Suppl, p. S54-66, 2010.

UNTERHOLZNER, L. et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. **Nature Immunology**, v. 11, n. 11, p. 997–1004, 2010.

URIBE-MARIÑO, A. et al. Anti-aversive effects of cannabidiol on innate fear-induced behaviors evoked by an ethological model of panic attacks based on a prey vs the wild snake *Epicrates cenchria crassus* confrontation paradigm. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 2, p. 412–421, jan. 2012.

VAJHALA, P. R.; MIRAMS, R. E.; HILL, J. M. Multiple binding sites on the pyrin domain of ASC protein allow self-association and interaction with NLRP3 protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 50, p. 41732–41743, dez. 2012.

VAROL, A. B.; ESEN, E. C.; KOÇAK, E. E. Repeated Collection of Vaginal Smear Causes Stress in Mice. **Noro psikiyatri arsivi**, v. 59, n. 4, p. 325–329, 2022.

VIEIRA, P. R.; GARCIA, L. P.; MACIEL, E. L. N. **Isolamento social e o aumento da violência doméstica: o que isso nos revela?** *Revista Brasileira de Epidemiologia* scielo , , 2020.

VÕIKAR, V. et al. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: Assessment of behavioral consequences. **Genes, Brain and Behavior**, v. 4, n. 4, p. 240–252, 2005.

VRECHI, T. A. M. et al. Cannabidiol induces autophagy via ERK1/2 activation in neural cells. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 5434, 2021.

WAGENMAKER, E. R.; MOENTER, S. M. Exposure to Acute Psychosocial Stress Disrupts the Luteinizing Hormone Surge Independent of Estrous Cycle Alterations in Female Mice. **Endocrinology**, v. 158, n. 8, p. 2593–2602, 1 ago. 2017.

WALKER, D. M. et al. Long-term behavioral effects of post-weaning social isolation in males and females. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 13, p. 1–20, 2019.

WALLACE, D. L. et al. CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 200–209, 2009.

WATANABE, S. et al. Dihydromyricetin improves social isolation-induced cognitive

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- impairments and astrocytic changes in mice. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2022.
- WEBSTER, D. G.; BAUMGARDNER, D. J.; DEWSBURY, D. A. Open-field behavior in eight taxa of muroid rodents. **Bulletin of the Psychonomic Society**, v. 13, n. 2, p. 90–92, 1979.
- WEI, X. Y. et al. Anxiolytic-like effects of oleamide in group-housed and socially isolated mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 6, p. 1189–1195, 2007.
- WEISS, I. C. et al. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. **Behavioural brain research**, v. 152, n. 2, p. 279–295, jul. 2004.
- WENGER, G. C. et al. Social isolation and loneliness in old age: Review and model refinement. **Ageing and Society**, v. 16, n. 3, p. 333–358, 1996.
- WILLNER, P. Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90–110, 10 ago. 2005.
- WILSON, R. C. et al. Open-field behavior in muroid rodents. **Behavioral biology**, v. 17, n. 4, p. 495–506, ago. 1976.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mental disorders**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>>. Acesso em: 16 jan. 2024.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depressive disorder (depression)**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>>. Acesso em: 19 dez. 2023.
- WU, X. et al. Childhood social isolation causes anxiety-like behaviors via the damage of blood-brain barrier in amygdala in female mice. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 10, p. 943067, 2022.
- XIONG, Y. et al. Social isolation and the brain: effects and mechanisms. **Molecular Psychiatry**, v. 28, n. 1, p. 191–201, 2023.
- XU, M. et al. Chronic restraint stress induces excessive activation of primordial follicles in mice ovaries. **PloS one**, v. 13, n. 3, p. e0194894, 2018.
- YAMAMURO, K. et al. A prefrontal–paraventricular thalamus circuit requires juvenile social experience to regulate adult sociability in mice. **Nature Neuroscience**, v. 23, n. 10, p. 1240–

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

1252, 2020.

ZANELATI, T. V et al. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT_{1A} receptors. **British journal of pharmacology**, v. 159, n. 1, p. 122–128, jan. 2010.

ZELIKOWSKY, M. et al. The Neuropeptide Tac2 Controls a Distributed Brain State Induced by Chronic Social Isolation Stress. **Cell**, v. 173, n. 5, p. 1265- 1279.e19, 2018.

ZHU, X.; GRACE, A. A. Sex- and exposure age-dependent effects of adolescent stress on ventral tegmental area dopamine system and its afferent regulators. **Molecular Psychiatry**, v. 28, n. 2, p. 611–624, 2023.

ZOU, S.; KUMAR, U. **Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System**. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018.

ZUARDI, A. W. et al. Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. **Journal of Psychopharmacology**, v. 7, n. 1_suppl, p. 82–88, 1 jan. 1993.

ZUARDI, A. W. **History of cannabis as a medicine: a review**. **Brazilian Journal of Psychiatry**scielo , , 2006.

ZUARDI, A. W. et al. **Inverted U-Shaped Dose-Response Curve of the Anxiolytic Effect of Cannabidiol during Public Speaking in Real Life** . **Frontiers in Pharmacology** , 2017a. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00259>>

ZUARDI, A. W. et al. Chapter e13 - The Anxiolytic Effects of Cannabidiol (CBD). In: PREEDY, V. R. B. T.-H. OF C. AND R. P. (Ed.). San Diego: Academic Press, 2017b. p. e131–e139.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

ANEXOS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do envolvimento do inflamassoma de NLRP3 nas consequências da exposição a isolamento social prolongado em camundongos e possível efeito benéfico do canabidiol", registrada sob nº 21.1.522.60.3, sob a responsabilidade de Júlia Oliveira Bilibio e Sabrina Francesca de Souza Lisboa, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada *ad referendum* em 07/12/2021 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica	
Vigência da Autorização	13/12/2021 a 13/12/2023	
Espécie/Linhagem/Raça	Cam. Heterogêncio CD-1	Cam. Heterogêncio CD-1
Nº de animais	182	182
Peso/Idade	13g/ 3 semanas	13g/ 3 semanas
Sexo	Macho	Fêmea
Origem	Biotério I da FCFRP	

Ribeirão Preto, 07 de dezembro de 2021.

Danielle Palma de Oliveira
 Coordenadora da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre - CEP 14040-903 - Ribeirão Preto - SP
 Comissão de Ética no Uso de Animais - ceua@fcrfp.usp.br
 Fone: (16) 3315-8559 - Fax: (16) 33152-4892

Anexo A - Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP - USP) para realização dos experimentos em animais.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).